

**Aus dem Physiologischen Institut
der Universität Würzburg
Lehrstuhl I
Vorstand: Professor Dr. med. M. Kuhn**

**Untersuchung des Epsilon-Toxins und Mutanten des Epsilon-Toxins
aus *Clostridium perfringens*
auf Kanalbildung**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Steffen Seitz
aus Esslingen
Würzburg, Mai 2006**

Referent: Prof. Dr. med. M. Gekle

Koreferent: Prof. Dr. med. H. Koepsell

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 01. August 2006

Der Promovend ist Zahnarzt

Meiner Familie
gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
1.1.	<i>Clostridium perfringens</i>	1
1.1.1.	Morphologie und Eigenschaften	1
1.1.2.	Krankheitsbilder	3
1.1.3.	Nutzen von Toxinen für Clostridien	4
1.2.	Bakterielle Toxine	5
1.2.1.	Endotoxine	5
1.2.2.	Exo- oder Proteintoxine	7
1.2.2.1.	Binäre oder A/B-Toxine	7
1.2.2.2.	Cytolysine	10
1.2.3.	Epsilon-Toxin	11
2.	Material und Methoden	15
2.1.	Abkürzungen	15
2.2.	Chemikalien	16
2.3.	Geräte	17
2.4.	Biophysikalische Methoden	18
2.4.1.	Bilayer-Messungen	18
2.4.1.1.	Aufbau der Versuchsanordnung	18
2.4.1.2.	Herstellung von künstlichen Lipidmembranen zur Rekonstitution von Poren	20
2.4.1.3.	Einzelkanalleitfähigkeitsmessung	21
2.4.1.4.	Spannungsabhängigkeit	23
2.4.1.5.	Selektivitätsmessung	24
3.	Ergebnisse	27
3.1.	Ergebnisse der Einzelkanalmessungen	27
3.1.1.	Einzelkanalmessungen des Wildtyps	29
3.1.2.	Einzelkanalmessungen der Mutanten	30
3.1.2.1.	Einzelkanalmessungen des Epsilon-Toxins 700	30
3.1.2.2.	Einzelkanalmessungen des Epsilon-Toxins 701	31
3.1.2.3.	Einzelkanalmessungen des Epsilon-Toxins 702	33
3.1.2.4.	Einzelkanalmessungen des Epsilon-Toxins 703	34
3.1.2.5.	Einzelkanalmessungen in verschiedenen Salzen	37
3.1.3.	Ergebnisse der Selektivitätsmessungen	38
3.1.3.1.	Untersuchung der Porenspezifität	38
3.1.4.	Ergebnisse der Spannungsabhängigkeitsmessungen	39

4.	Diskussion	44
4.1.	Charakterisierung mit Hilfe von Bilayer-Messungen	45
4.1.1.	Einzelkanalmessungen	45
4.1.1.1.	Einzelkanalmessungen des Wildtyps	45
4.1.1.2.	Einzelkanalmessungen der Mutanten in KCl	45
4.1.1.3.	Einzelkanalmessungen der Mutanten in Alkalisalzen und Kaliumacetat	47
4.1.2.	Selektivität	48
4.1.3.	Spannungsabhängigkeit	48
5.	Zusammenfassung	50
6.	Literaturverzeichnis	53

1. Einleitung

1.1. *Clostridium perfringens*

Das *Clostridium perfringens* (auch *C. welchii*) gehört zu den Clostridien, die neben der Gattung *Bacillus* den endosporen-bildenden Stäbchen zugerechnet werden. Bei diesen Gram-positiven Bakterien dient die Bildung der Endosporen der Resistenz gegen Hitze und Austrocknung, die auf dem dehydratierten Zustand des Sporenzytoplasmas beruht. Die für das Wachstum optimale Temperatur der meisten bekannten Clostridien liegt im Bereich zwischen 30° und 40° Celsius. Es existieren unter den Clostridien auch viele thermophile Arten, die Temperaturen von bis zu 75° Celsius überleben können (Schlegel, 1985, Rood et al., 1997).

Die Clostridien sind im Magen-Darmtrakt und gelegentlich im Respirations- und Urogenitaltrakt von Mensch und Tier verbreitet (Smedley et al., 2004). Hier findet sich auch *C. perfringens*, das als eine der am häufigsten vorkommenden Clostridien-Arten hauptsächlich in der Darmflora von Säugetieren und im Erdboden vorkommt. *C. perfringens* ist außerdem mit einer Vielzahl von Virulenzfaktoren assoziiert: Das Bakterium ist an verschiedenen Krankheiten, wie Gasbrand und Wundinfektionen bei Mensch und Tier sowie Enterotoxämien bei verschiedenen Tierarten beteiligt.

1.1.1. Morphologie und Eigenschaften

Bei *C. perfringens* handelt es sich um einen plumpen (4 x 1,5 µm), Gram-positiven und unbeweglichen Sporenbildner, der einzeln oder paarweise vorkommt. Die Bakterien werden zu den saccharolytischen Clostridien gezählt, als deren Gärungsprodukte große Mengen an Essig-, und Buttersäure, Lactat und in kleineren Mengen auch Ameisen- und Propionsäure ausgeschieden werden. Obwohl *C. perfringens* als anaerobes Bakterium gilt, benötigt es nicht zwangsläufig anaerobe Bedingungen. Es wächst häufig in Assoziation mit anderen Bakterien unter aeroben Verhältnissen. Auf Blutagar bildet der Keim mittelgroße, glänzende, runde und mukoide, schleimähnliche Kolonien. Im direkten Umfeld der Kolonie wird eine vollständige Hämolyse erreicht, in weiterer Entfernung ein breiter, unvollständiger Hämolysehof.

C. perfringens wird in verschiedene Subtypen unterteilt, deren Zuordnung sich von A bis E nach dem Spektrum der gebildeten Toxine des Bakteriums richtet (Al-Khaldi et al., 2004). Die Unterteilung erfolgt anhand der Haupttoxine (auch: Hauptvirulenzfaktoren). Eine anderweitige morphologische oder biochemische Unterscheidung der Typen ist nicht möglich.

<i>C. perfringens</i> Typ	Produziertes Haupttoxin			
	Alpha	Beta	Epsilon	Iota
A	α	-	-	-
B	α	β	ϵ	-
C	α	β	-	-
D	α	-	ϵ	-
E	α	-	-	ι

Tabelle 1: Typeneinteilung von *C. perfringens* aufgrund der Bildung von Toxinen (Holt, 1984).

Neben den Haupttoxinen, die zur Klassifizierung der verschiedenen Subtypen genutzt werden, existieren einige weitere Virulenzfaktoren. Dabei handelt es sich bei den Haupttoxinen um letale, bei den weiteren Faktoren um nicht-letale Toxine. Die Wirkungen der bei Clostridien vorkommenden Toxine ist Tabelle 2 zu entnehmen.

Toxin	Letalität	Wirkung
Alpha (α)	Ja	Phospholipase C, nekrotisierend
Beta (β)	Ja	Nekrotisierend, Cytolyse
Delta (δ)	Ja	Hämolysin
Epsilon (ϵ)	Ja	Nekrotisierend, Cytolyse
Eta (η)	Ja	
Gamma (γ)	Ja	
Iota (ι)	Ja	ADP-Ribosylierung von Aktin
Kappa (κ)	Nein	Kollagenase

Lamda (λ)	Nein	Proteinase
My (μ)	Nein	Hyaluronidase
Ny (ν)	Nein	Desoxyribonuclease
Theta (θ)	Nein	Hämolysierend, Cytolysin
Neuraminidase	Nein	Hydrolyse v. Serum-Glykoprotein
Enterotoxin	Nein	Reversion d. Elektrolyten, Wassertransport

Tabelle 2: Wirkung verschiedener Toxine der Clostridien.

1.1.2. Krankheitsbilder

Bei *C. perfringens* handelt es sich um ein pathogenes Bakterium. Es ist für eine Reihe von Krankheitsbildern verantwortlich:

Gasbrand (*C. perfringens* Typ A). Die nekrotisierende Myositis kommt vor allem beim Menschen, in seltenen Fällen auch beim Tier vor. Die Verunreinigung von Wunden mit Erde, Staub und Fäkalien führt zu einer Infektion unter anaeroben Bedingungen. Die Toxine verursachen schwere ödematöse und nekrotisierende Prozesse der Muskulatur. Die führt zur allgemeinen Intoxikation und damit häufig auch zum Tod (Kayser et al., 1998).

Nekrotisierende Mastitis kommt sporadisch bei Rindern vor. Sie entsteht galaktogen *post partum* oder infolge einer bevorstehenden Euterinfektion anderer Ursache. Es entwickelt sich eine schwere, akute Mastitis mit stinkendem Sekret, Gasbildung und Nekrotisierung der Gewebe.

Lebensmittelvergiftung (*C. perfringens* Typ A). Aufgrund einer extremen Hitzeresistenz können sich die Sporen bestimmter *C. perfringens* Typ A-Stämme bei der Zubereitung von Speisen trotz vorherigen Kochens massiv vermehren. Gemeinschaftsverpflegung mit langen Warmhaltezeiten und Fertigungszubereitungen auf Fleischgrundlage sind klassische Voraussetzungen einer so verursachten

Lebensmittelvergiftung. Das *C. perfringens*-Enterotoxin wird hierbei erst im Darm nach Sporulierung und Zerfall der vegetativen Zellen freigesetzt. Symptome wie Unwohlsein, Kolikerscheinungen, Brechreiz und Durchfall stellen sich erst bis zu 18 Stunden nach Verzehr der kontaminierten Lebensmittel ein. Der Verlauf ist im Allgemeinen gutartig (Smedley et al., 2004).

Enterotoxämien. Diese kommen häufig vor und verursachen je nach Tierart, Alter und Haltungsbedingungen unterschiedliche Krankheitsformen. Am empfänglichsten sind hierbei Wiederkäuer, dann Huhn, Schwein und auch Kaninchen. Es kann zwischen ansteckenden Enterotoxämien bei Jungtieren und Enterotoxämien, die infolge der Umstellung der Darmflora auf toxinbildende *C. perfringens*- Stämme entstehen, unterschieden werden. Durch erhöhte Durchlässigkeit der Darmwand gelangen Toxine ins Blut und verursachen allgemeine Intoxikationen (Borrmann et al., 2001).

1.1.3. Nutzen von Toxinen für Clostridien

Die Toxine dienen den Clostridien als Instrument zu Nahrungserwerb und Verbreitung. Da es sich bei den Clostridien um Bakterien mit einem biphasischen Lebenszyklus handelt, pendeln sie zwischen einer Wachstums- und einer Sporulationsphase hin und her. Zwischen diesen beiden Phasen ist eine Ruhephase möglich, die es den Clostridien ermöglicht auch in negativen Umweltbedingungen zu überleben. So können sie ihren Wirt töten und trotzdem in ihm überleben. Der Wirt wird nach seinem Tod zu einem anaeroben Fermenter, der eine optimale Vermehrung der Bakterien ermöglicht. Auf das Vermehren folgt schließlich, nach Verbrauch des Nahrungsreservoirs, die Verbreitung durch Sporen.

1.2. Bakterielle Toxine

Einige Bakterien bilden stark wirksame Substanzen: Toxine. Diese können gegen andere Mikroorganismen oder auch gegen Wirtsorganismen gerichtet sein. Sie beeinflussen den Metabolismus des Wirts und führen im extremsten Fall zu dessen Tod. Die bakteriellen Toxine werden entweder von Bakterien produziert und im weiteren Verlauf ausgeschieden oder sie sind Bestandteile der Zellwand. Im ersten Fall spricht man von Exotoxinen, im zweiten von Endotoxinen.

1.2.1. Endotoxine

Bei den Endotoxinen handelt es sich um einen Teil von Polysacchariden – so genannte Lipopolysaccharide (LPS) -, die bei Gram-negativen Bakterien als Bestandteil der Zellhülle lediglich im äußeren Monolayer vorkommen oder diesen auch komplett bilden. Dieses Endotoxin wird beim Tod und dem sich anschließenden Zerfall der Bakterien freigesetzt und kann in den Organismus eines Wirts gelangen.

Bei den LPS sind drei Abschnitte zu unterscheiden: Der Lipid A-Bereich der Moleküle stellt das lipophile bzw. hydrophobe Ende dar. Das Rückgrat dieses Bereichs bildet eine D-Glucosaminyl- β -D-Glucosamin-Einheit, an die fünf bis sechs zumeist ungesättigte Fettsäuren über Amid- oder Esterbindungen gekoppelt sind (Galanos et al., 1977). Dieser wirkt toxisch. Der Lipid A-Bereich ist über hydrophobe Wechselwirkungen zum Membranprotein OmpA zusätzlich in die äußere Membran integriert (Yamada & Mitsushima, 1980).

Die hydrophobe Kernzone der LPS besteht aus einem Oligosaccharid, das aus Hexosen und Heptosen und dem seltenen Zucker 3-Desoxy-D-Manno-Octulosonsäure aufgebaut ist (Lugtenberg & van Alphen, 1983). Schließlich folgen als drittes Element die O-spezifischen Seitenketten in großer Zahl, die aus einer veränderlichen Zahl an Tri-, Tetra- und Pentasacchariden aufgebaut sind (Schlegel, S. 51). Deren Sequenz und die Anzahl der Wiederholungen (bis weit über 40) sind sehr variabel. Die O-spezifischen Seitenketten wirken als Antigene. Da sie eine große Variabilität besitzen, ist die Abwehr durch den Wirtsorganismus extrem erschwert (Galanos et al., 1977).

Die Aufgabe der LPS besteht nicht darin, die Zellen des Wirts zu schädigen. Sie sind vielmehr dazu da, das produzierende Bakterium zu schützen. Aufgrund dieser Tatsache sind Endotoxine nicht krankheitsspezifisch, sondern lediglich verantwortlich für allgemeine Krankheitssymptome. Nach Freisetzung beim Tod des Bakteriums veranlassen kleinere Mengen der Endotoxine den Wirt zur Produktion von Pyrogenen. Dies führt zu Fieber. Werden größere Mengen LPS freigesetzt, so führt diese beim Wirt zur Produktion großer Mengen Cytokinen, die in der Folge zu einem Schock des Wirtsorganismus führen können.

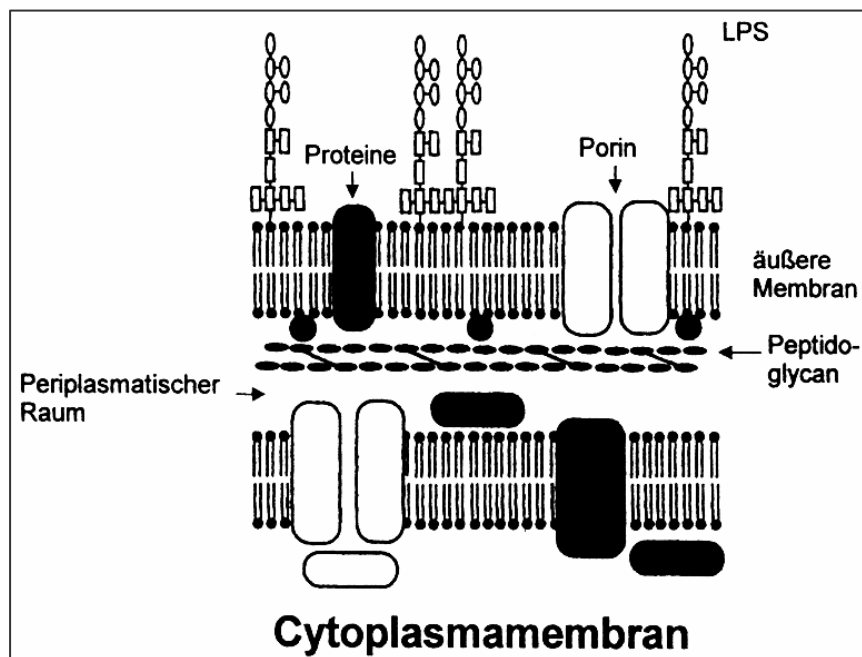


Abbildung 1.1 Modell des Zellwandaufbaus Gram-negativer Bakterien
(Schlegel)

1.2.2. Exo- oder Proteintoxine

Die so genannten Exotoxine werden aktiv von Bakterien in das sie umgebende Medium abgegeben. Diese auch Proteintoxine genannten Stoffe dienen der aktiven Schädigung oder auch Zerstörung der Wirtszellen. Dabei üben die Toxine spezifische Funktionen aus, indem sie etwa bestimmte Moleküle des Wirts modifizieren und ihn so schädigen. Die Exotoxine sind bereits in minimalen Dosierungen wirksam und gehören zu den biologisch produktivsten Substanzen.

