

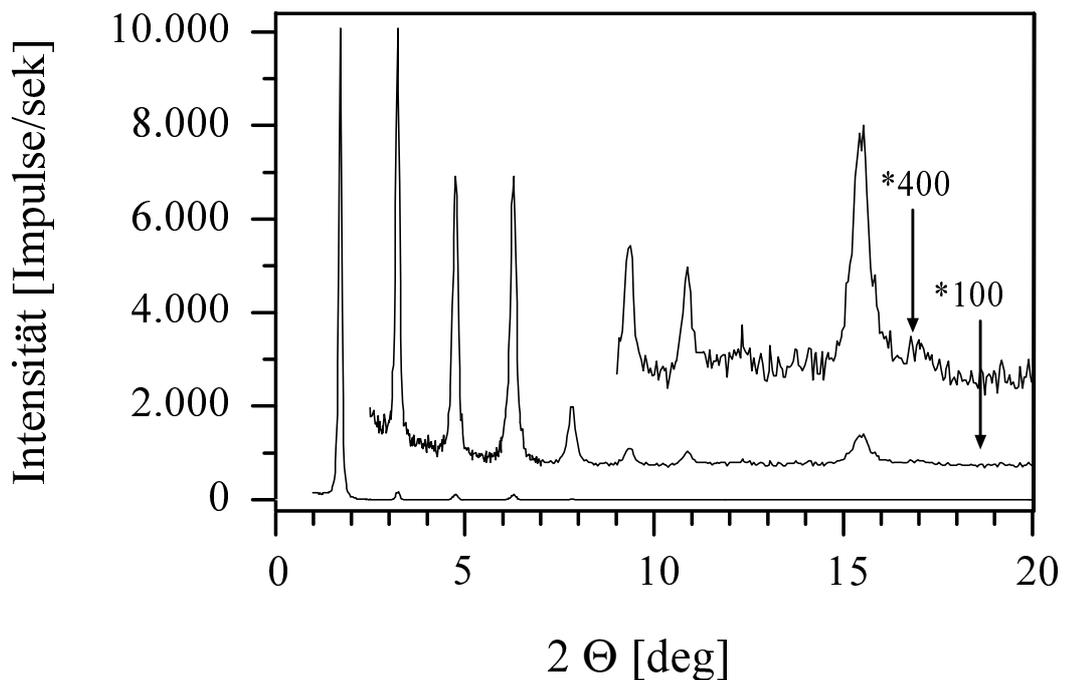
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Röntgenuntersuchungen

Im folgenden werden die Resultate für reine ReLPS-Multischichtsysteme präsentiert. Anschließend werden die Ergebnisse der unterschiedlichen Mischsysteme ReLPS / PmB(N) dargestellt. Alle Röntgenuntersuchungen sind, wenn es nicht anders angegeben ist, an ReLPS R595 von *Salmonella minnesota* durchgeführt worden.

#### 4.1.1 Beugungsbild reiner ReLPS-Multischichtpräparate von *Salmonella minnesota*

Im Abbildung 18 ist exemplarisch die Streukurve einer hoch gereinigten ReLPS-Probe (ReLPS HL 57, *Salmonella minnesota*, natürliche Salzform) abgebildet. Die Probe zeigt Reflexe bis zur 10. Ordnung, wobei die achte und die neunte Ordnung fehlen.



**Abbildung 18** Typische Streukurve einer ReLPS-Probe. Die Präparation erfolgte durch antrocknen einer wäßrigen Suspension.

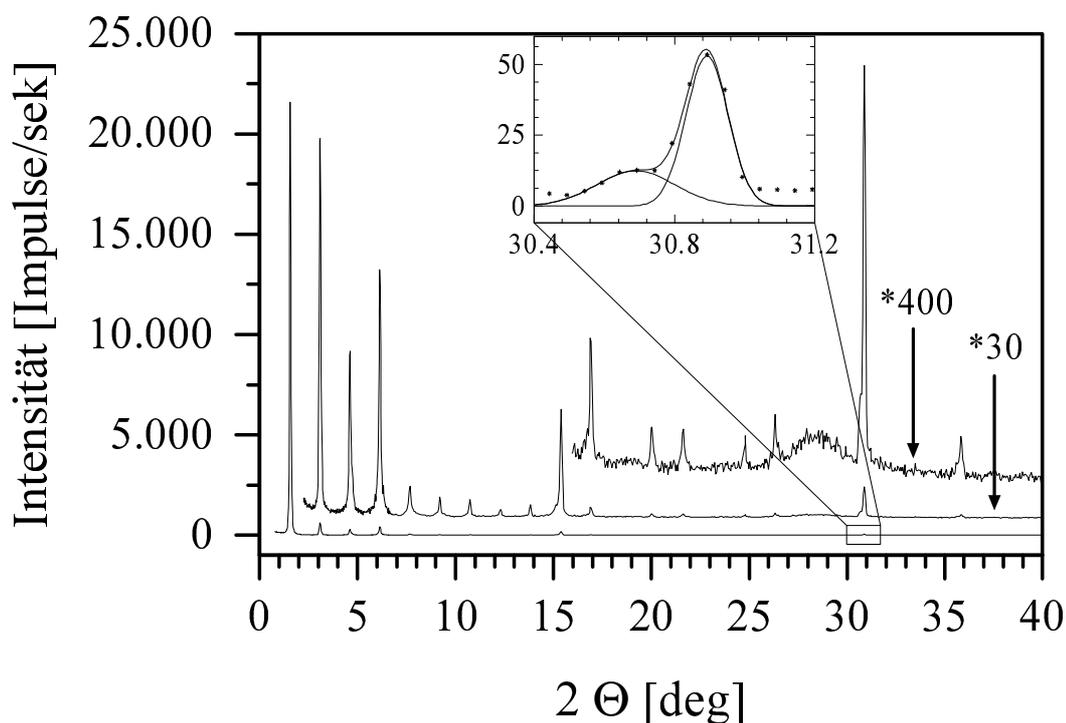
## Kapitel 4 Ergebnisse

Nach 48 stündigem Tempern zeigte diese Probe eine bemerkenswerte Verbesserung der Streukurve. Es sind Reflexe bis zur 23. Ordnung zu erkennen. In der nachfolgenden Tabelle sind alle Daten zu dieser Messung zusammengefaßt.

**Tabelle 2** *Diffraaktionsdaten einer hoch geordneten ReLPS-Multischichtprobe. Die meisten Reflexe zeigen eine einheitliche Halbwertsbreite, lediglich bei den höheren Ordnungen ist eine allmähliche Verbreiterung zu beobachten. Der Doppelschichtabstand dieser Probe beträgt  $d = 5,74 \pm 0,01$  nm.*

<b>Ordnung</b>	<b>rel. Intensität [%]</b>	<b><math>2 \Theta</math> [deg]</b>	<b>Halbwertsbreite d. Reflexe [deg]</b>
1	100,000	1,570	0,04
2	2,920	3,090	0,05
3	1,120	4,620	0,06
4	1,780	6,130	0,05
5	0,220	7,670	0,07
6	0,160	9,210	0,05
7	0,130	10,750	0,05
8	0,060	12,300	0,06
9	0,090	13,830	0,05
10	0,060	15,430	0,06
11	0,080	16,920	0,06
12	-	-	-
13	0,020	20,040	0,09
14	0,020	21,620	0,09
15	-	-	-
16	0,020	24,770	0,08
17	0,030	26,330	0,07
18	-	-	-
19	-	-	-
20	0,040	30,690	0,11
21	-	-	-
22	-	-	-
23	0,020	35,850	0,14

## 4.1 Röntgenuntersuchungen



**Abbildung 19** Streukurve einer hoch geordneten ReLPS-Multischichtprobe. Die zehnte und die zwanzigste Ordnung setzen sich aus einer Überlagerung zweier Reflexe zusammen. Im vergrößerten Ausschnitt ist die gute Übereinstimmung der Meßwerte (durchgezogene Linie) mit der Überlagerung zweier Gauss-Funktionen (gestrichelte Linien) zu erkennen.

