

3 Substanzen und Durchführung der Experimente

3.1 Chemikalien

Im folgenden Abschnitt werden die verwendeten Lipopolysaccharide, sowie das Polymyxins B, bzw. das Polymyxin B-Nonapeptid genauer beschrieben.

3.1.1 ReLPS

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Experimente mit der kleinsten in der Natur vorkommenden Strukturvariante der Lipopolysaccharide, dem ReLPS, durchgeführt. In Abbildung 15 ist die Strukturformel von ReLPS mit den am häufigsten auftretenden Substitutionen dargestellt. Im strukturellen Aufbau unterscheiden sich das ReLPS von *Salmonella minnesota* und das ReLPS von *Escherichia coli* nicht grundsätzlich [32, 49, 50]. Der Fettsäurebereich des natürlichen Isolat von *E. coli* ist wesentlich einheitlicher zusammengesetzt, als es bei *S. minnesota* der Fall ist [49, 50]. *Salmonellen* zeigen ebenfalls häufig Substitutionen der beiden Phosphatgruppen und der KDO-Zucker [50], während für *E. coli* nahezu keine Substitution der Phosphatgruppen und nur ein sehr geringer Anteil an heptaacyliertem Lipid A beobachtet wird.

3.1.1.1 *Salmonella minnesota* ReLPS Re595

Es wurden mehrere Chargen á 50 mg ReLPS von *Salmonella minnesota* von der Firma SIGMA bezogen (L 9764). Die Extraktion des Materials wurde von SIGMA nach dem Phenol-Chloroform-Ether-Verfahren [92] vorgenommen. Eine chromatographische Trennung der verschiedenen Komponenten wurde nicht durchgeführt [50]. Bei Berechnungen wurde für dieses Material eine mittlere Molmasse von $M_{s,m} = 2500$ g/mol zugrunde gelegt (persönliche Mitteilung Dr. K. Brandenburg, Forschungsinstitut Borstel) .

Das lyophilisierte Material wurde ohne weitere Reinigungsschritte verwendet.