Die Exotoxine gehören zu den Hauptvirulenzfaktoren (s. Kap. 1.1) der Bakterien. Aufgrund der Wirkung in Bezug auf Mechanismus und Wirkort lassen sich die Exotoxine weiter unterteilen in die Cytolysine und die Binären oder A/B-Toxine.

1.2.2.1. Binäre oder A/B-Toxine

Die Binären oder A/B-Toxine haben eine gemeinsame Grundeigenschaft: Sie verändern auf enzymatischen Weg ein Zielmolekül im Cytoplasma der Wirtszelle. Hierbei ist es zur Entfaltung der Funktion der Toxine grundlegend, dass sie die Plasmamembran der Wirtszelle passieren können. Von binären Peptiden spricht man, da die enzymatische und die rezeptorbindende Funktion bei diesen Toxinen auf unterschiedlichen Polypeptiden lokalisiert sind, wobei der enzymatische als A-, der rezeptorbindende als B-Teil bezeichnet wird. Bei den meisten Toxinen dieser Gruppe besitzt der B-Teil noch eine weitere Funktion: Er vermittelt den Transport der A-Komponente über die Membran.

Wie bei allen Exotoxinen, werden die A/B-Toxine vom Bakterium in das umgebende Medium abgegeben. Die A- und B-Komponente können hierbei frei voneinander, miteinander verbunden oder in verschiedenen anderen Verhältnissen zueinander vorliegen.

Verschiedene Beispiele veranschaulichen dies:

- Das Pseudomonas-Toxin A verfügt über A- und B-Teil, die auf einem einzigen Polypeptid liegen (Barth et al., 1998).
- Beim Diphtherie-Toxin existiert zunächst ein identisches Muster, jedoch wird es nach Bindung an den Zellrezeptor proteolytisch gespalten, wobei die beiden entstehenden Komponenten über eine Disulfidbrücke miteinander in Kontakt bleiben (Barth et al., 1998, Alouf & Freer, 1999).
- A- und B-Teil liegen voneinander unabhängig beim *E.coli*- und dem Cholera-Toxin vor. Der A-Teil besteht aus zwei unterschiedlichen, der B-Teil aus fünf identischen Untereinheiten (Barth et al., 1998, Alouf & Freer, 1999).
- Eine Bindeeinheit, die ihre Funktionsfähigkeit erst durch eine Vielzahl unterschiedlicher Untereinheiten erhält, ist beim Pertussis-Toxin gegeben. Bei diesem Toxin sind A- und B-Teil nicht über kovalente Bindungen verknüpft (Alouf & Freer, 1999).
- Beim C2-, Anthrax- und Iota-Toxin finden A- und B-Teil erst auf der Zelloberfläche des Wirts zusammen. Zuvor gelangen beide Untereinheiten vollkommen unabhängig voneinander vom Bakterium ins Medium (Alouf & Freer, 1999).
- Das C3-Toxin besitzt keine Bindekomponente. So kann das Toxin nur über den Weg der Pinocytose in die Wirtszelle gelangen. Charakteristisch für diese Form ist die geringe Toxizität (Barth et al., 1998).

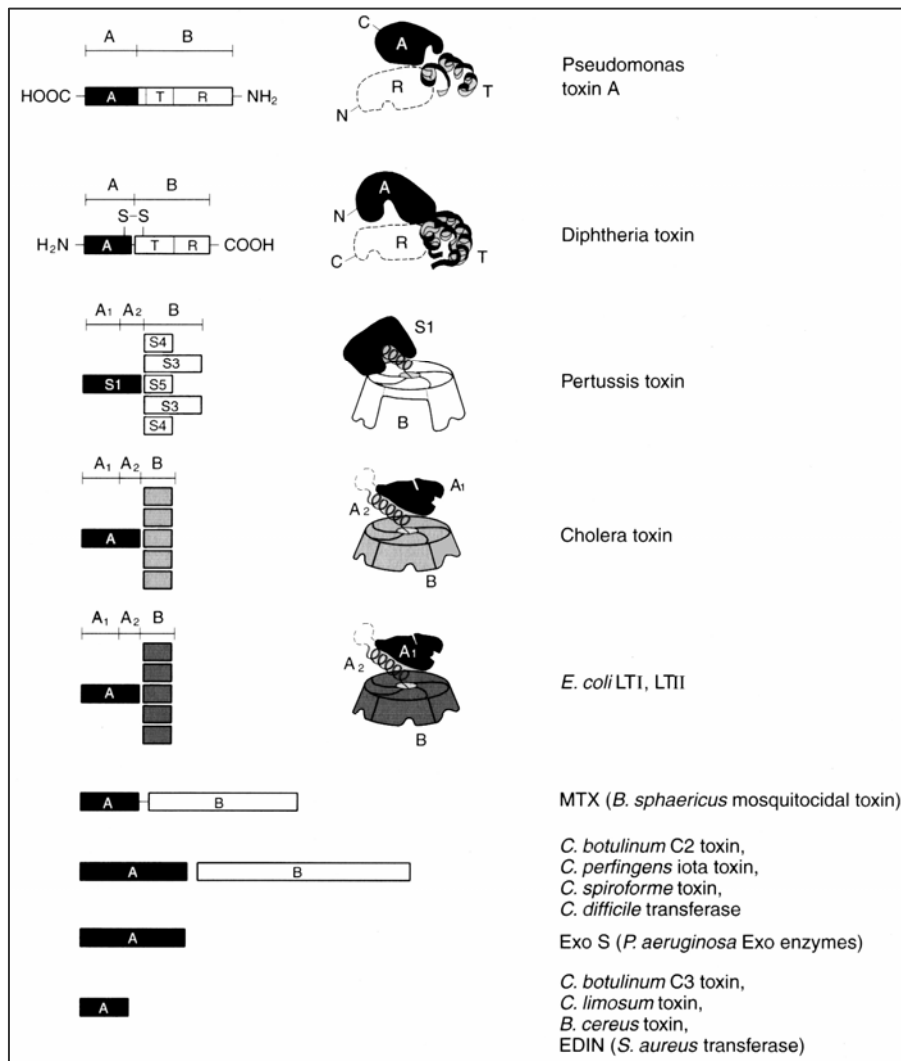


Abbildung 1.2: Strukturelle Organisation von bakteriellen A/B-Toxinen; die enzymatische Komponente ist schwarz gefärbt, die Transportdomäne (falls vorhanden) weiss. Sind kristallographische Daten vorhanden, wird die räumliche Struktur in der mittleren Spalte dargestellt (Alouf & Freer, 1999).

1.2.2.2. Cytolysine

Bei den Cytolysinen handelt es sich um virulente Faktoren vieler pathogener Bakterien, die den Zelltod herbeiführen, indem sie die Zellen durch osmotische Lyse schädigen. Es gibt drei Arten von Cytolysinen, die diesen Effekt hervorrufen können: Am bekanntesten und am besten untersucht sind Cytolysine, die Poren in der Zellmembran des Wirtes bilden (Ludwig & Goebel, 1999). Des Weiteren existieren enzymatisch aktive Cytolysine, die Membranlipide direkt angreifen. Chemisch handelt es sich hierbei um Phospholipasen. Ein bekanntes Beispiel ist das Alpha-Toxin von *C. perfringens*. Zuletzt existieren an der Oberfläche der Zellmembran aktive Cytolysine, die die Membranen einem Detergenz vergleichbar auflösen (Ludwig & Goebel, 1999).

Bei den porenbildenden Cytolysinen handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe von Exotoxinen. Unterschiedliche Familien von strukturell und funktional verwandten porenbildenden Cytolysinen wurden sowohl bei Gram-positiven als auch Gram-negativen Bakterien identifiziert. Gemeinsam ist all diesen Cytolysinen, dass sie geordnete transmembrane Proteinporen in der Membran des Wirts bilden (Bhakdi & Tranum-Jensen, 1987).

Porenbildende Cytolysine Gram-positiver Bakterien besitzen ein N-terminales Signalpeptid. Jedoch sind sie in der Regel von alleine aktiv und benötigen keinerlei zusätzliche Aktivierung. Im Gegensatz dazu sind die Cytolysine Gram-negativer Bakterien zunächst inaktive Toxine, die im weiteren Verlauf durch Modifikation oder proteolytische Vorgänge in aktive Toxine umgewandelt werden (Ludwig & Goebel, 1999). Das bekannteste porenbildende Toxin Gram-negativer Bakterien ist das *E. coli*- α -Hämolysin. Dieses ist wie alle Hämolysine dazu in der Lage, Erythrocyten zu lysieren. Bei der Sequenzanalyse fällt in diesem Hämolysin eine Repeat-Region auf, in der eine Einheit von neun Aminosäuren häufig wiederholt wird. Alle Hämolysine mit einer derartigen Region fasst man als RTX-Toxine zusammen (Ludwig & Goebel, 1999).

1.2.3. Epsilon-Toxin

Das Epsilon-Toxin wird von den Subtypen B und D von *C. perfringens* gebildet (s. auch Tabelle 1). Für Typ D ist das Epsilon-Toxin der Hauptvirulenzfaktor, der für Enterotoxämien bei Haustieren wie Schafen, Ziegen, seltener Rindern und noch seltener beim Menschen führt (s. auch 1.2). Weltweit sind die Enterotoxämien für große Verluste in der Landwirtschaft verantwortlich (Petit et al., 2000). Das vermehrte Auftreten von Epsilon-Toxin bei Tieren geht mit der Verbreitung des Toxins über den Blutkreislauf einher, die von den Mucosa-Zellen im Magen-Darm-Trakt ausgeht (Smedley et al., 2004). So gelangt das Toxin in alle Organe des Wirts. Hier verursacht Epsilon-Toxin die Bildung von Ödemen (Cole et al., 2004). In Tierexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass das Epsilon-Toxin den Blutdruck und die vaskuläre Permeabilität erhöht, sowie Ödeme und Verstopfungen in verschiedenen Organen, etwa Lunge und Nieren, verursacht. Auch eine Nekrose der Nieren konnte bei Lämmern beobachtet werden, die an Enterotoxämie gestorben waren (Nagahama et al., 1993, Sakurai et al., 1983). Das Epsilon-Toxin ist zudem dazu in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und sich im Gehirn anzusammeln (Nagahama & Sakurai, 1992, Nagahama & Sakurai, 1991). Die letzte Phase der Enterotoxämie ist durch neurologische Fehlfunktionen charakterisiert. Für diese ist vermutlich die durch das Epsilon-Toxin verursachte Erhöhung der Permeabilität der Hirn-Vaskulatur, die zu perivaskulären Ödemen führt (Finnie et al., 1999). Außerdem kann das Epsilon-Toxin direkt mit Neuronen des Hippocampus interagieren, was zu einer weitreichenden Ausschüttung von Glutamat führt (Miyamoto et al., 2000).

Das Epsilon-Toxin wird als relativ inaktives Protoxin synthetisiert, das erst nach Abspaltung von 11-13 Aminosäuren am N-terminalen und 22-29 Aminosäuren am C-terminalen Ende, abhängig von der Protease (etwa λ -Protease von *C. perfringens*, Trypsin oder α -Chymotrypsin), aktiviert wird (Borrmann et al., 2001). So verursacht beispielsweise die Aktivierung durch Trypsin die Abspaltung von 13 N-terminalen und 22 C-terminalen Aminosäuren, während die λ -Protease von *C. perfringens* 11 N-terminale und 29 C-terminale Aminosäuren abspaltet (Minami et al., 1997).

Die kristalline Struktur des wasserlöslichen Epsilon-Toxins zeigt strukturelle Ähnlichkeit zur Struktur des Aerolysin von *Aeromonas hydrophila* (Cole et al., 2004).

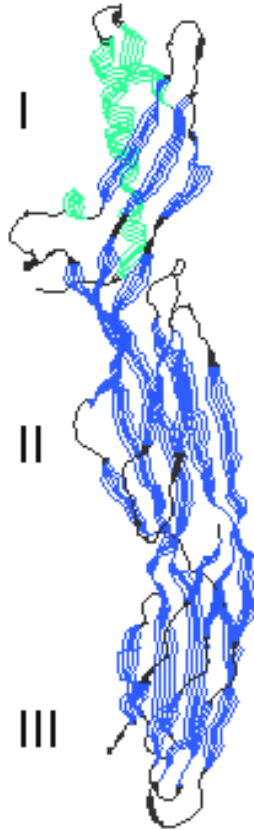


Abbildung 1.3: Kristallstruktur des Epsilon-Toxin

Domäne I: α -Helix

Domäne II: β -Faltblatt

Domäne III: β -Faltblatt

Das Epsilon-Toxin gehört wahrscheinlich zu den Cytolysinen und erkennt die Wirtszelle an Sialoglycoproteinen. Dieser Rezeptor kommt nicht bei allen Zellen vor, so dass lediglich bestimmte Zellen von dem Toxin befallen werden können. So ist das Epsilon-Toxin cytotoxisch für die MDCK (Madin-Darby canin kidney) –Zellen (Shortt et al., 2000). Das Epsilon-Toxin dringt hierbei nicht in das Cytosol der Zelle vor, sondern bildet einen Membrankomplex mit einem Molekulargewicht von 155 kDa. Die Toxizität des Toxins ist direkt mit der Komplexbildung und dem Ausfluss von intrazellulärem Kalium assoziiert (Petit et al., 1997). Dies führt zunächst zum Anschwellen und schließlich zur Lyse der Zelle. Dabei geht der intrazelluläre Abfall des Kaliums einher mit einem schnellen Einstrom von Chlorid- und Natrium-Ionen sowie einem langsameren Anstieg der Konzentration von Kalium-Ionen. Das Eindringen von Propidium Iodid in die Zellen weist darauf hin, dass das Epsilon-Toxin große Membranporen bildet. Versuche mit künstlichen Lipid-Bilayern zeigen, dass Epsilon-Toxin die Bildung von wenig selektiven Diffusionskanälen verursacht, die für hydrophile Lösungen von einer Molekulargröße bis zu 1 kDa durchlässig sind. Dabei lassen die Kanäle bevorzugt Anionen passieren, doch auch Kationen können die Kanäle durchqueren (Petit et al., 2000).

Das Ziel dieser Arbeit ist herauszufinden, welcher Teil des Epsilon-Toxins für die Kanalbildung verantwortlich ist, um somit eine kanalbildende Domäne definieren zu können. Bei verwandten Toxinen, wie Iota b oder C2II, ist der Bereich, der für die Kanalbildung verantwortlich ist, bekannt. Daher konnte ich durch Alignments mit Iota b oder C2II den Bereich im Epsilon-Toxin vermuten, der hier für die Kanalbildung zuständig ist.