### 4.1.2 Polymyxin B / ReLPS-Mischsysteme

Die Streukurven von PmB / ReLPS-Mischsystemen zeichnen sich im Vergleich zu reinen ReLPS-Multischichtpräparaten in erster Linie durch eine deutlich reduzierte Intensität bei gleichzeitiger Verbreiterung der Reflexe aus. Mit zunehmendem Polymyxinanteil nimmt bei den Mischsystemen die Halbwertsbreite der Reflexe weiter zu, während die Anzahl der beobachteten Reflexe und die Streukraft der Proben deutlich abnimmt.

## Kapitel 4 Ergebnisse

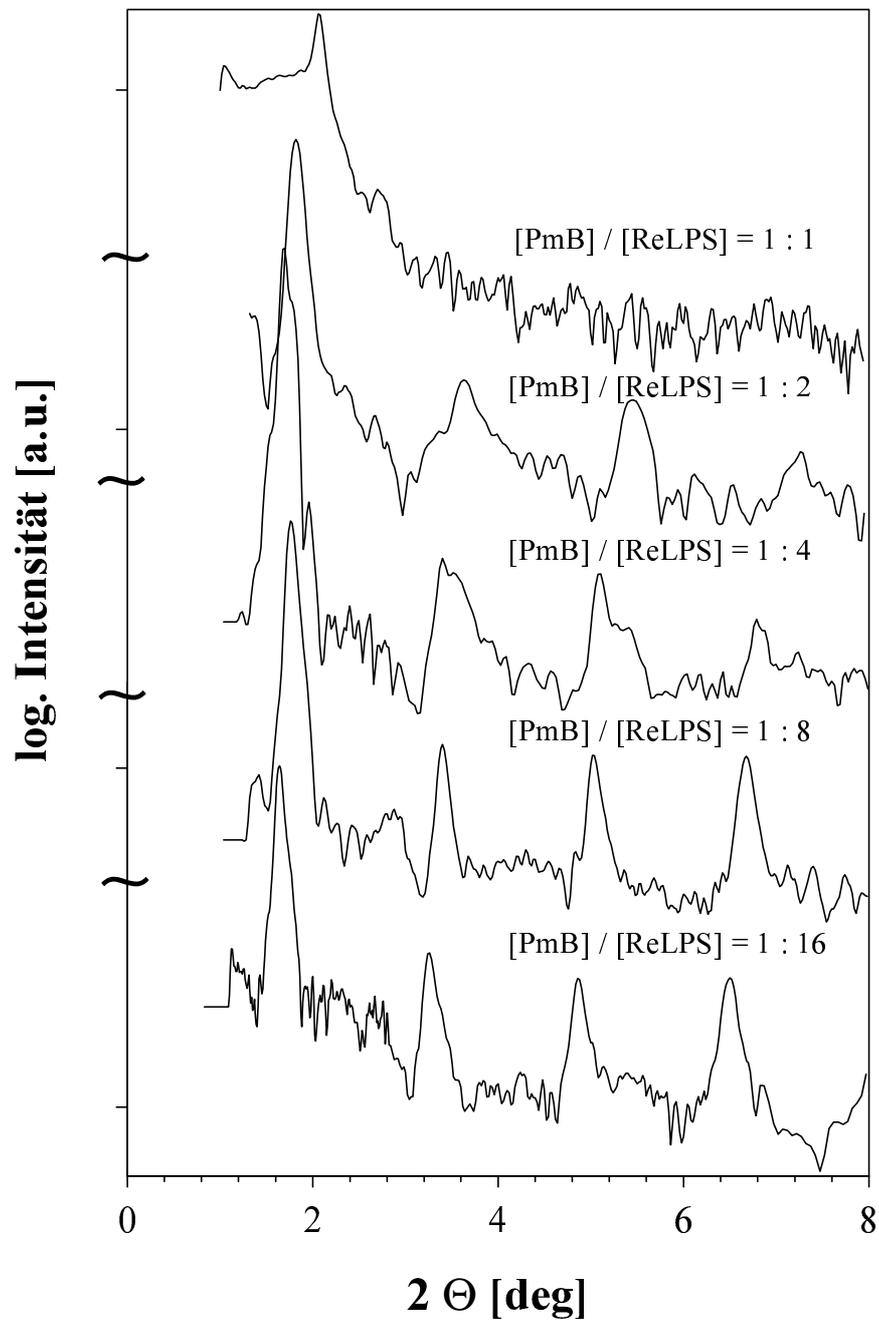
Es finden sich ausschließlich Reflexe einer Periodizität. Für diese Periodizitäten kann von einer homogenen Mischung beider Substanzen ausgegangen werden. Auffällig ist die in Tabelle 3 gezeigte stetige Abnahme des Doppelschichtabstandes mit zunehmendem Polymyxinanteil. Der d-Wert der äquimolaren Mischung ReLPS / PmB (1:1) wurde nur aus der ersten Ordnung berechnet und ist daher mit einem großen Fehler behaftet. Auch dieser Wert liegt auf der linearen Extrapolation des Doppelschichtabstandes als Funktion des Mischungsverhältnisses.

**Tabelle 3** Doppelschichtabstand der PmB/ReLPS Mischsysteme. Während die Anzahl der beobachteten Reflexe bei allen Mischsystemen ähnlich ist, nimmt der Doppelschichtabstand kontinuierlich mit steigendem PmB-Gehalt ab.

<i>Probe</i>	<i>n [PmB] in [mol]</i>	<i>n [ReLPS] in [mol]</i>	<i>Reflex- anzahl</i>	<i>Doppelschicht- abstand [nm]</i>	<i>mittlere Halb- wertsbreite [deg]</i>
I	0,0	1,0	22	5,74±0,01	0,05
II	1,0	16,0	7	5,45±0,03	0,05
III	1,0	8,0	4	5,34±0,09	0,04
IV	1,0	4,0	3	5,23±0,06	0,08
V	1,0	2,0	3	4,88±0,06	0,08
VI	1,0	1,0	1	4,49±0,43	0,13

Die Mischprobe **II** zeigt Reflexe bis zur siebten Ordnung. Eine weitere Steigerung des PmB-Anteils reduziert die Anzahl der Reflexe. Für Probe **VI**, bei einem Polymyxinanteil von 50%, ist nur noch die erste Ordnung zu beobachten.

#### 4.1 Röntgenuntersuchungen



**Abbildung 20** Vergleich der Streukurven unterschiedlicher PmB / ReLPS-Mischungen. Man erkennt eine deutliche Zunahme des Abstandes der einzelnen Reflexe mit steigendem Polymyxingehalt, d.h. eine Abnahme der Schichtdicke. Außer bei der äquimolaren Mischung sind immer die ersten drei lamellaren Ordnungen zu erkennen. Alle Mischsysteme zeigen im Vergleich zu reinen ReLPS-Multischichtpräparaten nur wenige und schwach ausgeprägte Reflexe (vergl. Abbildung 18). Die dargestellten Kurven wurden zur besseren Übersicht geglättet.