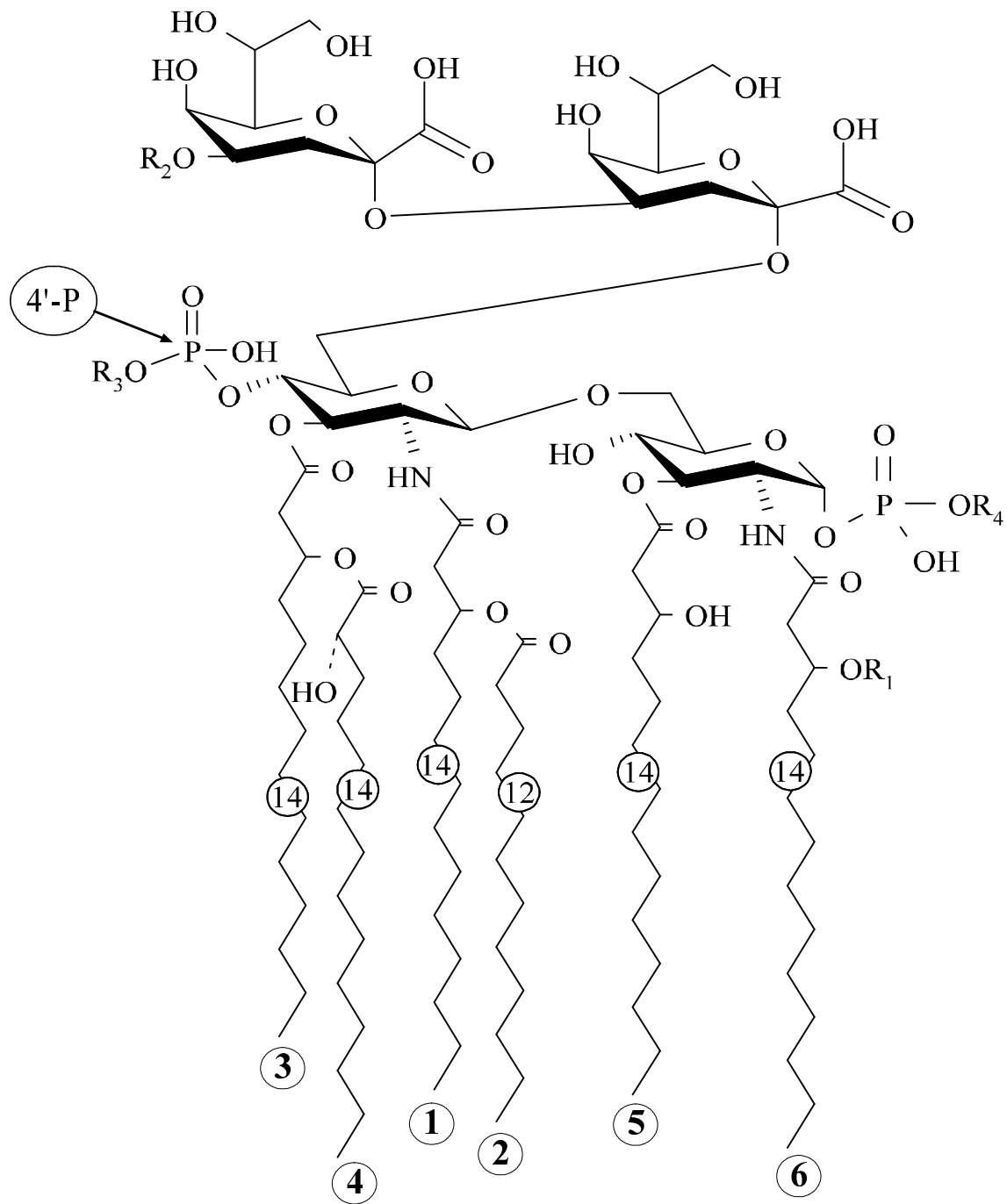


Abbildung 15 Strukturformel eines vollständig protonierten ReLPS-Moleküls. *E. coli* ReLPS ist sehr homogen zusammengesetzt mit $R_1-R_4 = H$ [49]. Bei *Salmonella minnesota* ReLPS ist die Variabilität größer, häufige Substitutionen sind $R_1 = \text{Palmitoyl}$, $R_2 = 2\text{-Keto-3-deoxyoctulonsäure}$, $R_3 = \text{Aminoarabinose}$ und $R_4 = \text{Phosphorylethanolamin}$ [50].

3.1 Chemikalien

3.1.1.2 *Salmonella minnesota ReLPS HL57*

Von K. Brandenburg, Forschungsinstitut Borstel, wurden freundlicherweise 25 mg ReLPS von *Salmonella minnesota* HL57 zur Verfügung gestellt. Die Extraktion erfolgte im Forschungsinstitut Borstel nach dem Phenol-Chloroform-Ether-Verfahren. Im Anschluß daran wurde das Rohmaterial chromatographisch getrennt. Für dieses Material wurde eine mittlere Molmasse von $M_{s,m} = 2500$ g/mol angegeben (persönliche Mitteilung Dr. K. Brandenburg).

Das lyophilisierte Material wurde ohne weitere Reinigungsschritte verwendet.

3.1.1.3 *Escherichia coli ReLPS D31m4*

Von N. Qureshi, Madison, Wisconsin (USA) wurden freundlicherweise insgesamt 25 mg ReLPS von *Escherichia coli* isoliert, gereinigt und zur Verfügung gestellt. Die Extraktion und die Reinigung des Material erfolgte analog zu dem von Qureshi et al. publizierten Verfahren [49]. Das hoch gereinigte Material wurde über einen Ionenaustauscher in die freie Säureform überführt. Die größte Teil der Substanz ist massenspektroskopisch einheitlich mit einer Molmasse von $M_{E.c.} = 2232$ g/mol. Die Substanz entspricht der in Abbildung 15 gezeigten Strukturformel mit $R_1-R_4 = H$.

3.1.2 Polymyxin B

Das verwendete Polymyxin B wurde freundlicherweise von der Firma *Pfizer* zur Verfügung gestellt und ohne weitere Reinigungsschritte eingesetzt. Für dieses Material (Polymyxin B- Sulfat) ist vom Hersteller eine Molmasse von $M_{PmB} = 1386$ g/mol angegeben.

3.1.3 Polymyxin B-Nonapeptid (PmBN)

Beim Polymyxin B-Nonapeptid handelt es sich um ein durch enzymatische Spaltung zwischen Dab (1) und Thr(2) erzeugtes Fragment des Polymyxin B. Es entspricht ansonsten der in Abbildung 4 gezeigten Strukturformel [12]. Durch den fehlenden aliphatischen Rest ist diese Substanz vorwiegend hydrophil und weist eine im Vergleich zu PmB reduzierte Gesamtladung auf. Die verwendete Substanz wurde von *Fluka* bezogen. Die Molmasse beträgt nach Angabe des Herstellers $M_{PmBN} = 1035$ g/mol.

3.1.4 Lösungsmittel

Für die Monofilmpräparation wurden die Lipide in Chloroform (*Merck*, ultrapurum) gelöst. Als Lösungszusätze wurden Ethanol (*Merck*, reinst) und Wasser eingesetzt. In allen Experimenten dieser Arbeit wurde ausschließlich tridestilliertes Wasser aus einer Quarzapparatur verwendet.

3.2 Durchführung der Experimente

Es folgt eine Beschreibung der verwendeten Apparaturen und experimenteller Details. Für die theoretischen Berechnungen werden die verwendeten Parameter zur Steuerung der Simulationsbedingungen angegeben.

3.2.1 Pulverdiffraktometer

Die Röntgenbeugungsexperimente wurden an einem selbstfokussierenden Pulverdiffraktometer im $\Theta - 2\Theta$ Modus durchgeführt. Das Gerät besteht aus einem Großwinkelgoniometer vom Typ PW 1050 der Firma *Philips*, einem Graphitmonochromator vom Typ 3-202 der Firma *AMR*, sowie einem Hochspannungsgenerator und einem Szintillationszähler der Firma *EFG GmBH* (Berlin, Deutschland).