328	H	T	S	E	V	H	G	N	A	E	V	H	ASF	F	D	I	G	G	S	V	S	A	G	F	353
302	N	T	V	G	A	E	V	S	S	G	L	Q	LAGGIFPV	F	S	M	S	A	S	A	N	Y	S	H	332
334	N	T	V	G	V	S	I	S	A	G	Y	Q	NG	F	T	G	N	I	T	T	S	Y	S	H	358
338	N	S	E	G	A	S	I	E	A	G	F	P	KG	F	S	F	G	V	S	A	N	Y	Q	H	363
151	H	T	V	G	T	S	I	Q	A	T	A	K	FTVVPF	N	E	T	G	V	S	L	T	T	S	Y	180

Abbildung 1.4: Primärsequenz der putativen amphipatischen Faltblätter in den Bindekomponenten vom „protective antigen“ (*Bacillus anthracis*, PA, 1. Zeile (Petrosa et al., 1997)), vom C2-Toxin (*Clostridium botulinum*, C2II, 2. Zeile (Kimura et al., 1998)), vom Iota-Toxin (*Clostridium perfringens*, Ib, 3. Zeile (Perelle et al., 1993)), vom Vip-Toxin (*Bacillus thuringiensis*, Vip1, 4. Zeile (Leppla et al., 1998)) und dem Epsilon-Toxin (*Clostridium perfringens*, 5. Zeile). Im Mittel überwiegend hydrophobe Aminosäuren sind rot und im Mittel überwiegend hydrophile sind blau gekennzeichnet.

Um diese These erhärten zu können, wurden in dieser Arbeit vier Epsilon-Toxin Mutanten untersucht, bei denen in dieser potentiellen Porendomäne Punktmutationen eingefügt worden sind.

Diese werden Epsilon-Toxin 700, 701, 702 und 703 genannt:

- Epsilon-Toxin 700 hat anstatt Serin 156 ein Glutamat
- Epsilon-Toxin 701 anstatt Lysin 162 ein Glutamat
- Epsilon-Toxin 702 anstatt Threonin 175 ein Cystein
- Epsilon-Toxin 703 anstatt Serin 156 ein Cystein

2. Material und Methoden

2.1. Abkürzungen

A	Ampere
Da	Dalton
Diph-PC	Diphytanoyl-Phosphatidylcholin
C.perfringens	Clostridium perfringens
f	Frequenz
g	Gramm
h	Stunde
k	Kilo
K	Halbsättigungskonzentration
l	Liter
m	Meter
m (als Vorsatz)	Mili
M	Molar
μ	Mikro
min	Minute
mol	mol
MDCK	Madin-Darby canine kidne
n	Nano
p	Pico
S	Siemens
s	Sekunde
T	Zeit
V	Volt

2.2. Chemikalien

Firma Avanti Polar Lipids

Diph-PC

Firma Merck

Kaliumchlorid

Natriumchlorid

Salzsäure (5M)

Firma Sigma

Hepes

Lithiumchlorid

Firma Applichem

Kaliumacetat

Pasteur Institut (Dr. Michel-Robert Popoff)

Epsilon-Toxin Wildtyp und Mutanten

2.3. Geräte

Ablesefernrohr	Spindler und Hoyer
Elektroden	Metrohm
Elektrometer	Keithley
Feinwaage	Sartorius
Grobwaage	Kern
Küvetten	institutseigene Werkstatt
Magnetrührer	IKA Labortechnik
schwingungsgedämpfter Messtisch	Spindler&Hoyer TMC
Mikroskop	Litz
Mikromanipulator	LN Luigs und Neumann
Mikroskop-Leuchte	Carl-Zeiss
pH-Meter	WTW-pH 523
Pipetus	Hirschmann
Spannungsquelle (Bilayer)	institutseigene Werkstatt
Steuerungseinheit, LM EPC-7	List Medical, Darmstadt
Streifenschreiber	Rikadenki
Vertikalziehgerät L/M-3P-A	List-Medical
Zentrifugen	Heraeus

Einwegmaterialien:

Die verwendeten Einwegmaterialien stammen von den Firmen Falcon und Greiner/Sarsted, sowie von Eppendorf/Hamburg.

2.4. Biophysikalische Methoden

2.4.1. Bilayer-Messungen

Die Rekonstitution von porenbildenden Proteinen in künstlichen Lipidmembranen, den so genannten „black lipid membranes“, ermöglicht es, im Einzelkanalexperiment die Leitfähigkeit der verschiedenen Poren zu bestimmen und im Vielkanalexperiment Messungen der Stoffbindung durchzuführen.

2.4.1.1. Aufbau der Versuchsapparatur

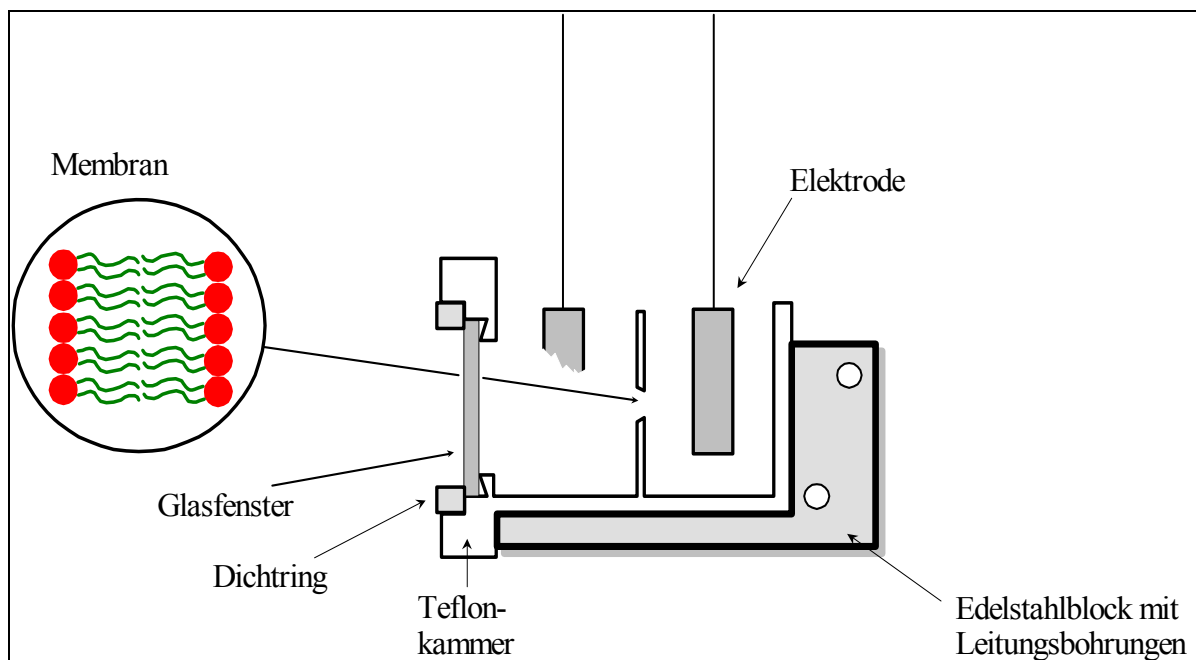


Abbildung 2.1: Die Teflonküvette

Der Mittelpunkt der Apparatur ist eine Teflonküvette (Abb. 2.1). Sie ist durch eine schräggehende Wand in zwei gleichgroße Kompartimente (aktives Volumen des Kompartiments ca. 5 ml) unterteilt, die über eine kleine Bohrung in der Wand verbunden sind. Über diese Öffnung wird die Membran gespreitet. Die Teflonküvette ist eingebettet in einen Edelstahlblock, der sich in einem Metallgehäuse (Faraday'scher

Käfig), befindet. Das Gehäuse wird durch zwei Türen verschlossen, wodurch äußere Einflüsse ausgeschlossen werden können.

Durch eine Öffnung im Metallgehäuse kann mit Hilfe eines Fernrohrs und einer Mikroskopleuchte die über die Öffnung in der Küvette gespreitete Membran beobachtet werden. Das Gehäuse steht auf einer schwingungsgedämpften Steinplatte. Dadurch werden Vibrationen, die die empfindliche Messung eventuell stören könnten, vermieden.

In den beiden Kompartimenten befinden sich Rührfische, die als Antrieb einen Magnetrührer besitzen. Über der künstlichen Membran wird mittels zweier Kalomelelektroden, die in die Lösung eingetaucht sind, eine Spannung angelegt. Die Spannungsquelle befindet sich an der Außenseite des Gehäuses und ist mit einer Elektrode verbunden. Die andere Elektrode ist an einen Verstärker angeschlossen, der gleichzeitig als Strom-Spannungswandler fungiert. Das Signal wird an einen Streifenschreiber weitergegeben.

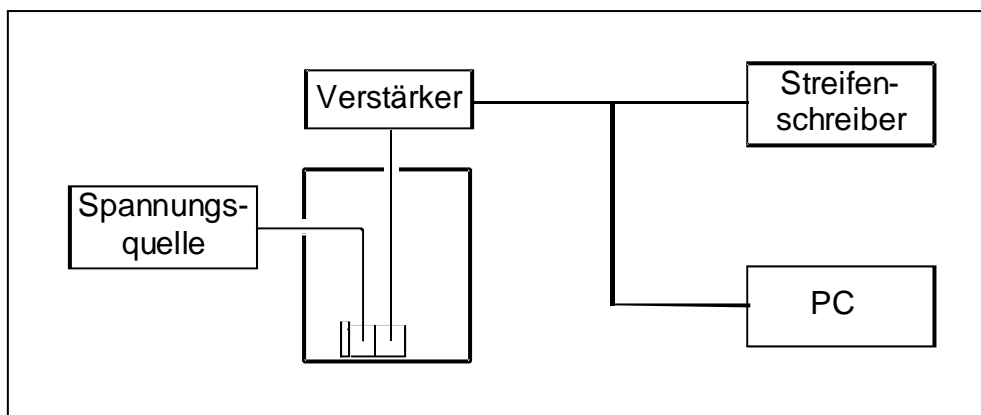


Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau der Versuchsanordnung

2.4.1.2. Herstellung von künstlichen Lipidmembranen zur Rekonstitution von Poren (nach Benz et al., 1978)

Vor einer Messung wird die Kammer mit Ethanol gereinigt und dann getrocknet. Über das Loch in der Trennwand wird nun die künstliche Membran gespreitet. Als Lipid wird Diphytanoyl Phosphatidylcholin (DiphPC) verwendet. Zuerst wird der Rand des Lochs mit wenigen μl einer 2%igen DiphPC-Lösung (in Chloroform) präpariert.

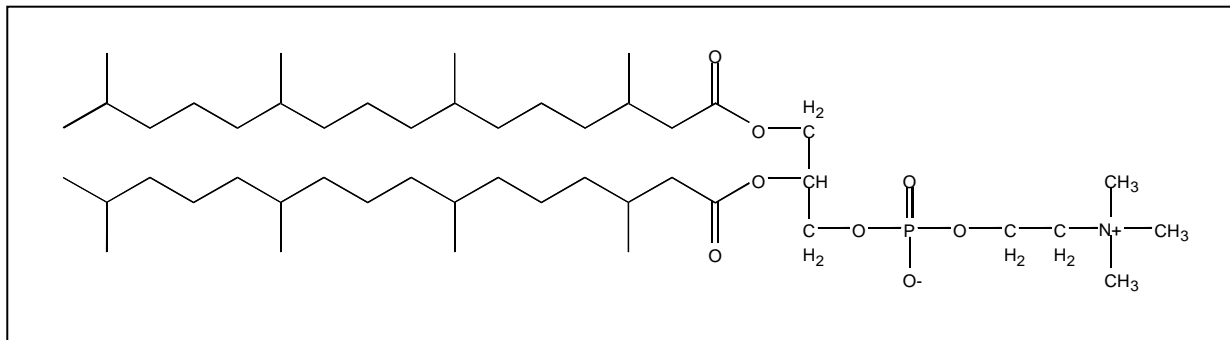


Abbildung 2.3: Strukturformel von (DiphPC)

Nachdem das Lösungsmittel verdunstet ist, werden beide Kompartimente mit je 5 ml Elektrolytlösung gefüllt. Rührfische werden zugegeben, die Küvette in den Messblock geschoben und die Elektroden in die Lösung getaucht.

Durch das Fernrohr wird das Membranziehen beobachtet. Dies geschieht mit Hilfe eines mit Teflon überzogenen Silberdrahtes auf den 5 μl einer 1% DiphPC-Lösung (in n-Dekan mit 10 % Butanol) gegeben werden. Mit dem dreieckig gebogenen Draht wird über die Bohrung in der Trennwand gestrichen, bis sich eine Membran über dem Loch ausgebildet hat. Die Membran erscheint zunächst schillernd in den Newton'schen Farben. Auslöschung von Licht verschiedener Wellenlängen durch Gangunterschiede des Lichts nach Reflexion an der Vorder- und Rückseite der Lipidlamelle sind hierfür die Ursache. Nach einiger Zeit kann man beobachten, wie die Membran schwarz wird. Überflüssiges Lipid läuft an den Rändern ab, bis eine bimolekulare Schicht übrig bleibt. Die Schwarzfärbung ist darauf zurückzuführen, dass der Gangunterschied des Lichts, welches am optisch dünneren (Elektrolytlösung) und am optisch dichteren (Membran) Medium gebrochen wird, $\lambda/2$ beträgt. Dies führt zur Auslöschung des Lichts.

Nachdem die Membran schwarz geworden ist, werden in die Kammern einige μl der Proteinlösung pipettiert. Aufgrund ihrer hydrophoben Bereiche bauen diese spontan in die Membran ein.

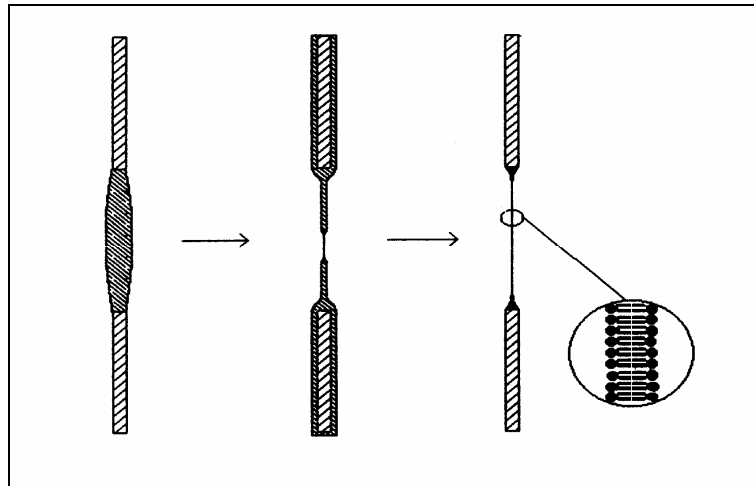


Abbildung 2.4: Entstehung der bimolekularen Lipidschicht.

2.4.1.3. Einzelkanalleitfähigkeitsmessung

Im Folgenden wird kurz auf das Prinzip der Messung an rekonstituierten Poren eingegangen. Über der Membran wird eine Spannung von 50 mV angelegt. Die Membran selbst wirkt als Isolator. In Abwesenheit von porenbildenden Proteinen ist ein Stromfluss praktisch nicht messbar. Wird nun eine bestimmte Menge an Protein zugegeben, kann der Einbau einzelner Poren sichtbar gemacht werden.

Jeder Einbau einer Pore bewirkt einen sprunghaften Anstieg in der Leitfähigkeit, denn durch sie fließt ein Strom, der nach entsprechender Verstärkung (z.B. 10^9V/A) auf dem Streifenschreiber oder Oszilloskop sichtbar gemacht werden kann. Die Träger des Stroms sind die Ionen der Elektrolytlösung. Die zugegebene Proteinmenge wird so dosiert, dass eine zeitliche Auflösung der Einsprungergebnisse möglich ist.