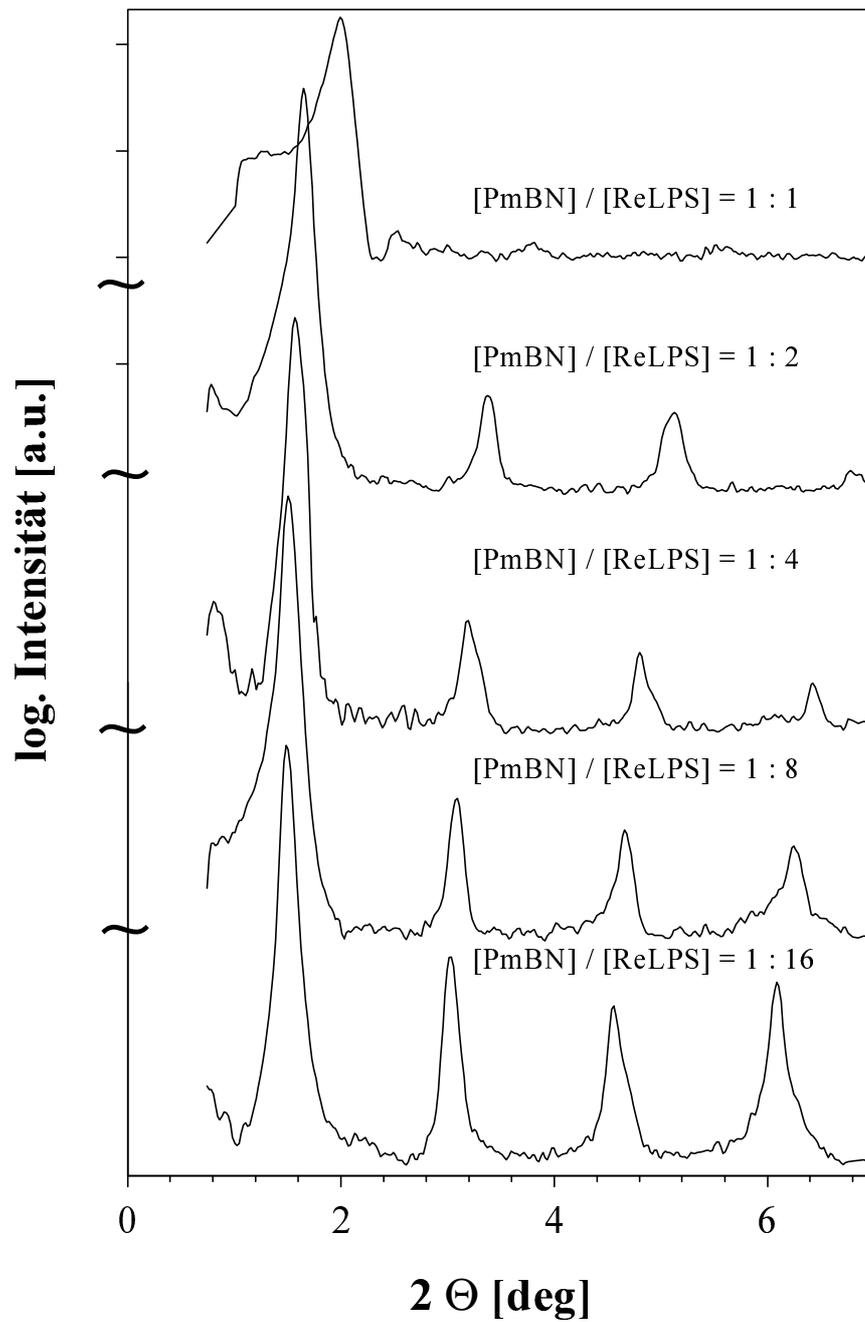
### 4.1.3 Polymyxin B-Nonapeptid / ReLPS-Mischsysteme

Bei den Mischsystemen PmBN / ReLPS wird ein ähnliches Verhalten beobachtet wie für PmB / ReLPS-Mischungen. Die Abnahme des Doppelschichtabstandes fällt allerdings bei gleichem Molverhältnis der Mischungen geringer aus als bei den vergleichbaren PmB / ReLPS-Proben. Ebenso ist die Halbwertsbreite der Reflexe in allen Fällen größer. Die beobachtete Reflexanzahl nimmt von fünf auf drei ab. Auch bei der äquimolaren Mischung sind noch drei Reflexe zu beobachten, die allerdings schwach ausgeprägt sind (s. Abbildung 21) gezeigt. Alle PmBN / ReLPS-Proben zeigen ein deutlich besseres Signal-Rauschverhältnis als die entsprechenden PmB-Mischproben.

**Tabelle 4** Halbwertsbreite und Doppelschichtabstand der PmBN/ReLPS-Mischungen. Die Anzahl der beobachteten Reflexe der einzelnen Mischungen ist vergleichbar mit den korrespondierenden PmB/ReLPS-Mischsystemen. Allerdings verringert sich der Doppelschichtabstand, bezogen auf den PmBN-Anteil deutlich langsamer, als für die entsprechenden PmB/ReLPS-Mischungen.

<i>Probe</i>	<i>n [PmBN] in [mol]</i>	<i>n [ReLPS] in [mol]</i>	<i>Reflex- anzahl</i>	<i>Doppelschicht- abstand [nm]</i>	<i>mittlere Halb- wertsbreite [deg]</i>
I	0,0	1,0	22	5,74±0,01	0,05
II	1,0	16,0	5	5,75±0,03	0,06
III	1,0	8,0	5	5,63±0,03	0,08
IV	1,0	4,0	4	5,46±0,03	0,09
V	1,0	2,0	4	5,16±0,04	0,09
VI	1,0	1,0	3	4,93±0,03	0,15

#### 4.1 Röntgenuntersuchungen



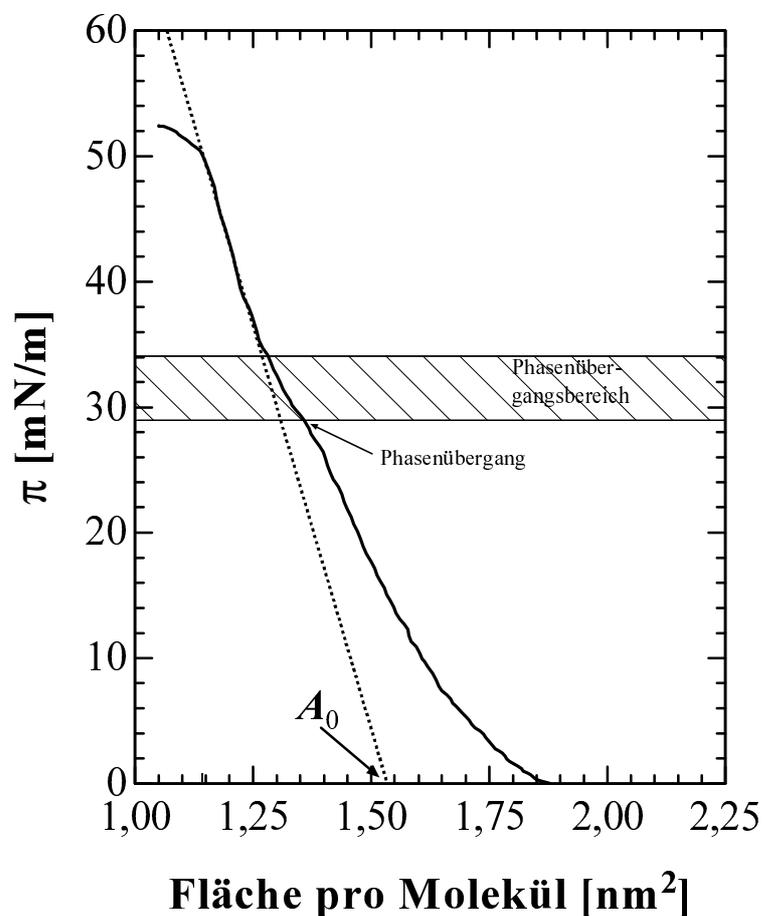
**Abbildung 21** Vergleich der Streukurven der verschiedenen PmBN / ReLPS-Mischproben. Die dargestellten Kurven wurden zur besseren Übersicht analog zu Abbildung 20 geglättet.