Die aus der Röntgenröhre (Kupfer-Anode, $\lambda=0,15405$ nm, $U = 40$ KV, $I = 20$ mA) austretende Strahlung gelangt durch einen Divergenzschlitz ($0,25^\circ$) auf die im Diffraktometermittelpunkt befindliche Probe. Die gebeugte Strahlung passiert einen Empfängerschlitz ($0,2^\circ$), eine Soller-Blende, den Monochromatorkristall sowie einen weiteren Schlitz ($0,25 - 0,50^\circ$), an den sich der Szintillationszähler anschließt. Abhängig von der jeweiligen Probenbeschaffenheit wurde pro Meßpunkt 0,1 - 60 sek. gemessen. Der Vorschub variierte zwischen $0,01 - 0,025^\circ$ im Bereich von $1,0^\circ < 2 \Theta < 7,0^\circ$ und bis zu $0,1^\circ$ ($30^\circ < 2 \Theta < 50^\circ$). Der Primärstrahl wurde im Bereich von $0.0^\circ < 2 \Theta < 1,0^\circ$ durch einen Bleiblock ausgeblendet, um Störungen der Messung durch Primär- und/oder Streustrahlung zu vermindern. Die Steuerung der Apparatur und die Aufnahme der Meßwerte erfolgte durch einen PC. Alle Untersuchungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.2 Durchführung der Experimente

Die Berechnung des Doppelschichtabstandes der untersuchten Proben erfolgte unter Verwendung der in Kapitel 2.4. gezeigten Bragg'schen Gleichung. Mit θ wird der halbe Beugungswinkel bezeichnet, λ bezieht sich auf die verwendete Wellenlänge und die Ordnung des lamellaren Reflexes wird mit n ausgedrückt.

3.2.1.1 Probenpräparation für die Pulverdiffraktometrie

In Voruntersuchungen hat sich gezeigt, daß eine Probenpräparation nach dem Langmuir-Blodgett-Verfahren [93] nicht möglich ist, da nicht mehrere Schichten auf den Träger übertragen werden konnten. Daher erfolgte die Präparation von multilamellaren Schichtsystemen für die Pulverdiffraktometrie ausschließlich durch Antrocknen wäßriger Lipidlösungen [94, 95, 96].

Beim Antrocknen von Lipidlösungen bilden sich beim Verdunsten des Lösungsmittels multilamellare Schichtsysteme aus, die analog zu Langmuir-Blodgett(LB)-Proben aufgebaut sind [94,95]. Während man bei LB-Filmen die genaue Anzahl der übertragenen Schichten kennt, ist es bei einer Präparation durch Antrocknen einer Lipidlösung nicht möglich, direkt die Anzahl der Multischichten zu bestimmen. Der große Vorteil dieser Methode besteht darin, daß man Lipid- oder auch Mischsysteme untersuchen kann, die sich durch die Langmuir-Blodgett-Methode nicht auf ein Trägermaterial übertragen lassen und deshalb experimentell nicht zugänglich wären. Die Präparation der Proben ist überdies wesentlich schneller möglich, erfordert aber größere Materialmengen.

Für die Probenpräparation wurden 200-500 μg ReLPS in 25-50 μl Wasser (dreifach destilliert) suspendiert. Anschließend wurde die Probe für 5 min geschüttelt und für ca. 10 min in einem Ultraschallbad (Branson, 30 W HF-Leistung) bei 50-60°C beschallt. Die Probe ruhte für 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 15-25 μl auf die polierte Seite eines ungefähr 20*20 mm großen Stückes eines Silizium-Wafers (Firma Wacker-Chemie, Burghausen, Deutschland) aufgebracht. Das angetrocknete Material (1-4 h Trocknungszeit) belegte typischerweise eine Fläche von 5-10 mm Durchmesser.

Die Präparation von ReLPS / PmB(N)-Mischungen erfolgte nach dem gleichen Verfahren. Die Mischlösung wurde aus ReLPS- und PmB-Stammlösungen hergestellt und nach dem oben beschriebenen Verfahren behandelt (schütteln, beschallen, abkühlen auf Raumtemperatur) und auf einen ca. 1 x 1 cm großen Träger aus Silizium aufgebracht.

3.2.1.2 *Behandlung von Röntgenproben*

Da sich im Verlauf der Untersuchungen herausstellte, daß die präparierten Mischproben in den Röntgenmessungen in nahezu allen Fällen ein Diffraktogramm gezeigt haben, das keine Auswertung ermöglichte, wurde ein Verfahren entwickelt, das die Aggregationsform unbeeinflusst läßt, aber sowohl die lamellare- als auch die Stapelordnung erheblich verbessert und damit auch eine Auswertung der ReLPS / PmB(N)-Mischsysteme ermöglichte. Eine ausführliche Beschreibung des Verfahrens ist in einer Publikation dargestellt [96], so daß hier nur das Prinzip des Verfahrens kurz skizziert wird.