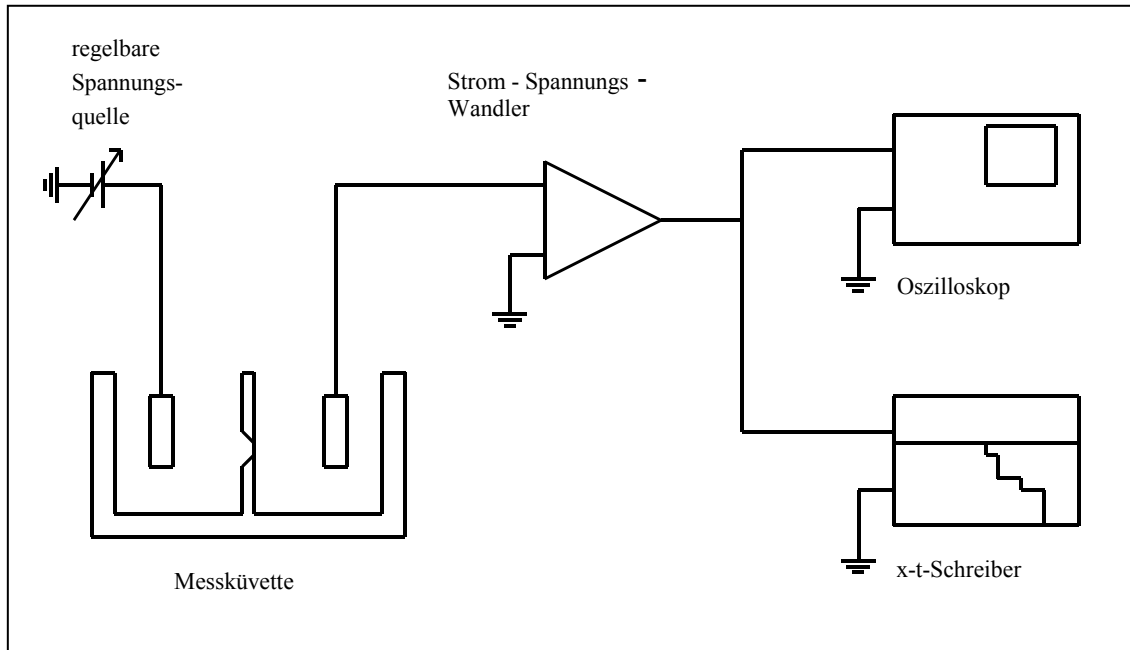


Abbildung 2.5: Schaltungsordnung zur Einzelkanalmessung

Durch die statische Auswertung dieser Einsprungereignisse kann die durchschnittliche Einzelkanalleitfähigkeit einer Pore ermittelt werden. Zu diesem Zwecke werden zwischen 50 und 100 Poren ausgewertet. Dies geschieht durch Erstellen eines Histogramms, indem man die Häufigkeit der Leitfähigkeitsamplitude gegen die Leitfähigkeit aufträgt. Sofern die Streuung nicht allzu groß ist, wird der am häufigsten auftretende Leitfähigkeitswert als Einzelkanalleitfähigkeit definiert. Da mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit zwei oder mehr Poren gleichzeitig einbauen können, entstehen Peaks, die den doppelten oder mehrfachen Leitfähigkeitswert aufweisen. Aus der Höhe der Schreiberausschläge und den entsprechend eingestellten Parametern kann man die Leitfähigkeit der Poren berechnen.

$$(1) \quad G = \frac{I}{U_e} \quad \text{wobei} \quad G = \text{Leitfähigkeit (S)}$$

$I = \text{Strom (A)}$

$U_e = \text{angelegte Spannung (V)}$

Der Strom I wird verstärkt und in eine Spannung umgewandelt. Diese Spannung U_a ist dem Strom I proportional. Proportionalitätsfaktor ist der Verstärkungsfaktor V_f (V/A).

Für den Strom I gilt:

$$(2) \quad I = \frac{U_a}{V_f} \quad \text{wobei: } U_a = \text{Ausgangsspannung (V)}$$

$$U_f = \text{Verstärkungsfaktor}$$

Einsetzen (2) in (1):

$$(3) \quad G = \frac{U_a}{V_f \cdot U_e}$$

Aus praktischen Gründen bezieht man die Ausgangsspannung U_a , die am Schreiber anliegt, auf das Raster des Schreiberpapiers. Das Papier ist in 100 Kästchen eingeteilt, die Spannung pro Kästchen ergibt sich aus der am Schreiber eingestellten Spannung bei Vollausschlag U_v geteilt durch 100. Durch einsetzen von U_v für U_a in Gleichung (3) erhält man die Leitfähigkeit pro Kästchen G_k .

$$(4) \quad G_k = \frac{U_v}{V_f \cdot U_e \cdot 100} \quad \text{wobei} \quad G_k = \text{Leitfähigkeit pro Kästchen (S)}$$

$$U_v = \text{Schreibervollausschlag (V)}$$

Durch Abzählen der Kästchen, die einen Schreiberausschlag ergeben, und Multiplikation mit G_k wird die Leitfähigkeit ermittelt.

2.4.1.4. Spannungsabhängigkeit

Viele porenbildende Proteine zeigen ein spannungsabhängiges Schließen der von ihnen gebildeten Kanäle, d.h. beim Überschreiten einer bestimmten angelegten Spannung nimmt die Leitfähigkeit ab. Dieser Schließvorgang erfolgt nicht nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip, sondern vielmehr über Zwischenschritte.

Der Schließmechanismus beruht auf Konformationsänderungen geladener Gruppen im Protein. Der Versuchsaufbau entspricht dem der Einzelkanalleitfähigkeitsmessung.

Nach dem Einbau von ca. 20 Poren wird die Spannung abgeschaltet und der Schreiberstift auf Papiermitte justiert. Anschließend wird die Spannung in +/-mV Schritten bis maximal 150mV erhöht. Die Höhe des Schreiberausschlages nach Anlegen der Spannung entspricht der Summe der Einzelkanalleitfähigkeit der offenen Kanäle. Sind diese spannungsabhängig, wird der Schreiberausschlag, aufgrund der sich schließenden Poren, zurückgehen.

Die Spannung bleibt so lange angelegt bis kein Rückgang der Leitfähigkeit mehr zu beobachten ist. Dieser Wert wird als G bezeichnet. Der Leitfähigkeitswert zu Anfang heißt G_0 . Lässt man die Poren nur von einer Seite in die Membran einbauen, so kann untersucht werden, ob die Poren asymmetrisch sind. Von Asymmetrie spricht man, wenn je nach Richtung der angelegten Spannung unterschiedliche Ergebnisse bezüglich Spannungsabhängigkeit und Leitfähigkeit erzielt werden.

Zur Auswertung wird das Verhältnis der Leitfähigkeit G bei einer angelegten Spannung V_m zur ursprünglichen Leitfähigkeit G_0 gegen die angelegte Spannung V_m aufgetragen. Auf diese Weise ergeben sich Glockenkurven der Spannungsabhängigkeit.

2.4.1.5. Selektivitätsmessung

Wie schnell ein Ion durch ein Proteinkanal permeieren kann, hängt neben der Ladung und der Größe der Hydrathülle eines Ions auch von der Ladungsverteilung im Inneren und an der Außenseite des Kanals ab.

Ein Kanal mit positiven Oberflächenladungen wäre somit anionenselektiv.

Zur Bestimmung der Selektivität wird über einer Membran mit mehr als 100 eingebauten Poren ein Salz-Konzentrationsgradient erzeugt. Die Ionensorte, für die der Kanal selektiv ist, wandert bevorzugt zur weniger konzentrierten Seite der Membran, um den Konzentrationsgradient ausgleichen. Dadurch entsteht eine Potentialdifferenz, die dem Konzentrationsgradienten entgegenwirkt. Es stellt sich ein Gleichgewicht im elektro-chemischen Potential ein.

Die Selektivitätsbestimmung wird mit 3 M und 0,1 M Elektrolytlösung (KCl, LiCl und KCH_3COO) durchgeführt. Die beiden Kompartimente der präparierten Teflonküvette

werden mit je 5 μl der entsprechenden 0,1 M Salzlösung befüllt und einige μl der Probe sowohl in das hintere als auch in das vordere Kompartiment gegeben. Der Einbau kann an dem steigenden Stromfluss (Elektrometer) beobachtet werden. Nach dem Einbau von etwa 100 Poren wird das Elektrometer von Strom- auf Spannungsmessung umgestellt und die Spannung abgeschaltet. Der erforderliche Gradient wird erzeugt, indem gleichzeitig in das vordere Kompartiment 100 μl einer 3 M und in das hintere Kompartiment 100 μl einer 0,1 M Elektrolytlösung gegeben werden. Nach einigen Minuten stellt sich das Gleichgewicht im elektro-chemischen Potential ein, die entstandene Spannung wird abgelesen und die nächste Zugabe durchgeführt. Wird die abgelesene Spannung positiver, handelt es sich um einen kationenselektiven Kanal, wird sie negativer liegt ein anionenselektiver Kanal vor.

Mit Hilfe der Goldman-Hodgin-Katz-Gleichung wird bei gegebenem Konzentrationsgradient und gemessener Spannung das Permeabilitätsverhalten der Ionen P_c/P_a berechnet:

$$V_m = (RT/F) \cdot \ln((P_c c'' + P_a c') / (P_c c' + P_a c''))$$

V_m = Membranpotential

R = allgemeine Gaskonstante (8,31 J/mol*K)

T = Temperatur [K]

F = Faradaykonstante (96500 As/mol)

P_c = Permeabilitätskoeffizient des Kations

P_a = Permeabilitätskoeffizient des Anions

c' = Salzkonzentration auf einer Seite der Membran

c'' = Salzkonzentration auf der anderen Seite der Membran

$c'' > c'$

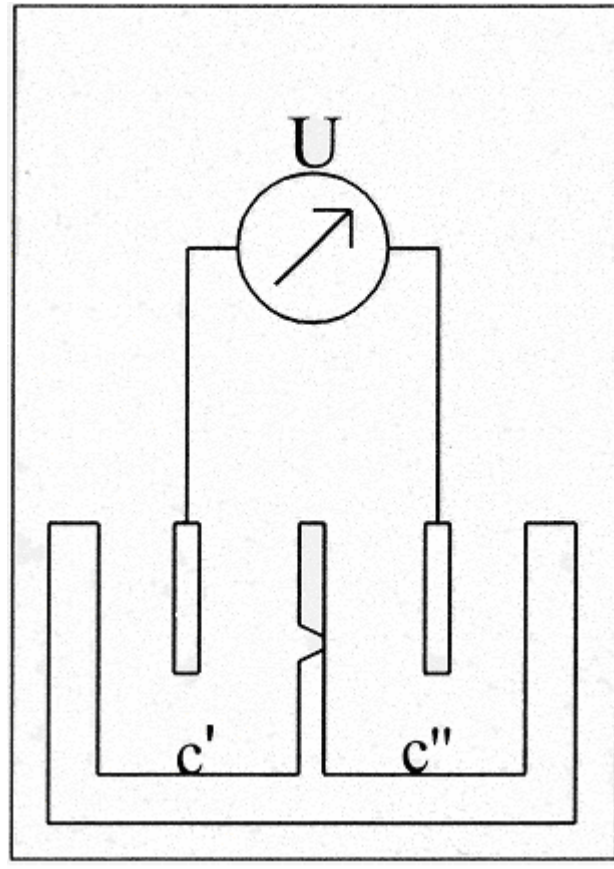


Abbildung 2.6: Schaltbild der Messapparatur für Selektivitätsmessung

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der Einzelkanalmessungen

Die Einzelkanalleitfähigkeit der Poren des Epsilon-Toxins wird durch Bilayer-Experimente ermittelt. Die Messungen werden nach der in Kapitel „Material und Methoden“ beschriebenen Methode durchgeführt.

Legt man über eine undotierte Membran eine Spannung an, so fließt ein nur kaum messbarer Strom. Der an der Messapparatur angeschlossene Streifenschreiber zeigt dabei keinen Ausschlag. Erst durch den Einbau von Poren wird die Membran für Ionen passierbar und dadurch ein Strom messbar.



Abbildung 3.1: 3D-Struktur des Alpha-Toxins von *Staphylococcus aureus*. Der Komplex wird aus sieben Toxin-Monomeren gebildet. Der aus β -Faltblättern gebildete Stiel der Pilz-ähnlichen Struktur ist Teil der heptameren Struktur, die in die Membran der Zielzelle inseriert (aus Song L. et al., 1996). Es wird angenommen, dass die Struktur des α -Toxin Heptamers dem des Epsilon-Toxins entspricht.

Die Einsprungereignisse sind als treppenartiger Anstieg der Leitfähigkeit erkennbar. Stromfluss und Einbau der Poren sind bei geeigneter Wahl der Verstärkung gut auflösbar und vom Streifenschreiber aufzeichnbar.

Um verlässliche Messwerte zu erhalten, wird das Experiment mehrmals wiederholt. Auf diese Weise lassen sich letztendlich zwischen 50 und 100 Poren auswerten.

Die Auswertung erfolgt durch Bestimmung der Anzahl der Einsprungereignisse und deren Leitfähigkeitswerte. So können die ermittelten Daten graphisch als Blockdiagramm dargestellt werden. Die am häufigsten auftretende Porenleitfähigkeit wird als die Einzelkanalleitfähigkeit der einzelnen Pore bezüglich eines Elektrolyten definiert.

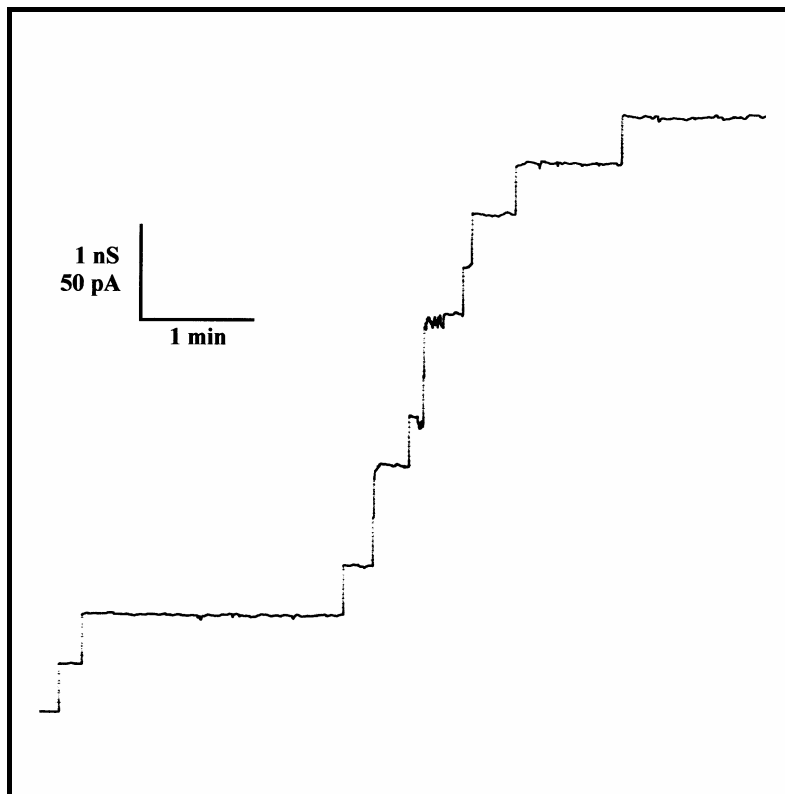


Abbildung 3.2: Poreneinsprünge von Epsilon Toxin 701 in die künstliche Bilayermembran, aufgezeichnet durch einen Streifenschreiber. Elektrolyt: 1M KCl; Spannung 50 mV; Membran aus 1% DiphPC in n-Dekan; T=25°C

3.1.1. Einzelkanalmessungen des Wildtyps

In einer 1M KCl-Lösung beträgt die am häufigsten auftretende Leitfähigkeit 520 pS. Man beobachtet, dass 50,7 % der Poren im Leitfähigkeitsbereich von 500-600 pS liegen. Bildet man den Mittelwert aller ermittelten Poren, erhält man eine Leitfähigkeit von 450 pS.

Des Weiteren können durch Messen der Leitfähigkeiten in unterschiedlichen KCl-Konzentrationen (30mM bis 3M) Informationen über Wechselwirkungen zwischen dem Kanal und den in der Lösung befindlichen Ionen gewonnen werden.