## 4.2 Monofilmentuntersuchungen an ReLPS

Es folgen zunächst die Meßergebnisse der beiden reinen ReLPS-Systeme. Anschließend werden die Wechselwirkungen von ReLPS-Monofilmen mit Polymyxin B und Polymyxin B-Nonapetid dargestellt.

### 4.2.1 Charakteristika von *Salmonella minnesota* ReLPS

In Abbildung 22 ist eine typische Isotherme von *Salmonella minnesota* R595 ReLPS auf Aqua tridest. bei Raumtemperatur (21°C) dargestellt.



**Abbildung 22** Isotherme von ReLPS auf Aqua tridest. bei 21 °C. Die punktierte Linie stellt die Tangente zur Bestimmung des  $A_0$ -Wertes dar. Der Beginn des Phasenübergangs ( $\pi = 29\text{mN/m}$ ) ist durch ein Pfeil gekennzeichnet. Der gesamte Bereich des Phasenübergangs ist schraffiert dargestellt.

## 4.2 Monofilmentersuchungen an ReLPS

Ein lateraler Druck wird ab einer Flächenbelegung von  $\sim 1,85 \text{ nm}^2$  beobachtet. Die Fläche pro ReLPS Molekül beträgt bei der in Abbildung 22 gezeigten Messung  $A_0 = 1,54 \text{ nm}^2$ , d.h.  $\sim 0,24 \text{ nm}^2$  pro Fettsäure. Der Verlauf der Isotherme ist zunächst von einem schnellen Anstieg des lateralen Drucks geprägt.

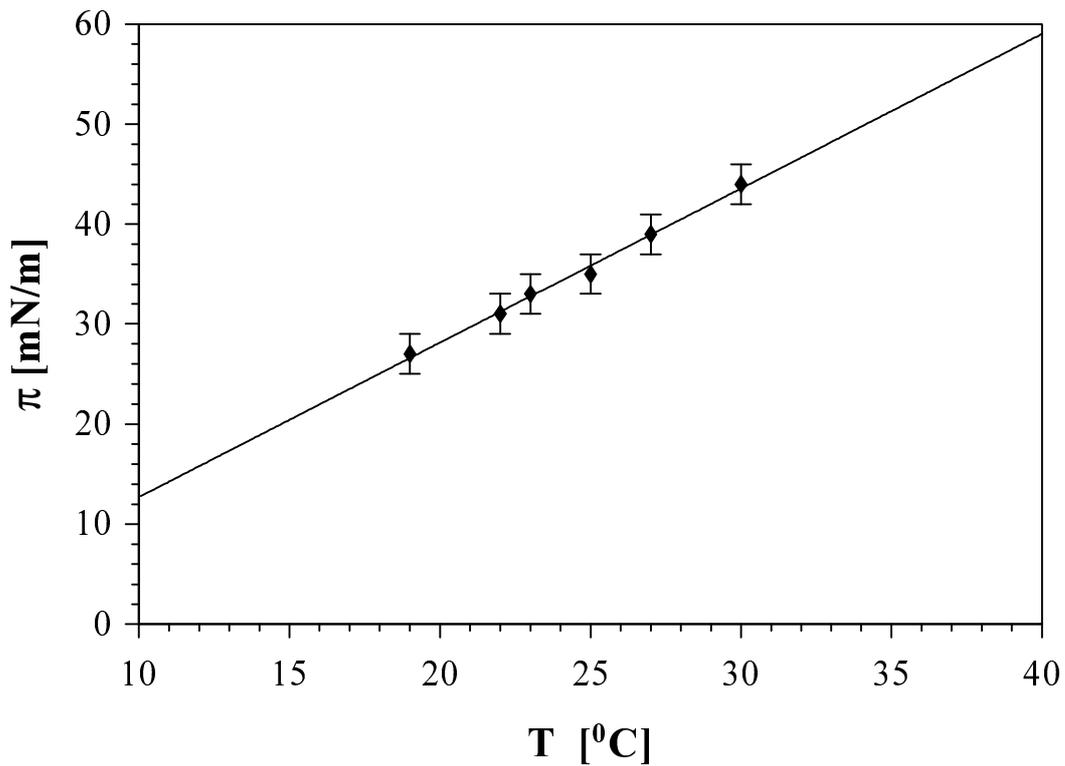
Der Phasenzustand der Lipide kann bei Monofilmentexperimenten nicht direkt ermittelt werden. Da in der Regel alle Lipide einen zumindest ähnlichen Phasenverlauf zeigen, werden im folgenden die einzelnen Bereiche der Isothermen von ReLPS in Analogie zu Phasendiagrammen von Phospholipiden (s. Abbildung 8) bezeichnet.

Der Beginn des Übergangs von ReLPS-Monofilmen in den Koexistenzbereich der flüssig-/ fest-analogen Phase ist bei einem Druck von  $\sim 29 \pm 1 \text{ mN/m}$  nur sehr schwach ausgeprägt. Der Mittelwert des Phasenübergangsbereichs aller Messungen liegt für reine *S. minnesota* ReLPS-Monofilme bei  $\pi_{\text{ph}} = 31 \pm 3 \text{ mN/m}$ . Nach dem Phasenübergang befindet sich der Monofilm im fest-analogen Zustand. Die Steigung der Isotherme fällt nur geringfügig größer aus als im flüssig-analogen Bereich. Der Monofilm kollabiert bei einem Druck von  $\pi_{\text{k}} = 50 \text{ mN/m}$ .

Die Flächenbelegung pro Molekül beträgt am Kollaspunkt im gezeigten Beispiel  $A_{\text{k}} = 1,14 \pm 0,01 \text{ mN/m}$ . Die Kollaspunkte der Monofilme und der Beginn des Phasenübergangs variieren für verschiedene SIGMA-Chargen im Bereich von  $\pi_{\text{ph}} = 27\text{-}32 \text{ mN/m}$ . Innerhalb einer Charge fallen die Variationen bei verschiedenen Meßserien deutlich geringer aus und bewegen sich in einem Bereich von  $\Delta\pi_{\text{ph}} = \pm 1 \text{ mN/m}$  und  $\Delta A_0 = \pm 0,02 \text{ nm}^2$ . Für ReLPS R595 von *Salmonella minnesota* wurde für die im folgenden verwendete Charge eine mittlere Flächenbelegung von  $A_0 = 1,59 \pm 0,02 \text{ nm}^2$  gemessen.

Die Temperaturabhängigkeit des Phasenübergangs von ReLPS ist in Abbildung 23 zusammengefaßt. Alle eingezeichneten Werte wurden auf Aqua tridest. bestimmt. Die Temperaturabhängigkeit des Phasenübergangs wurde aus der Steigung ermittelt und ergibt eine Geradengleichung der folgenden Form:  $\pi(T) = -2,734 + T [\text{°C}] * 1,5442 [\text{mN m}^{-1} \text{°C}^{-1}]$ .