Die Proben werden nach dem Antrocknen des Lipides, bzw. der Lipidmischung in einen Exsikkator überführt, der eine Kristallisierschale mit Wasser enthält. Der Exsikkator wird so verschlossen, daß entstehender Dampf entweichen kann. Anschließend wird er in einen Trockenschrank gestellt und für 24 - 48 h auf ca. 65°C erhitzt. Dann wird der Exsikkator aus dem Trockenschrank entfernt und der Deckel abgenommen, um die Bildung von Kondenswasser zu vermeiden. Die Probe kühlt innerhalb von 10 min auf Raumtemperatur ab.

3.2.2 *Filmwaage*

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Filmwaage (Hersteller *Mayer Feintechnik*, Göttingen) basiert auf einer von Fromherz modifizierten Anordnung der Langmuir-Apparatur [97]. Die Gesamtfläche der Filmwaage beträgt 362 cm², aufgeteilt in 8 Kompartimente, wovon eines zur Präparation von Langmuir-Blodgett Multischichtpräparaten eine Vertiefung aufweist. Die Kompartimente sind vollständig aus chemisch inertem Teflon (Polytetrafluorethylen-PTFE) gearbeitet und in ein eloxiertes Aluminiumchassis eingesetzt.

Zwei aus Teflon bestehende Barrieren sind an einem 2-Achssystem im Mittelpunkt der Apparatur befestigt und können unabhängig voneinander bewegt werden. An einer Barriere ist zur Messung des Oberflächendrucks eines Monofilms ein Sensor nach dem Wilhelmy-Prinzip angebracht [98]. Die maximale Auflösung im verwendeten Versuchsaufbau liegt bei 0,1 mN/m.

3.2 Durchführung der Experimente

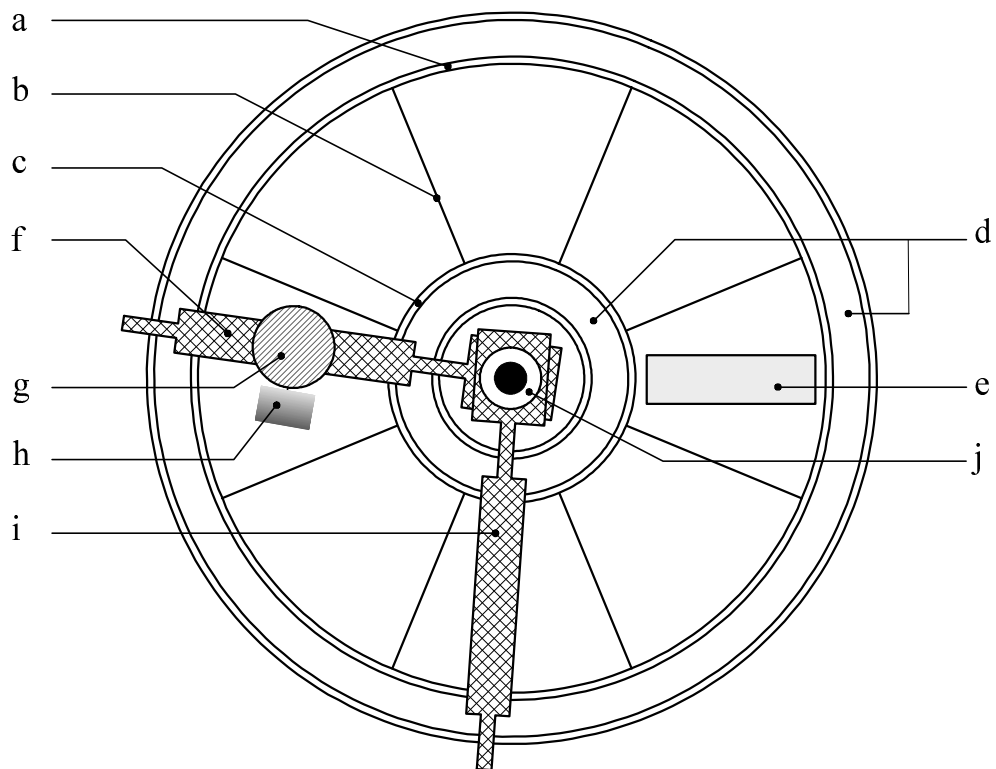


Abbildung 16 Schematischer Aufbau der Filmwaage nach Fromherz. a) äußerer Rand, b) Segmentunterteilung, c) innerer Rand, d) Überlaufgrinnen, e) Vertiefung zum Anfertigen von Multifilmen nach der Langmuir-Blodgett-Methode, f) Barriere mit Drucksensor, g) Drucksensor und h) Wilhelmy-Waage zur Messung des Oberflächendrucks, i) zweite Barriere, j) zentrale Achse

Die von den Barrieren eingeschlossene Fläche wird elektronisch mit Hilfe von zwei Schleifpotentiometern ermittelt. Die Methode erlaubt eine Flächenbestimmung mit einer Genauigkeit von $\leq 0,5 \text{ cm}^2$. Alle Messdaten, wie Druck, Fläche, Temperatur und Luftfeuchtigkeit werden über einen galvanisch getrennten AD-Wandler (12 bit Auflösung) auf einen PC übertragen und parallel dazu auf einem XY-Schreiber aufgezeichnet.