Liegt eine lineare Abhängigkeit zwischen der Leitfähigkeit und der Konzentration vor, so findet keine Wechselwirkung statt. Liegt eine Abweichung der Linearität vor, so kann man auf eine Punktladung am Kanalmund oder im Falle einer Sättigung der Einzelkanalleitfähigkeit auf eine Bindestelle für ein Ion in einer Pore schließen.

Eine solche Bindestelle für Chloridionen wurde aufgrund einer Sättigung der Einzelkanalleitfähigkeit mit steigenden Salzkonzentrationen für das Protein P von *Pseudomonas aeruginosa* postuliert (Benz and Hancock, 1987).

Die Einzelkanalleitfähigkeiten der Bindekomponenten wurde bei Konzentrationen von 0,03 M, 0,1M, 0,3M, 1M und 3M KCl gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Aus dem Betrachten der Werte ist zu erkennen, dass eine lineare Abnahme der Leitfähigkeit mit der Abnahme der Elektrolyt-Konzentration vorliegt. Es liegt somit keine Ladung am Kanalmund vor.

Konzentration (M)	Leitfähigkeit (pS)
0,03	15
0,1	60
0,3	160
1,0	550
3,0	1700

Tabelle 3: Einzelkanalleitfähigkeit des Epsilon-Toxins in unterschiedlichen KCl-Konzentrationen; Spannung = 50mV; T = 20°C

3.1.2. Einzelkanalmessungen der Mutanten

3.1.2.1. Einzelkanalmessungen des Epsilon-Toxins 700

Die Einzelkanalleitfähigkeits-Messung in 1M KCl ergab folgendes Diagramm:

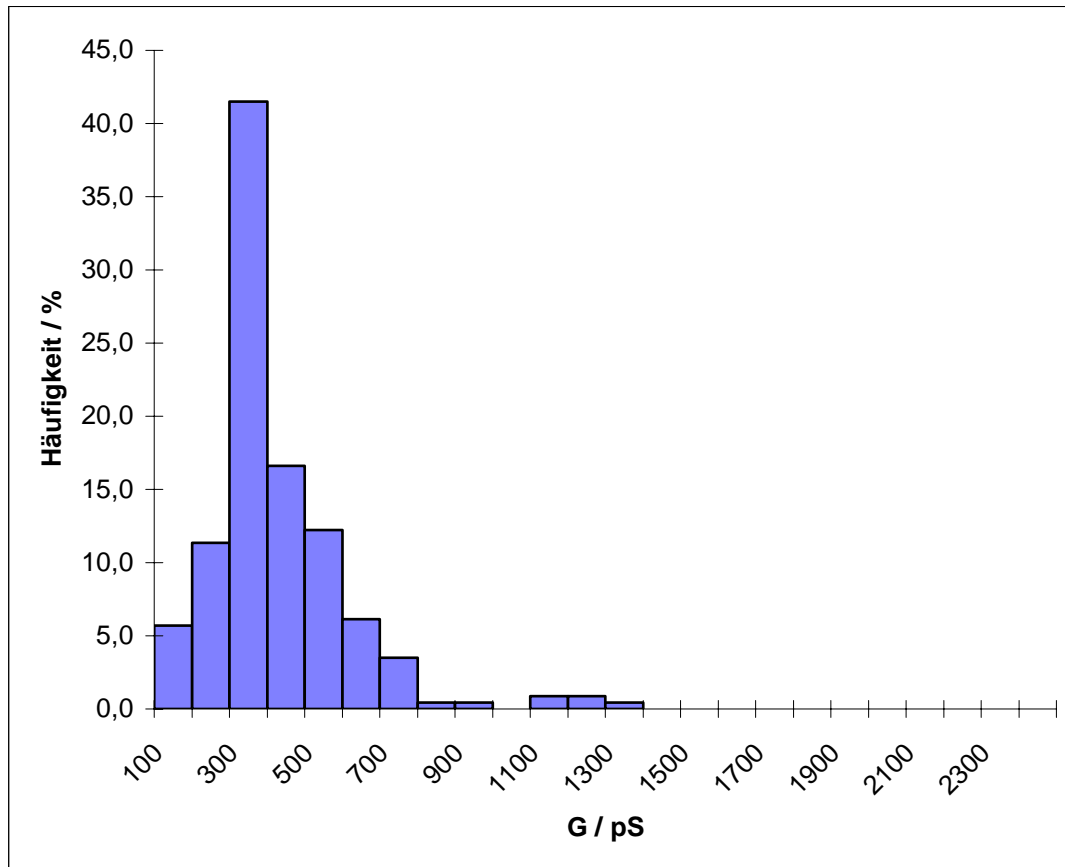


Abbildung 3.3: Statistische Auswertung der Einzelkanalleitfähigkeit des Epsilon-Toxin 700, gemessen in 1M KCl. Angelegte Spannung = 50 mV; Lipid 1% DiphPC in n-Dekan; T = 25°C

In einer 1 M KCl-Lösung beträgt die am häufigsten auftretende Leitfähigkeit 300 pS. Der Mittelwert beträgt 375 pS und weicht damit kaum vom häufigsten Wert ab.

Weitere ermittelte Daten für verschiedene Konzentrationen von KCl:

Konzentration	Häufigster Wert [pS]	Mittelwert [pS]
0,1 M KCl	10	26
0,3 M KCl	80	100
1 M KCl	300	380
3 M KCl	1400	1200
1 M LiCl	160	190
1 M KAc	160	220

Tabelle 4: Einzelkanalleitfähigkeit des Epsilon-Toxin 700 in unterschiedlichen Konzentrationen; Spannung =50mV;Lipid=1% DiphPC in n-Dekan;T=25°C

3.1.2.2. Einzelkanalmessungen des Epsilon-Toxins 701

Die Einzelkanalleitfähigkeits-Messung in 1M KCl ergab folgendes Diagramm:

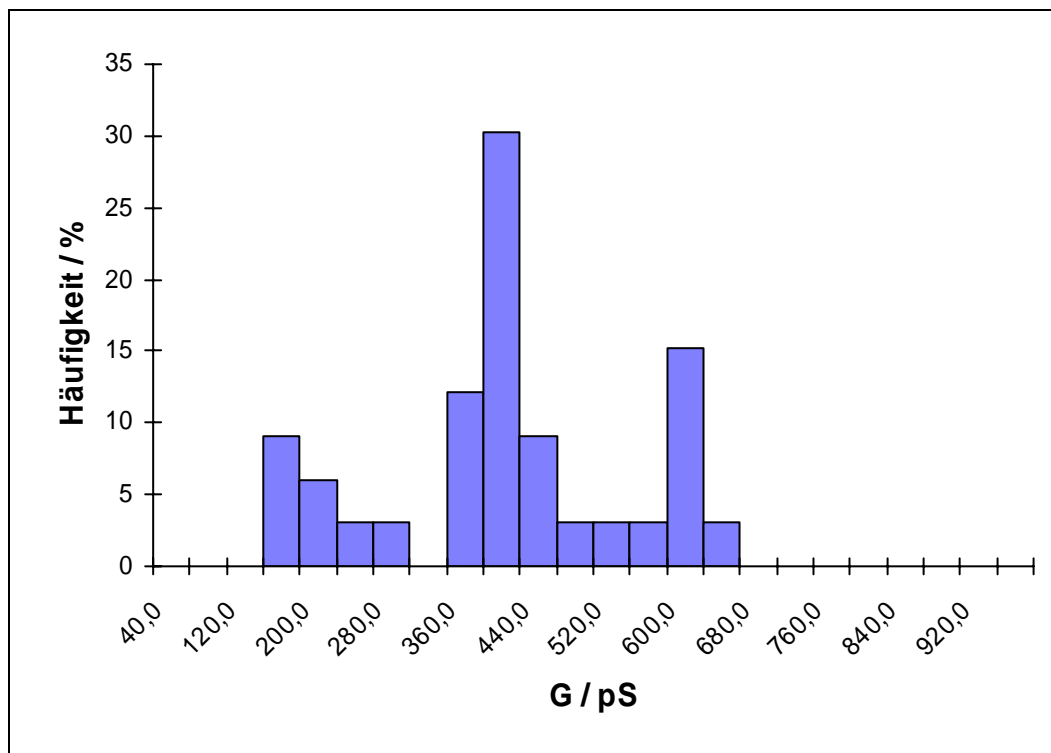


Abbildung 3.4: Statistische Auswertung der Einzelkanalleitfähigkeit des Epsilon-Toxins 701, gemessen in 1M KCl. Angelegte Spannung = 50 mV; Lipid 1% DiphPC n-Dekan; T = 25°C

In einer 1 M KCl-Lösung beträgt die am häufigsten auftretende Leitfähigkeit 400 pS
Der Mittelwert beträgt 405 pS.

Des Weiteren ergaben sich folgende Werte:

Konzentration	Häufigster Wert [pS]	Mittelwert [pS]
0,1 M KCl	40	69
0,3 M KCl	140	170
1 M KCl	400	400
3 M KCl	1500	1520
3 M LiCl	900	970
3 M KAc	800	780

Tabelle 5: Einzelkanalleitfähigkeit des Epsilon-Toxins 701 in unterschiedlichen Konzentrationen; Spannung =50mV;Lipid=1% DiphPC in n-Dekan;T=25°C

3.1.2.3. Einzelkanalmessungen des Epsilon-Toxins 702

Die Einzelkanalleitfähigkeits-Messung in 1M KCl ergab folgendes Diagramm:

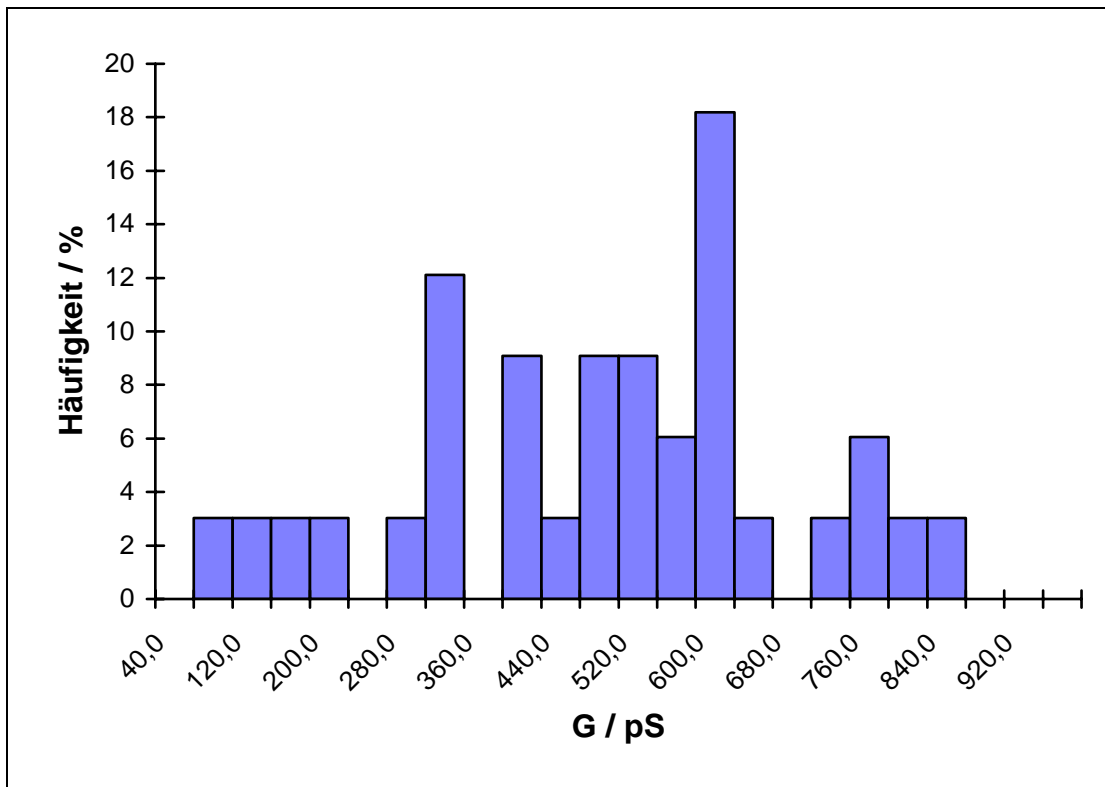


Abbildung 3.5: Statistische Auswertung der Einzelkanalleitfähigkeit des Epsilon-Toxins 702, gemessen in 1M KCl. Angelegte Spannung = 50 mV; Lipid 1% DiphPC in n-Dekan; T = 25°C

In einer 1 M KCl-Lösung beträgt die am häufigsten auftretende Leitfähigkeit 600 pS. Der Mittelwert beträgt 485pS.

Des Weiteren ergaben sich folgende Werte:

Konzentration	Häufigster Wert [pS]	Mittelwert [pS]
0,1 M KCl	40	60
0,3 M KCl	160	210
1 M KCl	600	485
3 M KCl	1800	1320
1 M LiCl	880	635
1 M KAc	400	600

Tabelle 6: Einzelkanalleitfähigkeit des Epsilon-Toxins 702 in unterschiedlichen Konzentrationen; Spannung =50mV;Lipid=1% DiphPC in n-Dekan;T=25°C

3.1.2.4. Einzelkanalmessungen des Epsilon-Toxins 703

Die Einzelkanalleitfähigkeits-Messung in 1M KCl ergab folgendes Diagramm:

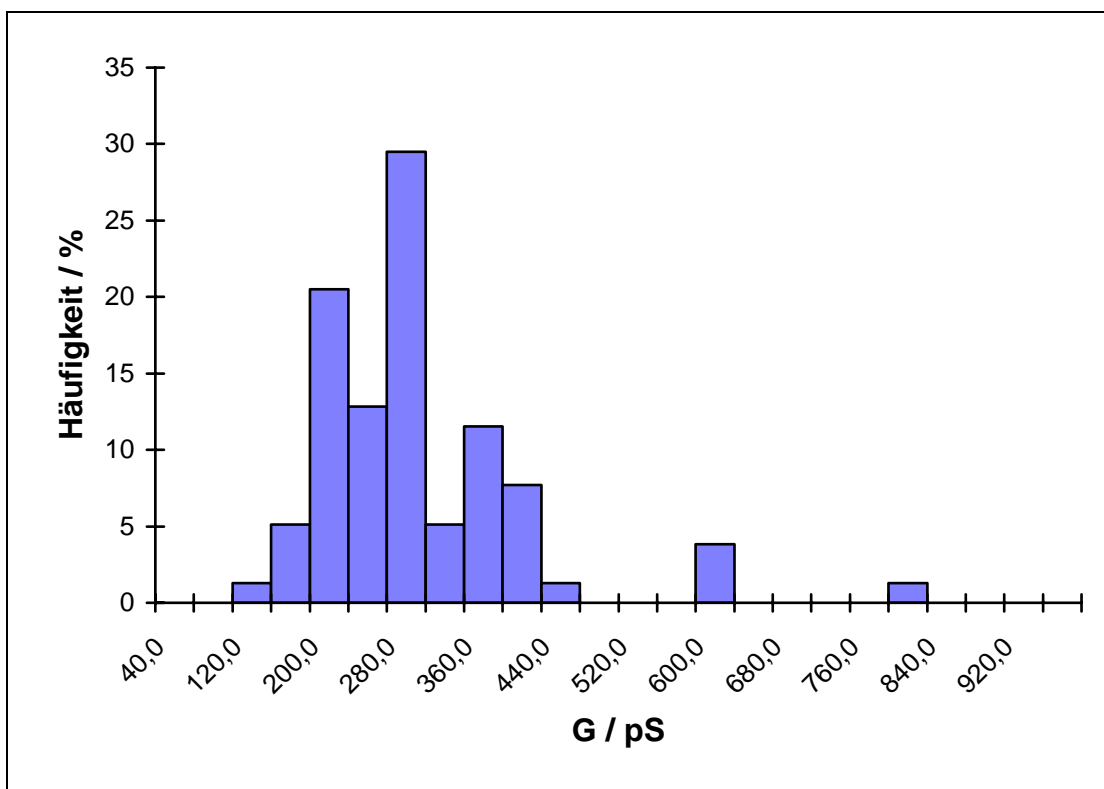


Abbildung 3.6: Statistische Auswertung der Einzelkanalleitfähigkeit des Epsilon-Toxins 703, gemessen in 1M KCl. Angelegte Spannung = 50 mV; Lipid 1% DiphPC n-Dekan; T = 25°C

In einer 1 M KCl-Lösung beträgt die am häufigsten auftretende Leitfähigkeit 280 pS
Der Mittelwert beträgt 292 pS.