## Kapitel 4 Ergebnisse



**Abbildung 23** Temperaturabhängigkeit des Phasenübergangs von ReLPS von *Salmonella minnesota* auf Aqua tridest.

**Tabelle 5** Einfluß verschiedener Ionen in unterschiedlichen Konzentrationen auf den Phasenübergang und den Kollapsunkt von ReLPS von *Salmonella minnesota* R595 bei 22°C. Für alle Messungen wurde das Material einer einzigen Charge verwendet.

<i>Subphase</i>	<i>c</i> [ $\mu\text{mol/l}$ ]	<i>Phasenübergang</i> [mN/m]	<i>Kollapsunkt</i> [mN/m]
aqua tridest.	-	31 ± 1	67 ± 5
NaCl	25	34 ± 1	70 ± 5
NaCl	250	38 ± 1	68 ± 5
NaCl	2500	40 ± 1	65 ± 5
MgCl <sub>2</sub>	12,5	36 ± 1	65 ± 5
CaCl <sub>2</sub>	12,5	25 ± 1	55 ± 5
BaCl <sub>2</sub>	12,5	21 ± 1	61 ± 5

## 4.2 Monofilmentersuchungen an ReLPS

Der Phasenübergang wird durch Ionen und auch durch Puffersubstanzen stark beeinflusst. Die Verwendung von TRIS zur pH-Einstellung hebt den Phasenübergang soweit an, daß ein ReLPS-Monofilm kollabiert, bevor der Phasenübergang erreicht wird. Der Einfluß von Ionen in der Subphase ist in der Tabelle 5 zusammengefaßt.

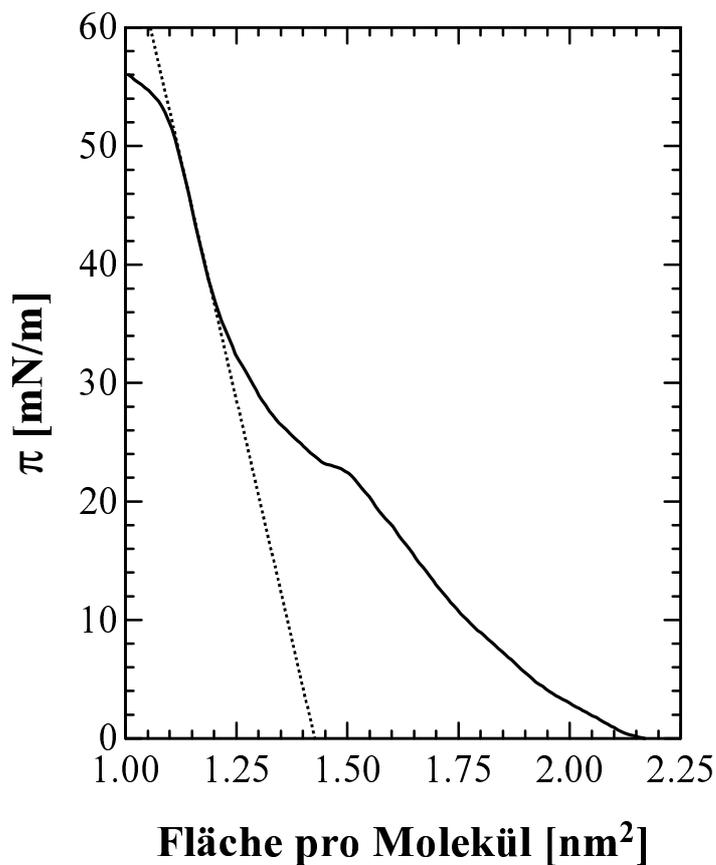
Während der Phasenübergang mit zunehmender Ionenstärke zu höherem Druck verlagert wird, bleibt der Kollapsdruck nahezu unbeeinflusst. Eine Ausnahme bilden  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{BaCl}_2$ . Kalziumionen senken den Kollapsdruck um 12 mN/m, während Bariumionen einen ReLPS-Monofilm weniger destabilisieren und den Kollapsdruck auf einen Druck von 61 mN/m reduzieren.

Der Phasenübergang wird durch Magnesiumchlorid, wie durch die einwertigen Kationen angehoben, während  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{BaCl}_2$  den Phasenübergang zu deutlich kleineren Drücken verschieben.

### 4.2.2 Charakteristika von ReLPS-Monofilmen von *Escherichia coli*

Da nur sehr wenig Material des hoch gereinigten ReLPS von *E. coli* zur Verfügung stand, wurden zur Charakterisierung dieses LPS nur Isothermen auf Aqua tridest. gemessen.

In Abbildung 24 ist eine für hoch reines *E. coli* ReLPS typische Isotherme abgebildet. Ein lateraler Druck baut sich ab einer Flächenbelegung von  $A_0 = 2,20 \text{ nm}^2$  pro Molekül auf. Bis zum Beginn des Phasenübergangsbereiches des Monofilms bei einem Druck von  $\pi_{\text{ph}} = 23,5 \pm 1 \text{ mN/m}$  ist der Druckanstieg im flüssig-analogen Bereich bei der Kompression des Monofilms gering. Der Koexistenzbereich der flüssig-analogen und der fest-analogen Phase ist ausgeprägt. Im anschließenden fest-analogen Gebiet steigt der Druck während der Kompression des Monofilms sehr schnell an. Die Fläche pro Molekül beträgt  $A_0(E. coli) = 1,45 \pm 0,09 \text{ nm}^2$ , der Kollapsdruck wird bei  $K_p = 60 \pm 5 \text{ mN/m}$  beobachtet.



**Abbildung 24** Isotherme von reinem *E.coli* ReLPS auf Aqua tridest. bei 22° C. Bis zum Beginn des sehr ausgeprägten Phasenübergangs bei einem Druck von  $\pi_{\text{ph}} = 23,5 \pm 1$  mN/m ist ein langsamer Anstieg des lateralen Drucks zu beobachten. Der Monofilm kollabiert bei  $\pi_{\text{K}} \sim 54$  mN/m.

#### 4.2.3 Wechselwirkung von PmB(N) mit ReLPS-Monofilmen

Die Wechselwirkung von Polymyxin B und von Polymyxin B-Nonapetid mit ReLPS wurde durch Einlagerung aus der Subphase bei einem lateralen Druck von 30 mN/m und einer Temperatur von  $21,0 \pm 0,5$  °C untersucht. Die in Tabelle 6 angegebenen Werte stellen Mittelwerte aus jeweils 8 bis 10 Messungen dar.

## 4.2 Monofilmmuntersuchungen an ReLPS

**Tabelle 6** Flächenänderung eines ReLPS-Monofilms durch Einlagerung von PmB(N) aus der Subphase. Alle Messungen wurden bei einem lateralen Druck von 30 mN/m durchgeführt.

Zu Vergleichszwecken wurden identische Experimente mit gereinigtem ReLPS von *Escherichia coli* durchgeführt.