Die Temperatur der Apparatur wird durch einen Thermostat vom Typ **F3**, Firma *Haake*, gekoppelt über einem Wasserbad, geregelt. Messungen sind in einem Temperaturbereich von 10-35°C möglich. Bei höheren Temperaturen kommt es zu Verfälschungen bei der Bestimmung des Oberflächendrucks, da sich der Meniskus der Subphase durch das beschleunigte Abdampfen der Flüssigkeit bei höheren Temperaturen stetig verändert, was

Kapitel 3 Substanzen und Durchführung der Experimente

wiederum einen direkten Einfluß auf die Kalibrierung des Oberflächendruckes hat. Die gesamte Apparatur ist zur Entkopplung von Gebäudeschwingungen auf einer Granitplatte aufgestellt und wird von einer Plexiglashaube vollständig eingeschlossen, um den Einfluß von Luftbewegungen auf die Messungen zu minimieren.

Die Apparatur wurde regelmäßig nach folgender Prozedur durchgeführt [99]: Um organische Substanzen restlos zu entfernen, wurde 0,1 N wässrige HCl mit wäßriger KMnO_4 -Lsg. und katalytischen Mengen Fe^{3+} - oder Mn^{2+} -Ionen versetzt. Diese Lösung wurde über alle Kompartimente verteilt und auf ca. 50 °C erwärmt. Nach 30 min wurde das überschüssige Permanganat mit H_2O_2 reduziert, die Säure mit NaOH neutralisiert und die wässrige Salzlösung abgezogen.

3.2.2.1 Isothermen-Messungen

Zur Messung des Phasenverhaltens und des Flächenbedarfs von ReLPS wurden Isothermen auf verschiedenen Subphasen gemessen. Zunächst wurde das Lipid in reinem Chloroform bzw. in einem ternären Gemisch aus Chloroform/Methanol/Wasser in einem Volumenverhältnis von 47:14:1,5 in Lösung gebracht. Diese Lösung wurde für 5 min in einem Ultraschallbad (*Branson*, 30 W HF-Leistung) beschallt und dann für 15 min. bei 4 - 6°C gelagert. Diese Behandlung wurde mindestens zweimal wiederholt, bis die Lösung klar bzw. nur schwach getrübt war.

Wenn nichts anderes angegeben ist, wurden die Isothermen auf Aqua tridest. als Subphase gemessen. Salz- oder Pufferlösungen wurden ebenfalls aus Aqua tridest. hergestellt. Die Filmwaage wurde auf 21 °C temperiert und die Segmente mit der Subphase befüllt. Mit einer Hamilton-Microliter-Spritze wurden 20-50 µl der Lipidlösung vorsichtig auf die Subphase aufgegeben (gespreitet). Nach Verdunsten des Lösungsmittels (ca. 2 min) wurde die Apparatur mit einem Plexiglasdeckel verschlossen, um Luftbewegungen über dem Monofilm zu minimieren. In den ersten 30 Sek. der Messung wurde für alle Parameter (Druck, Fläche, Temperatur) eine Grundlinie vom Meßrechner aufgezeichnet. Anschließend wurde die Monofilmfläche mit einer Geschwindigkeit von 20 - 30 cm^2 / min . reduziert, während parallel mit einem XY-Schreiber der Oberflächendruck aufgezeichnet wurde. Nach jeder Messung ist die Subphase vollständig ausgetauscht worden. Alle Messungen wurden mehrfach wiederholt,

3.2 Durchführung der Experimente

so daß es sich bei den ermittelten Daten um Mittelwerte aus 3-10 Messungen handelt. Die absolut gemessenen Flächenwerte wurden zur besseren Vergleichbarkeit in Fläche pro Molekül (A [nm^2]) umgerechnet nach:

$$A = \frac{A_{\text{tot}} * M}{v * c * 60,23}$$

(A_{tot} = Fläche in cm^2 , M = Molmasse des Lipides g/mol , v = aufgegebenes Volumen der Lipidlösung in μl und c = Konzentration der Lipidlösung) in mg/ml).

3.2.2.2 Messungen zur Einlagerung aus der Subphase (Isobaren-Messungen)

Die Analyse der Wechselwirkungen von gelösten Substanzen in der Subphase mit Monofilmen erfordert ein anderes Vorgehen. Die einzulagernde Substanz wurde in der Subphase gelöst, wobei die Konzentration mindestens im micromolaren Bereich liegen mußte. Dann wurden zwei Segmente mit dieser Lösung und die restlichen Segmente mit reinem Aqua tridest. aufgefüllt.