Des Weiteren ergaben sich folgende Werte:

Konzentration	Häufigster Wert [pS]	Mittelwert [pS]
0,1 M KCl	30	36
0,3 M KCl	100	110
1 M KCl	280	290
3 M KCl	900	810
1 M LiCl	200	
1 M KAc	160	170

Tabelle 7: Einzelkanalleitfähigkeit des Epsilon-Toxins 703 in unterschiedlichen Konzentrationen; Spannung =50mV;Lipid=1% DiphPC in n-Dekan;T=25°C

Die Einzelkanalleitfähigkeiten der Mutanten des Epsilon-Toxins wurden bei Konzentrationen von 0,1M, 0,3M, 1M und 3M KCl gemessen. Die Ergebnisse sind nochmals in Tabelle 8 zusammengestellt.

Konzentration	Wt	700	701	702	703
0,1 M KCl	60 pS	10 pS	40 pS	40 pS	30 pS
0,3 M KCl	160 pS	80 pS	140 pS	160 pS	100 pS
1 M KCl	550 pS	300 pS	400 pS	600 pS	280 pS
3 M KCl	17000 pS	1400 pS	1500 pS	1800 pS	900 pS

Tabelle 8: Einzelkanalleitfähigkeiten der Mutanten des Epsilon-Toxins in unterschiedlichen KCl-Konzentrationen; Spannung 50 mV; Lipid = 1% DiphPC in n-Dekan; T = 25°C

Graphisch lässt sich der Zusammenhang zwischen Elektrolytkonzentration und Einzelkanalleitfähigkeit bei Wildtyp und Mutanten folgendermaßen darstellen:

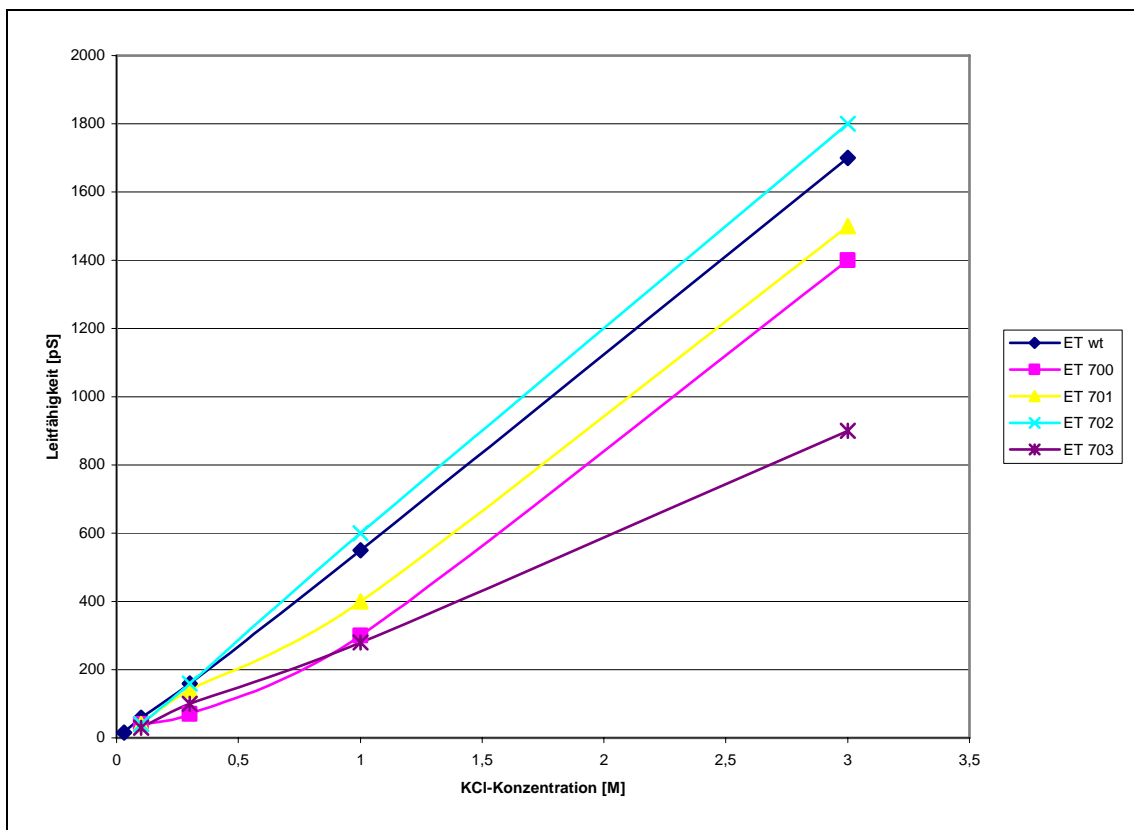


Abbildung 3.7 : Vergleich der Epsilon-Toxin-Mutanten mit dem Wildtyp

3.1.2.5. Einzelkanalmessungen in verschiedenen Salzen

	Wildtyp	700	701	702	703
1 M KCl	550	300	400	600	280
			1500 (3M)		
1M LiCl	340	160	900 (3M)	880	200
1M KAc	240	160	320 (1M)	400	160
			800 (3M)		

Tabelle 9: Einzelkanalleitfähigkeit des Epsilon-Toxins in
Unterschiedlichen Salzen; Spannung = 50 mV; T = 25°C

Die Leitfähigkeit von Ionen hängt mit einer wichtigen Größe zusammen: der Ladung eines Ions. Die Ladung und die Größe eines Ions bestimmen die Hydrathülle, wodurch sie einen Einfluss auf die Beweglichkeit der Ionen ausübt. Kleine Ionen besitzen auf Grund einer höheren Ladungsdichte eine große Hydrathülle und sind daher weniger beweglich als große Ionen.

Die gemessenen Leitfähigkeiten in den Salzlösungen entsprechen dieser Theorie.

Vergleicht man die Leitfähigkeiten in 1M KCl, LiCl und KAc können Rückschlüsse auf die Selektivität, d.h auf den bevorzugten Transport von Anionen oder Kationen gemacht werden.

Wird das Chlorid gegen das weniger bewegliche Acetat ausgetauscht, geht die Leitfähigkeit zurück. Wird dagegen Kalium gegen das kleinere, wenig bewegliche Lithium ausgetauscht, so geht die Leitfähigkeit weniger stark zurück als beim Austausch von Chlorid gegen Acetat.

Dies deutet darauf hin, dass Anionen bevorzugt durch den Kanal wandern. Allerdings ist der Unterschied nicht sehr groß, was auf eine geringe Anionenselektivität hinweisen könnte. Als endgültiger Nachweis wurden noch Selektivitätsmessungen durchgeführt.

3.1.3. Ergebnisse der Selektivitätsmessungen

Bei Selektivitätsmessungen wird nicht mehr eine einzelne Pore betrachtet, sondern die Eigenschaften einer bestimmten Zahl von eingebauten Poren.

Zu diesem Zweck lässt man möglichst viele Poren in eine Membranfläche einbauen und variiert dann einzelne Bedingungen im Messsystem zur weiteren Charakterisierung der Poren.

3.1.3.1. Untersuchung der Poreselektivität

Die Messung der Einzelkanalleitfähigkeiten in verschiedenen Salzkonzentrationen konnte nur Anhaltspunkte über die Ladungssituation im Inneren des Kanals liefern.

Zur genaueren Bestimmung der Verhältnisse wurden Selektivitätsmessungen durchgeführt. Diese beruhen darauf, dass verschiedene porenbildende Proteine, abhängig von der eigenen Ladungsverteilung im Kanal, unterschiedliche Ionen je nach Ladung und Größe der Hydrathülle bevorzugen.

Durch das Anlegen eines Salzgradienten über einer Membran, in die etwa 100 Poren eingebaut sind, wird ein chemisches Potential aufgebaut. Dieses strebt seinem Ausgleich zu, verursacht aber durch den selektiven Durchtritt einer Ionensorte durch den Kanal ein elektrisches Potential, welches dem chemischen Potential entgegenwirkt. Im Gleichgewicht zwischen beiden liegt über der Membran ein elektrochemisches Potential an. Dieses ist als Differenz zwischen dem Potential der verdünnten Seite und dem Potential der konzentrierten Seite definiert. Zur Errechnung des Permeabilitätsverhältnisses von Kation (P_c) und Anion (P_a) wird die Potentialdifferenz und das Permeabilitätsverhältnis beider Seiten in die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung eingesetzt.

	700	701	702	703
Salz	P_k/P_a	P_k/P_a	P_k/P_a	P_k/P_a
KCl	1,65	1,61	-	2,51
LiCl	0,91	-	-	-
KAc	1,65	-	-	18,28

Tabelle 10: Permeabilitätsverhältnisse P_k/P_a

Für alle gemessenen Elektrolyte war die verdünnte Seite stets positiv, was darauf hinweist, dass bevorzugt Kationen durch den Kanal hindurchtreten und der Kanal somit kationenselektiv ist. Lediglich der Wert von LiCl bei der 700-Mutante könnte auf eine Anionenselektivität schließen lassen.

3.1.4. Ergebnisse der Spannungsabhängigkeitsmessungen

Die Spannungsabhängigkeit eines Kanals wurde durch sukzessive Erhöhung der Spannung in 10 mV-Schritten über einer Membran, in der sich kaum mehr Kanäle einbauen, ermittelt. Wenn die Pore Spannungsabhängig ist, sinkt die Leitfähigkeit der Membran bei Spannungen $> \pm 10$ mV in Abhängigkeit von der jeweiligen angelegten Spannung bis ein Endwert G_0 erreicht ist.

Ist dies nicht der Fall, so bleibt die Leitfähigkeit konstant auf dem Ausgangsniveau. Die Leitfähigkeit bei ± 10 mV wird als G_0 (= Leitfähigkeit ohne angelegte Spannung) bezeichnet.

Trägt man das Verhältnis der Leitfähigkeit G (bei einer angelegten Spannung) durch die ursprüngliche Leitfähigkeit G_0 (ohne angelegte Spannung) gegen die angelegte Spannung V_m auf, erhält man, abhängig von der Zugabe der Probe, eine Kurve.

Das Experiment konnte nur für die 700-Mutante durchgeführt werden. Leider ist bis zum Zustandekommen der Messungen der anderen Mutanten die Membran immer geplatzt.

Bei einem pH Wert von 7 und einer einseitigen Probenzugabe erhält man keine Glockenkurve sondern je nach Zugabe ins vordere oder hintere Kompartiment der Küvette eine Abnahme bei positiven oder negativ angelegten Spannungen.

Erfolgt die Zugabe der Probe in das vordere Kompartiment der Küvette, so erhält man ein spannungsabhängiges Schließen der eingebauten Poren im negativen Bereich angelegter Spannung. Die Poren weisen im positiven Bereich einen konstant geöffneten Zustand auf.

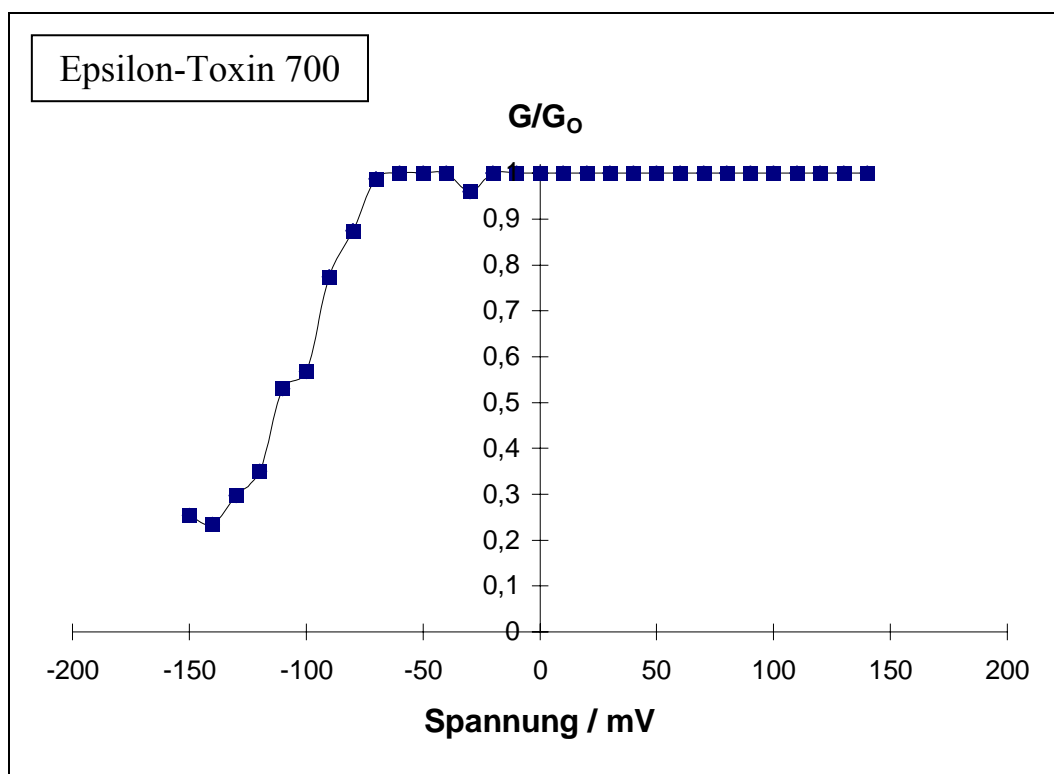


Abbildung 3.8: Verhältnis der Leitfähigkeit G (bei abgelegter Spannung V_m) zur Leitfähigkeit G_0 (bei 10 mV Spannung) als Funktion der angelegten Spannung V_m . Zugabe in das vordere Küvettenkompartiment. Angegeben ist der Mittelwert von drei Messungen. Elektrolyt = 1 M KCl; Lipid = 1% DiphPC in n-Decan; $T = 25\text{ C}$; $\text{pH} = 7$

Erfolgt die Zugabe der Probe in das hintere Kompartiment der Küvette, so erhält man ein spannungsabhängiges Schließen der eingebauten Poren im positiven Bereich angelegter Spannung. Die Poren weisen im negativen Bereich einen konstant geöffneten Zustand auf.