Substanz	ReLPS ( <i>S. minnesota</i> )	ReLPS ( <i>E. coli</i> )
	$\Delta A[\%]$	$\Delta A[\%]$
<b>PmB</b>	$150,6 \pm 2,3$	$184,4 \pm 1,4$
<b>PmBN</b>	$129,8 \pm 2,5$	$137,0 \pm 1,0$

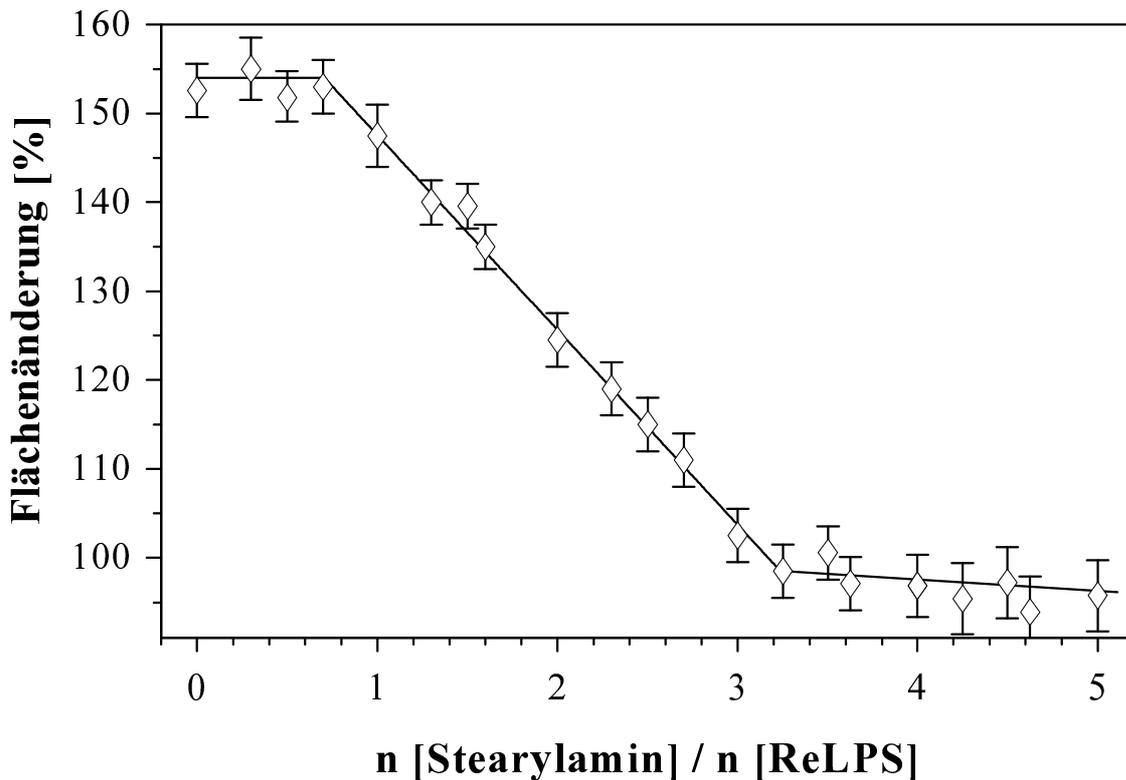
Die Einlagerung von Polymyxin B führt zu einer erheblichen Flächenvergrößerung des ReLPS-Monofilms. Da es sich um relative Flächenänderungen bezogen auf das jeweilige Lipid handelt, muß die in den Abschnitten 4.2.1 und 4.2.2 ermittelte Flächenbelegung pro Molekül des Lipides berücksichtigt werden, um den Einfluß des Polymyxins auf die Monofilmmfläche von *S. minnesota* und *E. coli* ReLPS miteinander vergleichen zu können.

PmBN zeigt ebenfalls in beiden Fällen eine Vergrößerung der Monofilmmfläche. Die Flächenänderung des Monofilms ist allerdings deutlich geringer, als die durch PmB hervorgerufenen Flächenzunahme. Die Einlagerung wird in beiden Fällen nicht durch die Gegenwart von ein- oder zweiwertigen Kationen ( $1 \mu\text{mol} < c_{\text{Kation}} < 1 \text{ mmol}$ ) beeinflusst.

### 4.2.4 Wechselwirkung von PmB mit Stearylamin / ReLPS - Mischfilmen

Der Einfluß der negativen Oberflächenladung eines ReLPS-Monofilms auf die Penetration von PmB wurde durch Zugabe einer positiven Lipidkomponente (Stearylamin) untersucht. Diese Vorgehensweise hat den Vorteil das ReLPS chemisch nicht modifiziert werden muß und die Oberflächenladung durch das Mischungsverhältnis frei gewählt werden kann.

Ein- und zweiwertige Kationen, die durch Komplexbildung der Phosphat- bzw. der Carboxylatgruppen ebenfalls die Ladungsdichte reduzieren könnten, haben keinen Einfluß auf die Penetration von PmB in einen ReLPS-Monofilm gezeigt (s. 4.2.3.).



**Abbildung 25** Flächenänderung eines ReLPS / Stearylamin-Mischfilms durch Einlagerung von PmB aus der Subphase ( $T = 22^\circ\text{C}$ ). Jeder Meßpunkt wurde aus zwei Einzelmessungen ermittelt. Bei einem molaren Verhältnis von  $n$  [Stearylamin] /  $n$ [ReLPS]  $\geq 3$  ist der Monofilm nicht mehr völlig stabil, so daß es zu einer leichten Abnahme der Monofilmfläche während der Messung kommt.

In Abbildung 25 ist der Einfluß des Stearylamin auf die Einlagerung des PmB aus der Subphase in den Monofilm zusammengefaßt. Bei Abwesenheit des positiv geladenen Stearylamins lagert sich PmB aus der Subphase ein und führt zu einer Vergrößerung der Fläche des Monofilms (ReLPS von *S. minnesota*) um  $\sim 150\%$  (s. 4.2.3). Kleinere Mengen Stearylamin ( $n$  [Stearylamin] /  $n$  [ReLPS]  $< 1,0$ ) reduzieren nicht die Penetration des Monofilms durch Polymyxin B. Die Flächenänderung fällt in diesem Konzentrationsbereich um  $\sim 5\%$  größer aus als für reine ReLPS-Monofilme (s. Tabelle 6).

Im Bereich von  $1,0 < n < 3,2$  nimmt die durch Einlagerung von PmB hervorgerufene Flächenänderung des Monofilms linear mit der zugesetzten Menge an Stearylamin ab. Ab einem molaren Verhältnis von  $n$  [Stearylamin] /  $n$  [ReLPS]  $\approx 3,2$  ist keine Einlagerung mehr festzustellen. Demnach ist bei dieser Konzentration des positiv geladenen Stearylamins die

## 4.2 Monofilmentersuchungen an ReLPS

Oberflächenladung des Monofilms soweit reduziert bzw. neutralisiert, daß keine Wechselwirkung zwischen PmB und dem Monofilm mehr stattfindet. Eine weitere Steigerung des Stearylamin-Anteils führt zu einer leichten Abnahme der Monofilmfläche auf unter 100% durch eine Destabilisierung des Monofilms .

Die Einlagerungsgeschwindigkeit des PmB aus der Subphase wird durch das Stearylamin nicht beeinflusst.

### 4.2.5 Bestimmung der Flächenbelegung von Polymyxin B in ReLPS-Monofilmen

Die Flächenbelegung von Polymyxin B in einem ReLPS-Monofilm ist nicht bekannt. Somit kann aus der gemessenen Flächenänderung weder die Stöchiometrie der Einlagerung analysiert werden, noch können Aussagen zur Anordnung des PmB-Moleküls in einem ReLPS-Monofilm gemacht werden.

**Tabelle 7** Flächenänderung von ReLPS-Monofilmen in Abhängigkeit vom Polymyxin B-Anteil. 100% entsprechen einem reinen ReLPS-Monofilm. Alle Werte wurden bei einem lateralen Druck von  $\pi = 30$  mN/m gemessen und stellen Mittelwerte aus wenigstens zwei Messungen dar.