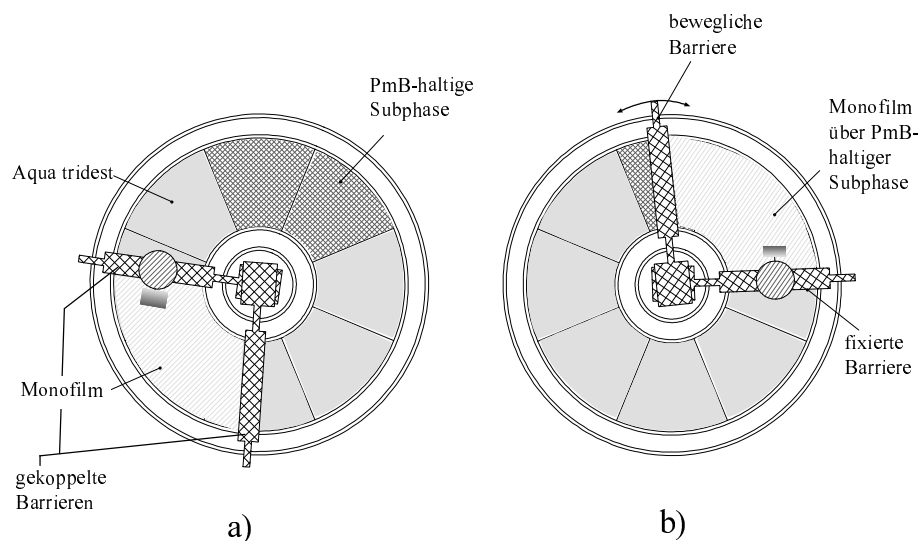


Abbildung 17 Schema des Versuchsablaufes bei der Einlagerung von Substanzen aus der Subphase. Der Monofilm wird zunächst auf Aqua tridest gespreitet (a) und dann auf eine PmB-haltige Subphase transportiert (b).

30 - 60 μl der Lipidlösung wurden dann auf der *reinen* Subphase (Aqua tridest.) gespreitet (s. Abbildung 17a). Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels folgte eine Komprimierung des Monofilms bis zu einem Oberflächendruck von $\pi = 30 \text{ mN/m}$. Nach

Kapitel 3 Substanzen und Durchführung der Experimente

einer kurzen Äquilibrierungsphase von 2 - 3 min. wurden die beiden Barrieren gekoppelt, so daß die eingeschlossene Fläche (A_{start}) konstant blieb. Es folgte ein zügiger Transport des Monofilms (ca. 2 min) über die Subphase, in der die zu untersuchende Substanz gelöst war (s. Abbildung 17b). Nach der Entkopplung der beiden Barrieren wurde der Oberflächendruck wieder durch die Steuerelektronik durch Veränderung der Monofilmfläche nachgeregelt.

Der Meßrechner zeichnete über den gesamten Zeitraum mit einer Frequenz von 1 Hz alle Parameter (Druck, Fläche, Temperatur, Luftfeuchtigkeit) auf. Alle Messungen wurden ebenfalls mindestens zweimal wiederholt. Die Flächenänderung berechnet sich aus dem Quotienten der Monofilmfläche des Monofilms am Ende des Experiments (A_{Ende}), zur Fläche unmittelbar *nach* der Entkopplung der Barrieren (A_{start}) vor der Einlagerung.

$$\Delta A = 100 * \frac{A_{Ende}}{A_{Start}} \quad \begin{array}{l} \Delta A < 100 \text{ Abnahme der Monofilmfläche} \\ \Delta A = 100 \text{ keine Flächenänderung} \\ \Delta A > 100 \text{ Zunahme der Monofilmfläche} \end{array}$$

3.2.3 DSC-Messungen

DSC Messungen wurden am Fritz-Haber-Institut (Berlin) an einem Kalorimeter vom Typ MicroCal MC-2 (MicroCal Northampton, Mass., USA) von Dr. J. Frank durchgeführt. Für die Messungen wurde die Probenzelle ($V = 1,2249 \text{ ml}$) mit einer Lösung von *S. minnesota* ReLPS in Aqua tridest. mit einer Konzentration von 1 - 2,5 mg / ml befüllt (pH = 6,5). Bei allen DSC-Messungen wurde unter ständigem Rühren dreimal der Temperaturbereich von 5 - 55 °C mit einem Temperaturgradienten von 20 °C / h durchlaufen.

Mischsysteme definierter Stöchiometrie von ReLPS mit PmB wurden durch Mischen von Polymyxin B-Lösungen ($c_{PmB} = 0,25 - 1,0 \text{ mg/ml}$ in Aqua tridest.) mit ReLPS-Lösungen hergestellt.

ReLPS von *E. coli* wurde sowohl in reinem Aqua tridest (resultierender pH $\approx 3,2$), als auch in Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH = 7,5) mit einer Konzentration von $c_{E.coli} = 1,0 - 2,5 \text{ mg/ml}$ gelöst. Mischungen von *E. coli* ReLPS mit PmB wurden nur in Tris-HCl-Puffer bei einem pH von 7,5 untersucht.

3.2 Durchführung der Experimente

Die gemessene Wärmekapazität C_p (J/°C) kann durch Einbeziehung des Zellvolumens und der Konzentration in die molare Wärmekapazität C_p^m (kJ/mol/°C) umgerechnet werden. Die Phasenübergangstemperatur T_m (°C) wurde am Maximum der Wärmekapazität nach Abzug der Grundlinie der jeweiligen Messung bestimmt. Die berechnete Fläche unter der DSC-Kurve entspricht der Phasenumwandlungsenthalpie ΔH_{cal} (kJ/mol).