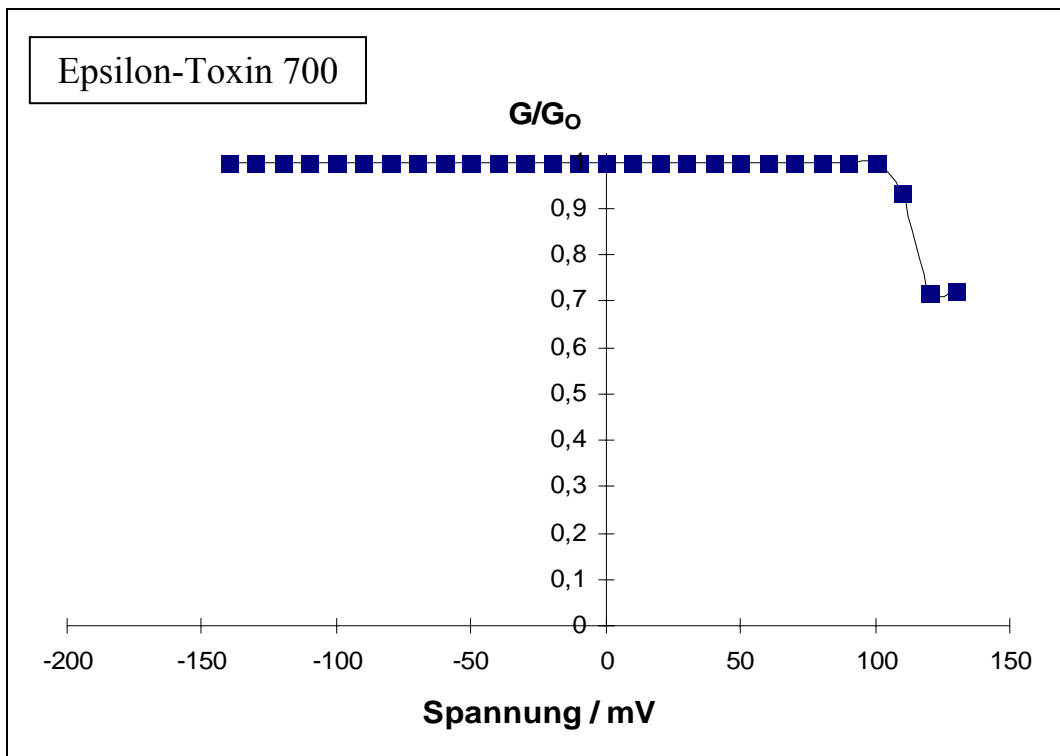


Abbildung 3.9: Verhältnis der Leitfähigkeit G (bei abgelegter Spannung V_m) zur Leitfähigkeit G_0 (bei 10 mV Spannung) als Funktion der angelegten Spannung V_m . Zugabe in das hintere Küvettenkompartiment. Angegeben ist der Mittelwert von zwei Messungen. Elektrolyt = 1 M KCl; Lipid = 1% DiphPC in n-Decan; $T = 25\text{ C}$; $\text{pH} = 7$

Das gleiche Experiment mit der gleichen Mutante wurde auch noch bei einem pH-Wert von 4,5 durchgeführt. Hierbei ergaben sich folgende Ergebnisse:

Wird die Probe in das vordere Kompartiment gegeben, schließen sich die Poren anfangs nur im negativen Bereich, ab einer Spannung von etwa 120 mV erhält man dann aber auch im positiven Bereich ein spannungsabhängiges Schließen der Poren.

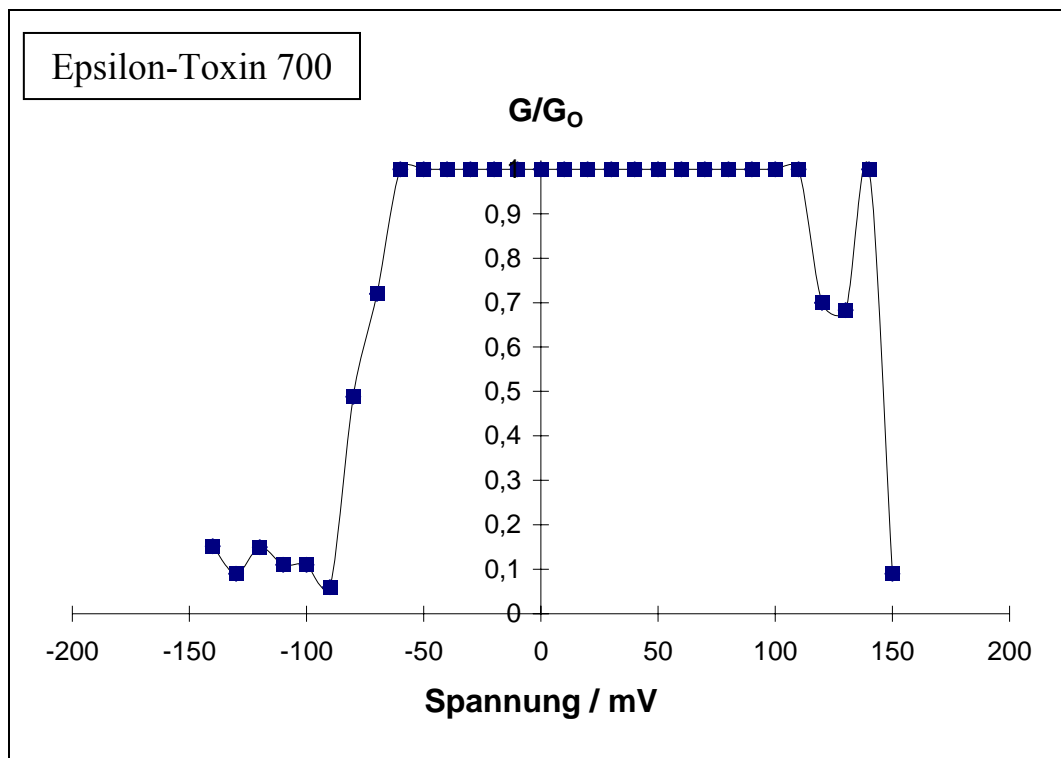


Abbildung 3.10: Verhältnis der Leitfähigkeit G (bei abgelegter Spannung V_m) zur Leitfähigkeit G_0 (bei 10 mV Spannung) als Funktion der angelegten Spannung V_m . Zugabe in das vordere Küvettenkompartiment. Angegeben ist der Mittelwert von zwei Messungen. Elektrolyt = 1 M KCl; Lipid = 1% DiphPC in n-Decan; $T = 25\text{ C}$; $\text{pH} = 4,5$

Ein sehr ähnliches Bild erhält man wenn man die Probe nicht vorne, sondern hinten zugibt. Nur hier ist es genau umgekehrt, die Poren schließen zuerst im positiven Bereich, ab etwa -90 mV beginnen dann auch die Poren spannungsabhängig im negativen Bereich zu schließen.

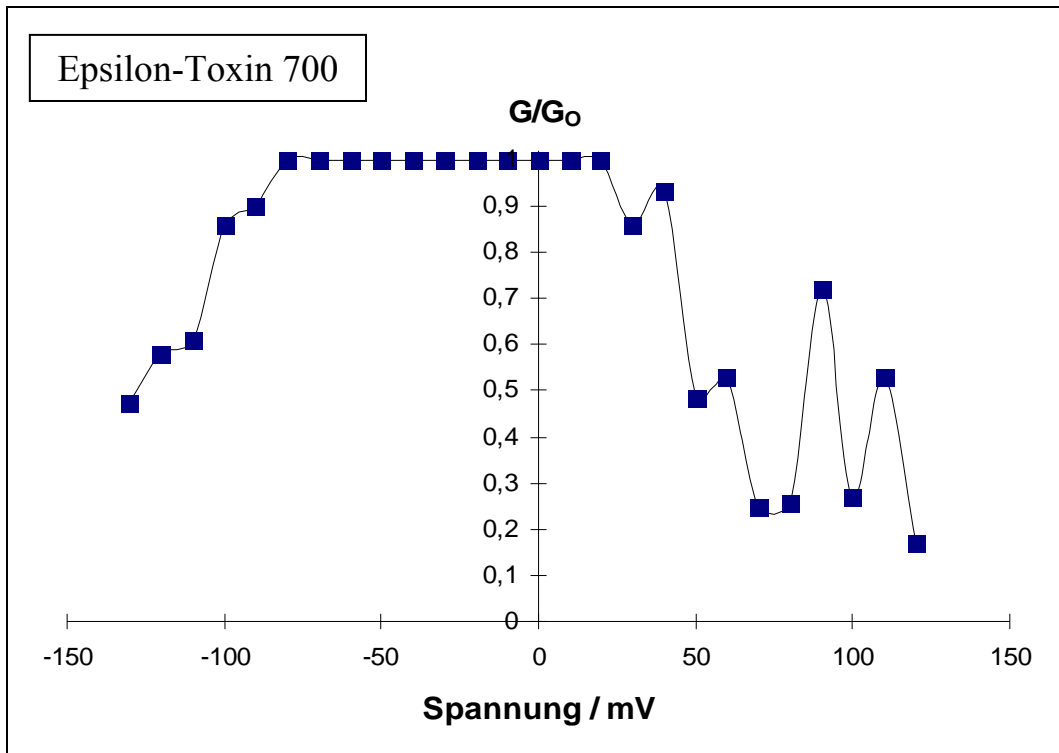


Abbildung 3.11: Verhältnis der Leitfähigkeit G (bei abgelegter Spannung V_m) zur Leitfähigkeit G_0 (bei 10 mV Spannung) als Funktion der angelegten Spannung V_m . Zugabe in das hintere Küvettenkompartiment. Angegeben ist der Mittelwert von zwei Messungen. Elektrolyt = 1 M KCl; Lipid = 1% DiphPC in n-Decan; $T = 25$ C; $\text{pH} = 4,5$

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde das Verhalten der Mutanten des Epsilon-Toxins in verschiedenen Situationen untersucht, um die kanalbildende Domäne definieren zu können.

Diese werden Epsilon-Toxin 700, 701, 702 und 703 genannt:

- Epsilon-Toxin 700 hat anstatt Serin 156 ein Glutamat (S156E)
- Epsilon-Toxin 701 anstatt Lysin 162 ein Glutamat (K162E)
- Epsilon-Toxin 702 anstatt Threonin 175 ein Cystein (T175C)
- Epsilon-Toxin 703 anstatt Serin 156 ein Cystein (S156C)

In dieser Arbeit konnte durch Messungen nachgewiesen werden, dass sich durch die eingefügten Mutationen die elektrophysiologischen Eigenschaften des Epsilon-Toxins verändert haben. Die am besten zu messende Mutante war das S156E. Als sehr schwer zu messen stellte sich K162E heraus. Hier tauschten wir das Lysin 162 gegen ein negativ geladenes Glutamat aus. Während das Lysin 162 positiv geladen ist, wird durch das Glutamat eine negative Ladung eingefügt, welche die Nettoladung im Bereich des Kanalmundes verändert.

Beim Epsilon-Toxin 700 wird das polare Serin 154 ebenfalls gegen ein negatives Glutamat getauscht. Der Einbau der Poren war bei dieser Mutante im Vergleich zum Wildtyp nicht erschwert.

Auch die Punktmutationen der Mutanten des Epsilon-Toxins 702 und 703, bei denen jeweils ein Cystein gegen eine neutrale Aminosäure vertauscht wurde, hatten deutliche Effekte auf die Eigenschaften des Toxins. Die Mutation 703 (S156C) hatte hierbei den größten Effekt auf die Selektivität.

4.1. Charakterisierung mit Hilfe von Bilayer-Messungen

4.1.1. Einzelkanalmessungen

4.1.1.1. Einzelkanalmessungen des Wildtyps

Der Wildtyp des Epsilon-Toxins bildet Kanäle in künstlichen Lipid-Bilayer-Membranen. Der am häufigsten auftretende Leitfähigkeitswert in einer 1 M KCl-Lösung beträgt 520 pS, der Mittelwert liegt bei 450 pS (Petit et al., 2000).

Misst man die Einzelkanalleitfähigkeit in Abhängigkeit von verschiedenen KCl-Konzentrationen so findet man eine lineare Beziehung, d.h. das Epsilon-Toxin besitzt keine Ladung am Kanalmund (Petit et al., 2000).

4.1.1.2. Einzelkanalmessungen der Mutanten in KCl

Die Mutanten des Epsilon-Toxins bilden in künstlichen Lipid-Bilayer-Membranen ebenfalls Kanäle.

Das Epsilon-Toxin 700 ließ sich relativ leicht und schnell messen.

Die Einzelkanalleitfähigkeit beträgt im Mittelwert 380 pS in 1 M KCl. Dieser Wert alleine ist aber nicht aussagekräftig. Es ist wichtig, die Verteilung und somit die Häufigkeit einzelner Porengrößen zu betrachten. Der am häufigsten auftretende Leitfähigkeitswert ist 300 pS in 1 M KCl. Somit ist die Porengröße im Vergleich zum Wildtyp kleiner geworden, was bedeutet, dass weniger Ionen durch den Kanal fließen können. Die Werte der Einzelkanalmessungen in 1 M Lithiumchlorid und 1 M Kaliumacetat, welche beide 160 pS betragen, deuten darauf hin, dass der Kanal ionenneutral geworden ist. Über die Selektivitätsmessungen zeigt sich aber eine leichte Kationenselektivität.

Misst man die Einzelkanalleitfähigkeit in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen eines Salzes, z.B. KCl, so findet man hier eine lineare Beziehung. Das heißt, dass der Kanal dieser Mutante ebenfalls keine Punktladung am Kanalmund besitzt, was wiederum bedeutet, dass Position 156 nicht zum Kanalmund zeigt.

Läge eine Punktladung am Kanalmund vor, wäre bei niedrigen Konzentrationen eine Abweichung der Leitfähigkeit zu beobachten. Bei hohen KCl-Konzentrationen nimmt die Leitfähigkeit von Salzen ab. Dadurch lässt sich sehr oft die Abweichung von der Linearität zwischen den Salzkonzentrationen und der Leitfähigkeit erklären.

Das Epsilon-Toxin 701 ließ sich von allen Mutanten am schlechtesten messen, was durchaus mit der Mutation zusammenhängen kann, da durch eine Anhäufung negativer Ladungen im Heptamer dessen Struktur gestört sein könnte. Durch die negativen Ladungen müssten Kationen bevorzugt durch den Kanal fließen können, was später über die Selektivitätsmessungen bestätigt wird.

Die Ergebnisse stützen sich auf Messungen mit jeweils 30 bis 40 Poren. Leider haben sich bei den Messungen nicht mehr Poren eingebaut. Dies könnte seine Ursache darin haben, dass das Protein gealtert, beim Auftauen beschädigt oder ausgefallen ist. Somit wäre kein Protein im Überstand und es könnten sich keine Poren einbauen.

Als Mittelwert ergab sich in einer 1 M KCl-Lösung 405 pS; der am häufigsten auftretende Wert war 400 pS. Durch die geringe Anzahl an Poren ist die Messung des Epsilon-Toxin 701 statistisch sicherlich nicht abgesichert.

Ähnlich schwierig ließen sich die Epsilon-Mutanten 702 und 703 messen; trotzdem konnten meistens etwa 70 Poren ausgewertet werden.

Der Mittelwert des Epsilon-Toxins 702 lag bei 485 pS, die am häufigsten auftretende Leitfähigkeit bei 600 pS in 1 M KCl. Die Leitfähigkeitswerte bei verschiedenen KCl-Konzentrationen zeigen eine lineare Beziehung, weswegen auch hier nicht von einer Ladung am Kanalmund auszugehen ist.

Die Leitfähigkeit von 600 pS entspricht fast dem Wert des Wildtyps (550 pS). Durch das Cystein war keine Veränderung zu erwarten, da für das Cystein kein intramolekularer Bindungspartner (ein weiteres Cystein) vorhanden sein sollte, wodurch es zu strukturellen Veränderungen kommen könnte. Das Cystein wurde eingefügt, um später mit schwefelaktiven Reagenzien zu interagieren.

Das Epsilon-Toxin 703 hat einen Mittelwert der Einzelkanalleitfähigkeit von 292 pS und eine am häufigsten auftretende Leitfähigkeit von 280 pS in 1 M KCl-Lösung.

Der Leitfähigkeitswert von 280 pS weicht sehr stark von dem des Wildtyps ab, was bedeutet, dass der Kanal auch hier kleiner geworden ist. Durch das Vertauschen von Serin gegen das Cystein, das eigentlich keine Auswirkung auf das Protein haben sollte, haben wir also eine stark reduzierte Leitfähigkeit.

4.1.1.3. Einzelkanalmessungen der Mutanten in Alkalisalzen und Kaliumacetat

Ersetzt man in der Einzelkanalmessung Kaliumchlorid gegen Lithiumchlorid bzw. Kaliumacetat, so verhalten sich die Leitfähigkeiten so wie man es aus dem Vergleich der Größe der hydratisierten Ionen erwartet.