<i>Salmonella minnesota</i>		<i>Escherichia coli</i>	
<i>n [PmB] / n [ReLPS]</i>	$\Delta A$ [%]	<i>n [PmB] / n [ReLPS]</i>	$\Delta A$ [%]
0,00	100,0 ± 1,5	0,00	100,0 ± 1,7
0,25	117,0 ± 2,5	0,10	114,4 ± 3,0
0,40	126,0 ± 1,0	0,20	116,8 ± 2,5
0,50	134,5 ± 2,5	0,30	126,7 ± 3,4
0,60	143,5 ± 1,5	0,40	134,5 ± 1,4
0,70	150,0 ± 2,0	0,50	144,9 ± 1,5

Zur Bestimmung der Fläche pro Molekül ( $A_0$ -Pmb) von PmB wurden daher definierte Mischungen von Polymyxin und ReLPS auf Aqua tridest. als Subphase untersucht. Trägt man die prozentuale Flächenänderung durch Zugabe von PmB als Funktion des Mischungsverhältnisses auf, so ergibt sich die *relative* Flächenbelegung des Polymyxin aus der Steigung der Ausgleichsgeraden, wie in Abbildung 26 gezeigt. Die Flächenbelegung von PmB kann über den  $A_0$ -Wert des jeweiligen ReLPS (*S. minnesota* oder *E. coli*) in die absolute Fläche pro Molekül umgerechnet werden. Im Falle von Mischungen von PmB mit ReLPS von

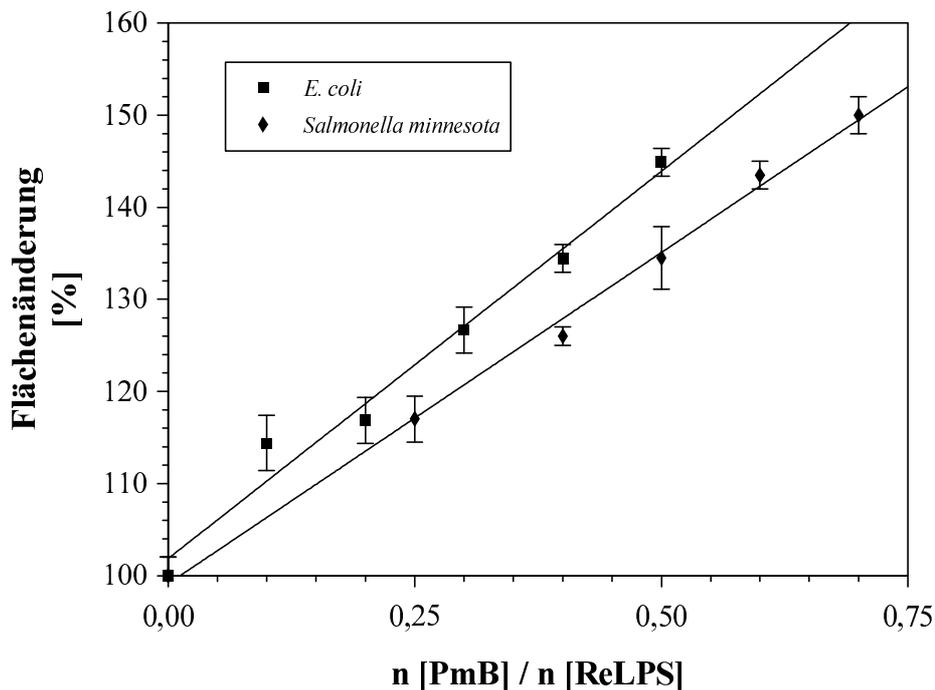
## Kapitel 4 Ergebnisse

*Salmonella minnesota* erhält man eine Steigung von  $S_{Sm} = 72$ , während für analoge Mischungen mit ReLPS von *Escherichia coli* eine Steigung von  $S_{Ec} = 84$  ermittelt worden ist (s. Abbildung 26). Die Flächenbelegung von Polymyxin B errechnet sich damit zu:

$$A_{\theta}^{S. \text{minnesota}}(\text{PmB}) = S_{Sm} * A_{\theta}(S. \text{minnesota}) = 0,72 * 1,59 = 1,14 \pm 0,05 \text{ nm}^2$$

$$A_{\theta}^{E. \text{coli}}(\text{PmB}) = S_{Ec} * A_{\theta}(E. \text{coli}) = 0,84 * 1,49 = 1,19 \pm 0,09 \text{ nm}^2$$

Als Mittelwert ergibt sich daraus :  $A_{\theta}(\text{PmB}) = 1,17 \pm 0,07 \text{ nm}^2$ .



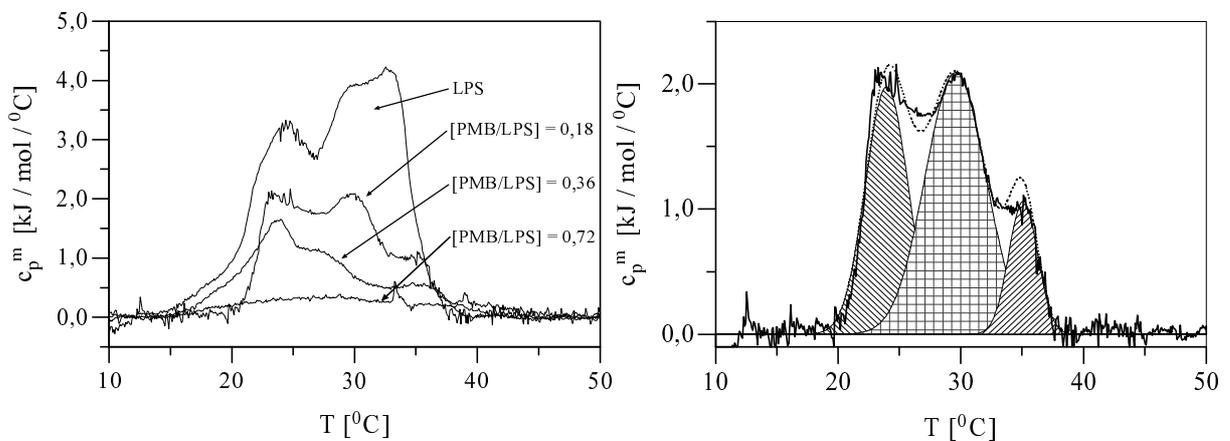
**Abbildung 26** Flächenänderung des Monofilms in Abhängigkeit vom PmB-Anteil. Die Meßwerte lassen sich durch eine einfache lineare Regression beschreiben.

Die Flächenbelegung von Polymyxin B stimmt in den beiden untersuchten ReLPS-Monofilmen innerhalb des Fehlerbereiches gut überein. Die Flächenbelegung des PmB kann nicht auf den Einbau des Fettsäurerestes zurückgeführt werden, da für eine einzelne Fettsäure eine Änderung der Gesamtfläche des Monofilms im Bereich von 2,0-3,0 nm<sup>2</sup> gefunden wird [ 101].

### 4.3 Kalorimetrische Untersuchungen

#### 4.3.1 DSC-Messungen

In Abbildung 27 sind die kalorimetrischen Messungen für *Salmonella minnesota* ReLPS dargestellt. Für alle *Salmonella minnesota* ReLPS Systeme findet man bei den DSC-Messungen einen komplexen Kurvenverlauf. Die experimentell gemessenen Kurven lassen sich durch Überlagerung von drei Gaussfunktionen annähern. Entsprechend sind in Tabelle 8 jeweils die Werte für alle drei Einzelkomponenten aufgeführt.