3.2.4 ITC-Messungen

Die Messungen zur Isothermen-Titrations-Kalorimetrie (ITC) wurden ebenfalls von Dr. J. Frank am Fritz-Haber-Institut (Berlin) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde ein hochempfindliches OMEGA-Mikrokalorimeter der Firma MicroCal Inc. (Northampton, MA, U.S.A.) verwendet. Das Gerät wurde durch ein elektrisches Testsignal kalibriert.

Zur Titration wurde ReLPS von *S. minnesota* in Aqua tridest. mit einer Konzentration von $c_{s, min.} = 0,2$ mM gelöst und in die Probenzelle ($V = 1.3592$ ml) gefüllt. In der Referenzzelle befand sich Aqua tridest., dem 0,05% Azid zugesetzt war. Eine 100 μ l-Hamiltonspritze wurde mit einer PmB-Lösung ($c_{PmB} = 2,9 - 7,2$ mM) gefüllt. Nach der thermischen Äquilibration des gesamten Systems sind jeweils 5 μ l der PmB-Lösung in Abständen von 5 min in die Probenzelle injiziert worden. Um eine vollständige Vermischung der Lösung sicherzustellen, wurde während der ganzen Messung die Flüssigkeit in der Zelle mit 400 Umdrehungen pro Minute gerührt. Aus der resultierenden Auftragung der Wärme-freisetzung über der Zeit (Injektionsnummer) ist die Stöchiometrie n , die Bindungskonstante K und die Bindungsenthalpie ΔH der Wechselwirkung von ReLPS mit PmB bei der jeweiligen Temperatur (25 °C und 37 °C) berechnet worden.

Analog wurden die Messungen für ReLPS von *E. coli*, gelöst in 5 - 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH = 7,5), durchgeführt.

3.2.5 Cryo-Elektronenmikroskopie

Die Cryo-elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind von Dr. Jaeger am Fritz-Haber Institut (Berlin) angefertigt worden. Bei dem verwendeten Gerät handelt es sich um eine Eigenentwicklung des Instituts (DEEKO 250) [72].

Kapitel 3 Substanzen und Durchführung der Experimente

1 mg ReLPS von *S. minnesota* wurde in 200 μl Aqua tridest. gelöst und für einige Minuten auf 50 °C erhitzt. Eine Äquilibrierung der klaren Lösung erfolgte für 30 min bei einer Temperatur von 25°C bzw. 37 °C. Anschließend wurde ein kleiner Tropfen auf ein Kupfer-Grid gegeben und dieses sofort in flüssigem Propan eingefroren.

ReLPS / PmB-Mischungen wurden durch Zugabe von PmB-Lösung zur ReLPS-Lösung und anschließendem Erwärmen auf 50 °C hergestellt. Weder die reinen ReLPS-Lösungen noch die Mischungen mit Polymyxin wurden mit Ultraschall behandelt. Insgesamt wurden vier verschiedene Proben hergestellt:

- a) reines ReLPS bei 25 °C
- b) reines ReLPS bei 37 °C
- c) ReLPS / PmB ($n = 0.7$) bei 25 °C
- d) ReLPS / PmB ($n = 0.7$) bei 37 °C.

3.2.6 Dynamische Lichtstreuung

Die Experimente zur dynamischen Lichtstreuung wurden von J. Schüler am Institut für Kristallographie, FU-Berlin, durchgeführt. Für die Messungen wurden Mischungen von ReLPS und PmB unterschiedlicher Molarität ($c \approx 1 \text{ mmol}$) aus Aqua tridest. hergestellt und vor der Messung durch einen sterilen Filter (Sartorius, Porengröße 200 nm) gefiltert. Die Messungen erfolgten unter Verwendung eines ALV SP-86 Spektrogoniometers und einem Adlas DPY 315 II-Lasers (532 nm). Das Meßsignal wurde mit einem Thon EMI D 191 A Photomultiplier aufgenommen, verstärkt und digitalisiert. Alle Messungen wurden bei einem Streuwinkel von 20° durchgeführt. Für jeden Meßpunkt wurden jeweils 20 Spektren ($\approx 30 \text{ sek}$) aufgenommen. Die Spektren wurden über das Programm CONTIN [73,74] in hydrodynamische Radien umgerechnet, gemittelt und gegen das molare Mischungsverhältnis aufgetragen.

3.2.7 Molekül-Dynamik Simulation von LPS Membranen

3.2.7.1 Generierung der Membranen

In allen MD-Simulationen wurde ausschließlich mit einer einzigen Strukturvariante von *E. coli* ReLPS gearbeitet. Die chemische Struktur entspricht dem in Abbildung 15 gezeigten Aufbau mit $R_1\text{-}R_4 = \text{H}$.