Die Ladung bestimmt die Größe der Hydrathülle und beeinflusst so die Beweglichkeit. Kleine Ionen besitzen auf Grund einer höheren Ladungsdichte eine größere Hydrathülle und sind daher weniger beweglich als große Ionen.

Betrachtet man zum Beispiel Acetat im Vergleich zu Chlorid so hat Acetat die größere Hydrathülle und dadurch bedingt eine geringere Mobilität in Lösung. Im Falle einer Anionenselektivität des Kanals sollte die Leitfähigkeit der Pore wegen der geringeren Mobilität des Acetat-Ions gegenüber dem Chlorid-Ion in KAc geringer ausfallen als in KCl. Wegen der geringeren Mobilität des Lithium-Ions gegenüber dem Kalium-Ion ist im Falle einer Kationenselektivität ein Rückgang der Leitfähigkeit in LiCl gegenüber KCl für einen kationenselektiven Kanal zu postulieren.

Wie schon für Epsilon-Toxin 700 gesagt, dessen Werte in 1 M LiCl und 1 M KAc jeweils 160 pS betragen, was für einen nicht selektiven Kanal spricht, zeigen auch die Mutanten 701 und 703 dasselbe Verhalten (701 in 3 M LiCl = 900 pS, in 3 M KAc = 800 pS und 703 in 1 M LiCl = 200 pS, in 1 M KAc 160 pS).

Nur die Mutante 702 zeigt mit Werten von 880 pS in 1 M LiCl und 400 pS in 1M KAc gegenüber 600 pS in 1 M KCl eine deutlich anionenselektive Tendenz.

Da diese Messungen nur eine grobe Abschätzung der realen Selektivität der Kanäle darstellt, wurde die Selektivität noch im Mehrkanalexperiment untersucht.

4.1.2. Selektivität

Im Gegensatz zu den Messungen der Einzelkanalleitfähigkeiten wiesen die Messungen der Ionenselektivität mit Hilfe von Mehrkanalexperimenten auf eine leichte Kationenselektivität der Mutanten 700, 701 und 703 hin, während der Wildtyp mit einem pK/pa von 0,30 in KCl aufweist (Petit et al., 2000). Das Epsilon-Toxin 702 konnte nicht auf seine Selektivität untersucht werden, da kein ausreichend starker Einbau in die Membran erzielt werden konnte.

Bei den ersten beiden Mutanten, dem Epsilon-Toxin 700 und dem Epsilon-Toxin 701, ist die Kationenselektivität leicht erklärbar, da beide die negative Ladung des Glutamats tragen. Diese Ladung zieht natürlich positive Ionen an und macht den Kanal somit kationenselektiv, was auch die Werte von 1,65 bzw. 1,61 in KCl bestätigen.

Epsilon-Toxin 703 ist ebenfalls kationenselektiv und mit seinem Wert von 2,51 deutlicher als die anderen. Somit hatte der Austausch des Serins gegen das Cystein eine deutliche Wirkung auf die Selektivität, was sich aber noch nicht letztlich erklären lässt.

Der Wert von Epsilon-Toxin 703 mit 18,28 in KAc ist sicherlich zu vernachlässigen, da er in seiner Höhe völlig aus dem Rahmen fällt.

4.1.3. Spannungsabhängigkeit

Die Kanäle des Epsilon-Toxins sind, wie andere Toxin-Kanäle (z.B. des C2-Toxins (Schmid et al., 1994) spannungsabhängig.

Das Porin erwies sich als spannungsabhängig mit einer Abhängigkeit von der Zugabeseite der Probe. Gibt man die Probe in die vordere Küvettenkammer, so erhält man ein spannungsabhängiges Schließen der Pore im Bereich negativer Spannungen ab einem Bereich von ca -70 mV, während bei steigender positiver Spannung die Poren in konstant offenem Zustand vorliegen. Gibt man die Probe in die hintere Küvettenkammer, so erhält man ein umgekehrtes Schließverhalten.

Diese Experimente mit einseitiger Zugabe zeigen, dass sich die Bindekomponente des Epsilon-Toxins gerichtet in die Membran einfügt.

Analoge Experimente wurden auch bei einem pH von 4,5 unter denselben Bedingungen durchgeführt. Hier ergab sich bei Zugabe der Probe in die vordere Küvettenkammer ein spannungsabhängiges Schließen der Poren zuerst im Bereich negativer Spannungen und bei höheren Spannungen auch im positiven Bereich. Ein umgekehrtes Schließverhalten ergibt sich bei Zugabe in die hintere Küvettenkammer.

Damit ist gezeigt, dass sich das Porin erstens gerichtet und zweitens asymmetrisch in die Membran einbaut. Bei konstanter Polung der Elektroden, aber Änderung des Küvettenkompartiments, in welche die Probenzugabe erfolgt, konnte eine einseitig wechselnde Spannungsabhängigkeit festgestellt werden. Dies bedeutet, dass die Pore sich definiert und gerichtet einbaut, unabhängig von der Membranpolung. Es ist damit belegt, dass es sich hierbei um einen Struktureffekt handelt und keine elektrischen Zusammenhänge für die Ausrichtung der Pore verantwortlich sind.

Es lässt sich nicht genau erklären, dass sich bei pH 4,5 beide Seiten schließen. Jedoch könnte man vermuten, dass dies durch Protonierung von Resten auf beweglichen Loops zustande kommen könnte.

Der kanalbildende Komplex des Epsilon-Toxins ist somit asymmetrisch aufgebaut woraus man auf eine ähnliche Struktur wie die des α -Toxins schließen kann. Dieser asymmetrische Aufbau führt zu der beobachteten asymmetrischen Reaktion auf die Richtung des Membranpotentials.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die biophysikalische Charakterisierung der Bindekomponente des Epsilon-Toxins und der Epsilon-Toxin-Mutanten mit Hilfe künstlicher Lipid-Bilayer-Messungen. Es galt herauszufinden, welcher Teil des Epsilon-Toxins für die Kanalbildung verantwortlich ist, um somit die kanalbildende Domäne definieren zu können.

Die durchgeführten Experimente zeigten, dass das Epsilon-Toxin transmembrane, stabile Poren in einer künstlichen planaren Lipidmembran bildet.

Im Vergleich von Wildtyp und Mutanten hat sich gezeigt, dass sich die Werte der Einzelkanalleitfähigkeit, der Selektivität und der Spannungsabhängigkeit verändert haben. Während der Wildtyp eine mittlere Einzelkanalleitfähigkeit in 1 M KCl von 450 pS und eine leichte Anionenselektivität mit einem p_k/p_a von 0,30 in KCl aufweist, reduzierte sich der Wert der Einzelkanalleitfähigkeit durch den Austausch von Serin 156 gegen Glutamat in der Mutante 700 auf 380 pS und der Kanal wurde mit einem Wert von p_k/p_a von 1,65 in KCl leicht kationenselektiv. Durch den Austausch von Lysin 162 gegen Glutamat ergab sich in der Mutante 701 eine mittlere Einzelkanalleitfähigkeit von 400 pS in 1 M KCl und ebenfalls eine leichte Kationenselektivität mit einem p_k/p_a von 1,61. Die Änderung der Selektivität dieser beiden Mutanten lässt sich durch das Vorhandensein zusätzlicher negativer Ladungen im Kanal leicht erklären.

Der Austausch von Threonin 175 gegen Cystein im Epsilon-Toxin 702 führte zu einem minimalen Anstieg der mittleren Einzelkanalleitfähigkeit in 1 M KCl auf 485 pS. Da der Einbau dieser Mutante stark reduziert war, konnte keine Selektivitätsmessung über Mehrkanalexperimente durchgeführt werden. Jedoch weisen die Werte der Einzelkanalleitfähigkeit in 1 M LiCl und 1 M KAc von 880 bzw 400 pS im Vergleich zu 1 M KCl auf eine Anionenselektivität hin. In diesem Fall hat die Mutation wohl keine gravierenden Auswirkungen auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des Toxins, jedoch möglicherweise auf die strukturellen Eigenschaften, was den schlechten Einbau des Proteins in die Membran erklären könnte.

Die deutlichsten Auswirkungen auf Leitfähigkeit und Selektivität scheint die Mutation von Serin 156 zu Cystein zu haben. So sank die mittlere Einzelkanalleitfähigkeit auf einen Wert in 1 M KCl von 290 pS und die Poren wiesen eine Kationenselektivität mit einem p_k/p_a -Wert von 2,51 in KCl auf. Der Grund dieser Änderung durch eine ungeladene Aminosäure wie Cystein ist eigentlich nur durch eine Änderung der Porenstruktur durch die Mutation zu erklären.

Zusammenfassend wurde damit bewiesen, dass die Punktmutationen genau in dem Bereich des Toxins durchgeführt wurden, der für die Kanalbildung verantwortlich sein muss.

6. Literaturverzeichnis

Alouf JE & Freer JH (1999) The Comprehensive Sourcebook of bacterial protein toxins. Academic Press.

Al-Khaldi S.F., Myers K.M., Rasooly A., Chizhikov V. (2004) Genotyping of *Clostridium perfringens* toxins using multiple oligonucleotide microarray hybridization. *Molecular and Cellular Probes* 18, 359-367.

Barth F, Hofmann C, Olenik IJ, Aktories K (1998) The N-terminal part of the enzyme component (C2I) of the binary *Clostridium botulinum* C2 toxin interacts with the binding component C2II and functions as a carrier system for a Rho ADP-ribosylating C3-like fusion toxin. *Infect. Imm.* 1998: 1364-1369.

Bhakdi S & Tranum-Jensen J (1987) Damage to mammalian cells by proteins that form transmembrane pores. *Rev. Physiol. Biochem. Exp. Pharmacol.* 107, 147-223.

Borrmann E., Günther H., Köhler H. (2001) Effekt of *Clostridium perfringens* epsilon toxin on MDCK cells. *FEMS Immun. And Medical Microbiology* 31, 85-92.

Cole A.R., Gilbert M., Popoff M., Moss D.S., Titball R.W., Basak A.K. (2004) *Clostridium perfringens* ϵ -toxin shows structural similarity to the pore-forming toxin aerolysin. Nature Publishing Group.

Finnie JW, Blumbergs PC, Manavis J (1999) Neuronal Damage produced in rat brains by *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. *J. Comp. Pathol.* 120, 415-420.

Holt J.G. (ed-in-chief) (1984) Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins Co., Baltimore.

Galanos C, Lüderitz O, Rietschel ET, Westphal O (1977) Newer aspects of the chemistry and biology of bacterial lipopolysaccharides with special reference to their lipid A component. *Int Rev Biochem* 14: 239-335.

Kayser F.H., Bienz K.A., Eckert J., Zinkernagel R.M. (1998) *Medizinische Mikrobiologie* 9. Auflg. Thieme Verlag.

Kimura K, Kubota T, Ohishi I, Isogai E, Isogai H, Fujii N (1998) The gene for component-II of botulinum C2 toxin. *Vet Microbiol* 62, 27-34.

Leppla SH (1998) The bifactorial *Bacillus anthracis* lethal and oedema factors. In Alouf, J.E., and Freer, J.H. (eds), *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*, pp. 243-263. Second edition. Academic Press, London.

Ludwig A & Goebel W (1999) The family of the multigenic encoded RTX toxins. In: *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*. 2nd Edition. 330-348.

Minami J, Katayama S, Matsushita O, Matsushita C, Okabe A (1997) Lambda-toxin of *Clostridium perfringens* activates the precursor of epsilon-toxin by releasing its N- and C-terminal peptides. *Microbiol. Immunol.* 41, 527-535.

Miyamoto O, Sumitani K, Nakamura T, Yamagami S, Miyata S, Itano T, Negi T, Okabe A (2000) *Clostridium perfringens* epsilon toxin causes excessive release of glutamate in the mouse hippocampus. *FEMS Microbiol. Lett.* 189, 109-113.

Nagahama M & Sakurai J (1991) Distribution of labeled *Clostridium perfringens* epsilon toxin in mice. *Toxicon* 29, 211-217.

Nagahama M & Sakurai J (1992) High-affinity binding of *Clostridium perfringens* epsilon toxin to rat brain. *Infect. Immun.* 60, 1237-1240.

Nagahama M, Lida H, Sakurai J (1993) Effect of *Clostridium perfringens* epsilon toxin on rat isolated aorta. *Microbiol. Immunol.* 37, 447-450.

Perelle S, Gilbert M, Boquet P, Popoff MR (1993) Characterization of *Clostridium perfringens* iota-toxin genes and expression in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 61,5147-5156.

Petit L, Gilbert M, Gillet D, Laurent-Winter C, Boquet P, Popoff MR (1997) *Clostridium perfringens* Epsilon Toxin Acts on MDCK Cells by Forming a Large Membrane Complex. *J. Bacteriol.* 179 (20), 6480-6487.

Petit L, Maier E, Gilbert M, Popoff MR, Benz R (2000) *Clostridium perfringens* Epsilon Toxin Induces a Rapid Change of Cell Membrane Permeability to Ions and Forms Channels in Artificial Lipid Bilayers. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 15736 – 15740.

Petosa C, Collier RJ, Klimpel KR, Leppla SH, Liddington RC (1997) Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature* 385, 833-838.

Rood J.J., McClane B.A., Songer J.G., Tiball R.W. (1997) *The Clostridia. Molecular Biology and Pathogenesis.* Academic Press San Diego, London.

Sakurai J, Nagahama M, Fujii Y (1983) Effect of *Clostridium perfringens* epsilon toxin on the cardiovascular system of rats. *Infect. Immun.* 42, 1183-1186.

Schmid A., Benz R., Just I., Aktories K. 1994) Interaction of *Clostridium botulinum* C2 toxin with lipid bilayer membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 16706-16711.

Schlegel H (1985) *Allgemeine Mikrobiologie.* 6. Auflg. Thieme Verlag.

Shortt SJ, Titball RW, Lindsay CD (2000) An assessment of the in vitro toxicology of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in human and animal cells. *Hum. Exp. Toxicol.* 19, 108-116.

Smedley J.G., Fischer D.J., Sayeed S., Chakrabarti G., McClane B.A. (2004) The enteric toxins of clostridium perfringens. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 152, 183-204.

Song L, Hobough MR, Shustak C, Sheley S, Bayley H, Gouaux JE (1996) Structure of staphylococcal α -hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* 274, 1859-1866.

Vielen herzlichen Dank an ...

... Herrn Prof. Dr. R. Benz für die freundliche Überlassung des Themas und für die jederzeit gewährte Betreuung und Beratung bei der Durchführung dieser Arbeit

... Georg Polleichtner, der mir bei anfallenden Fragen immer mit Rat und Tat zur Seite stand

Lebenslauf

Name, Vorname: Seitz, Steffen Heiner
Wohnort: Im Efeu 4, 73728 Esslingen
Geboren am: 04.11.1979 in Tübingen
Familienstand: ledig
Eltern: Dr. Peter Seitz, Arzt
Luzia Seitz, geb. Brenneis, Hausfrau
Geschwister: Anke Seitz
Staatsangehörigkeit: deutsch
Religion: römisch-katholisch

Schulbildung

1986-1990: Grundschule St. Bernhardt, Esslingen
1990-1999: Schelztor-Gymnasium Esslingen, Abschluss: Abitur

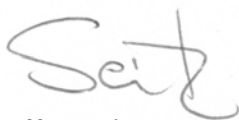
Zivildienst

1999-2000: Städtische Kliniken Esslingen

Studium

10/2000 – 03/2001: Studium der Zahnheilkunde an der
Martin – Luther – Universität, Halle/Wittenberg
04/2001 – 06/2006: Studium der Zahnheilkunde an der Bayerischen
Julius – Maximilians – Universität, Würzburg
07. Juni 2006: Staatsexamen Zahnmedizin
12. Juni 2006: Erteilung der zahnärztlichen Approbation
seit August 2005: Erstellung der Promotionsarbeit

Würzburg, 01. August 2006



Steffen Seitz