3.2 Durchführung der Experimente

Als Ausgangskonformation des ReLPS wurde ein von Kastowsky et al. publiziertes Modell verwendet [21]. Zur Erzeugung einer Packung wurde auf ein von Kastowsky entwickeltes Verfahren zurückgegriffen [95]. Im folgenden wird nur das Prinzip dieser Methode kurz erläutert.

Ein einzelnes Molekül wird im Koordinatenursprung fixiert. Ein zweites Molekül desselben Typs wird nacheinander auf einer Reihe von Startpositionen rund um das erste Molekül plaziert. Anschließend wird die räumliche Anordnung der beiden Moleküle zueinander mit dem Programm »MOLECULE« nach dem »Rigid-Body«-Verfahren minimiert [95], wobei die Konformation beider Moleküle unverändert bleibt. Bei diesem Schritt sind sowohl Translation als auch Rotation des zweiten Moleküls erlaubt. Die minimierten Dimere werden in Bezug auf ähnliche Positionen des zweiten Moleküls in Gruppen zusammengefaßt und entsprechend der Energie sortiert. Die energetisch günstigsten Anordnungen werden anschließend daraufhin untersucht, ob der Aufbau einer geschlossenen Membran möglich ist.

3.2.7.2 Randbedingungen der MD-Simulation

Die Simulationsrechnungen wurden unter Verwendung eines einheitlichen Kraftfeld-Parametersatzes mit der kommerziellen Version des Programms CharmM 22 (MSI) und mit der neueren Version CharmM 24g1 (Karplus) durchgeführt. Testrechnungen mit kleinen Systemen zeigten eine sehr gute Übereinstimmung beider Programmversionen. Der verwendete Parametersatz beruht auf dem Standardparametersatz von CharmM 22 und der Erweiterung für Phospholipide von Schlenkrich [86, 87].

Für alle MD-Simulationen wurden identische Einstellungen der Programmparameter gewählt. Die verwendeten Parameter der Steuerungsdatei der Simulation basieren auf umfangreichen Vorrechnungen. Die Einstellungen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Dort finden sich ebenfalls weitere technische Angaben der verschiedenen Simulationsrechnungen.

Die Simulationen wurden bei einer Temperatur von 350 K durchgeführt. Durch die höhere Temperatur werden sowohl konformationelle Veränderungen als auch Modifikationen des Packungsmusters während der Simulation beschleunigt. Somit können instabile, bzw. auch potentiell metastabile Systeme früher erkannt werden, was bei dem extrem hohen Rechenzeitbedarf von Membransystemen von sehr großer Bedeutung ist.

Kapitel 3 Substanzen und Durchführung der Experimente

Für die Durchführung einer Membran-Simulation wurden die Koordinaten der Packung und anschließend die Angaben zur Erzeugung der zweidimensionalen periodischen Randbedingungen eingelesen. Das System wurde vor der eigentlichen Simulation nach dem Verfahren des größten Gradienten (steepest descents) und nach einem modifizierten Newton-Raphson-Verfahren in je 2500 Schritten minimiert [100], um ungünstige Wechselwirkungen, die durch den Aufbau der Packung entstanden sein konnten, zu beseitigen. Dann erfolgte die Simulation entsprechend den Angaben in Tabelle 1.

Tabelle 1 CharmM-Parameter der MD-Simulationen.

Keyword	Wert	Erläuterung
TIME	0,001	Zeitschritt in ps
CDIE	x	Dielektrizitätswert wird konstant gehalten (ansonsten entfernungsabhängig)
EPS	1 80	} Wert der Dielektrizitätskonstanten
	in Wasser im Vakuum	
IMGFRQ	25	Schritte bis zur Neuberechnung der Nichtbindenden-WW. mit den periodischen Kopien
IHTFRQ	50	In der Aufheizphase wird alle IHTFRQ-Schritte die Temperatur um TEMINC erhöht
INBFRQ	25	Schritte bis zur Neuberechnung der Liste nichtbindender Wechselwirkungen
CUTNB	12	CutOff-Radius für nichtbindende Wechselwirkungen
FIRSTT	0	Temperatur zu Beginn der Simulation
FINALT	350	Simulationstemperatur
TEMINC	1,75	Temperatur Inkrement in K (s. auch IHTFRQ)
NSTEP (HEAT)	10.000	Schritte der Aufheizphase (10 ps)
NSTEP (EQUIL)	25.000	Schritte der Äquilibrierungsphase (25 ps)
NSTEP	100.000	Schritte der Simulation (100 ps, bzw. 200ps)
(SIMU)	200000	

Die Dielektrizitätskonstante wurde bei Simulationen im Vakuum auf einen Wert von $\epsilon = 80$ gesetzt. Bei explizierter Berücksichtigung von Wasser im Simulationsensemble wurde ein Wert von $\epsilon = 1$ gewählt. Für die Auswertung wurde immer die gesamte Simulationsdauer nach der Äquilibrierungsphase herangezogen (~ 100 ps). Die Aufheiz- und Äquilibrierungsphase wurde im allgemeinen nicht in der Auswertung berücksichtigt. Die Auswertung erfolgte ausschließlich mit selbst entwickelten Programmen.