**Abbildung 27** DSC Messungen von *Salmonella minnesota* ReLPS und unterschiedlichen Mischungen von ReLPS mit Polymyxin B (links). Alle Daten zu diesen Messungen sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Im rechten Teil der Abbildung ist die Auswertung der Meßkurven (durchgezogene Linie) durch additive Überlagerung dreier Gaussfunktionen (schraffierte Kurven) skizziert. Die gepunktete Linie entspricht der Addition der drei Gaussfunktionen.

Das verwendete ReLPS von *S. minnesota* setzt sich aus mehreren Einzelkomponenten zusammen [50]. Da bei der DSC-Messung der Phasenübergang des Fettsäurebereichs von der  $L_\alpha$ - in die  $L_\beta$ -Phase gemessen wird, ist davon auszugehen, daß die unterschiedliche Zusammensetzung des Fettsäurebereiches der verschiedenen ReLPS-Komponenten zu diesen Meßergebnissen führt. Im Fettsäurebereich findet man bei *S. minnesota* drei unterschiedliche acylierte (penta-, hexa-, heptaacyl) Lipid A-Grundkörper. Ob es sich bei jedem Einzelpeak um jeweils eine dieser ReLPS-Komponente handelt, konnte nicht eindeutig geklärt werden, da kein ReLPS von *S. minnesota* mit homogener Fettsäurezusammensetzung zur Verfügung stand.

## Kapitel 4 Ergebnisse

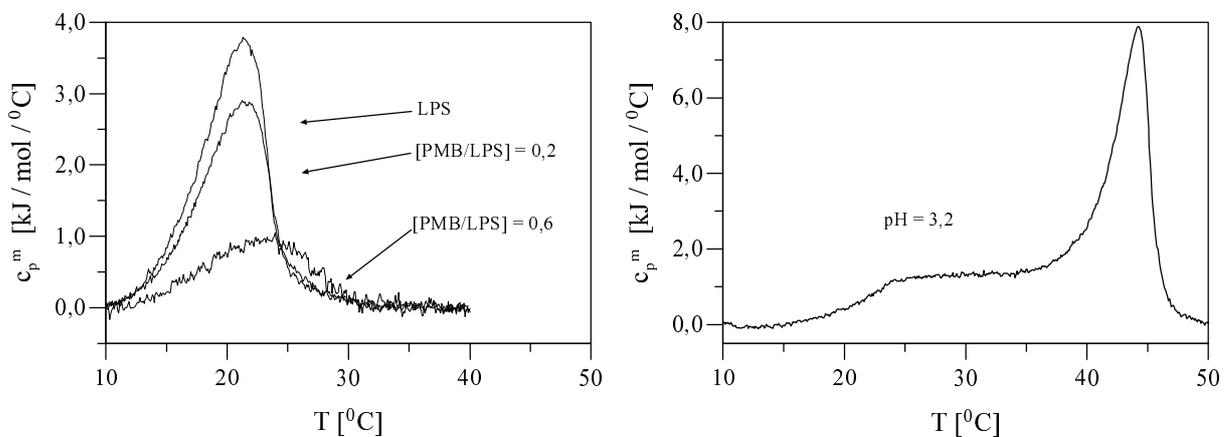
Bei der Zugabe von Polymyxin ist festzustellen, daß die drei einzelnen Komponenten unterschiedlich stark beeinflusst werden. Am stärksten werden die beiden Hauptpeaks bei  $T_m = 24\text{ °C}$  und bei  $T_m = 32,7\text{ °C}$  durch PmB beeinflusst. Eine einheitliche Tendenz der einzelnen Komponenten ist nicht zu erkennen. Allerdings nimmt die Phasenumwandlungsenthalpie kontinuierlich ab und ist bei einem molaren Verhältnis von  $n [\text{PmB}] / n [\text{ReLPS}] = 0,72$  auf weniger als 15% des Ursprungswertes für reines ReLPS reduziert. Durch die Gegenwart von Polymyxin wird die Phasenumwandlungsenthalpie drastisch reduziert. Parallel dazu kommt es zu einer leichten Verschiebung der Phasenumwandlungstemperatur  $T_m$  zu höheren Werten.

**Tabelle 8** DSC-Daten für reines ReLPS von *S. minnesota* und Mischungen von ReLPS und PmB ( $\text{pH} = 6,5$ ). Es sind jeweils die Phasenübergangstemperatur  $T_m$  und die Enthalpie des Phasenübergangs ( $\Delta H_{cal}$ ) der drei einzelnen Komponenten (s. Abbildung 27) einer DSC-Kurven zusammengefaßt. In der letzten Spalte ist die Summe der Phasenübergangsenthalpie für die verschiedenen Messungen dargestellt.

$\frac{n [\text{PmB}]}{n [\text{ReLPS}]}$	$T_m$ [°C]	$\Delta H_{cal}$ [kJmol <sup>-1</sup> ]	$\Sigma \Delta H_{cal}$ [kJmol <sup>-1</sup> ]
0	32,7 ± 0,1	18,40 ± 0,03	49,94 ± 0,09
	29,3 ± 0,1	8,18 ± 0,03	
	24,0 ± 0,1	23,36 ± 0,03	
0,18	35,1 ± 0,1	3,14 ± 0,03	24,62 ± 0,09
	29,6 ± 0,1	12,90 ± 0,03	
	24,0 ± 0,1	8,58 ± 0,03	
0,36	35,4 ± 0,2	2,16 ± 0,03	17,15 ± 0,09
	25,2 ± 0,2	13,76 ± 0,03	
	23,4 ± 0,2	1,23 ± 0,03	
0,72	40,4 ± 0,2	0,93 ± 0,05	7,17 ± 0,1
	28,0 ± 0,2	6,24 ± 0,05	

### 4.3 Kalorimetrische Untersuchungen

Für ReLPS von *E. coli* (s. Abbildung 28) findet sich im Gegensatz zu den gezeigten DSC-Kurven von *S. minnesota* ReLPS (s. Abbildung 27) sowohl für das reine System als auch für Mischungen mit Polymyxin B jeweils nur ein einziger asymmetrischer Peak. Die Beeinflussung der Phasenumwandlung durch Polymyxin ist völlig analog zu den für *S. minnesota* beschriebenen Veränderungen. Mit einem zunehmenden Polymyxin-Anteil geht eine erhebliche Abnahme der Enthalpieänderung, sowie eine leichte Verschiebung der Phasenübergangstemperatur zu höheren Werten (Maximum des Kurvenverlaufes) einher. In Tabelle 9 sind alle Daten zusammengefaßt.



**Abbildung 28** Ergebnisse der DSC -Messungen von *E. coli* ReLPS. Links sind die Kurvenverläufe für reines ReLPS und für Mischsysteme ReLPS / PmB ( $\text{pH} = 7,5$ ) dargestellt. Alle Messungen zeigen nur einen einzigen Peak. Die Enthalpie der Phasenumwandlung nimmt mit zunehmenden PmB-Anteil stark ab.

Im rechten Teil der Abbildung ist der Verlauf einer DSC-Messung von reinem ReLPS bei  $\text{pH} = 3,2$  aufgetragen. Der Phasenübergang ist um mehr als  $20^\circ\text{C}$  zu höheren Temperaturen verschoben.

**Tabelle 9** Ergebnisse der DSC-Messungen für hochreines ReLPS von *E. coli* und Mischungen von ReLPS mit Polymyxin B.

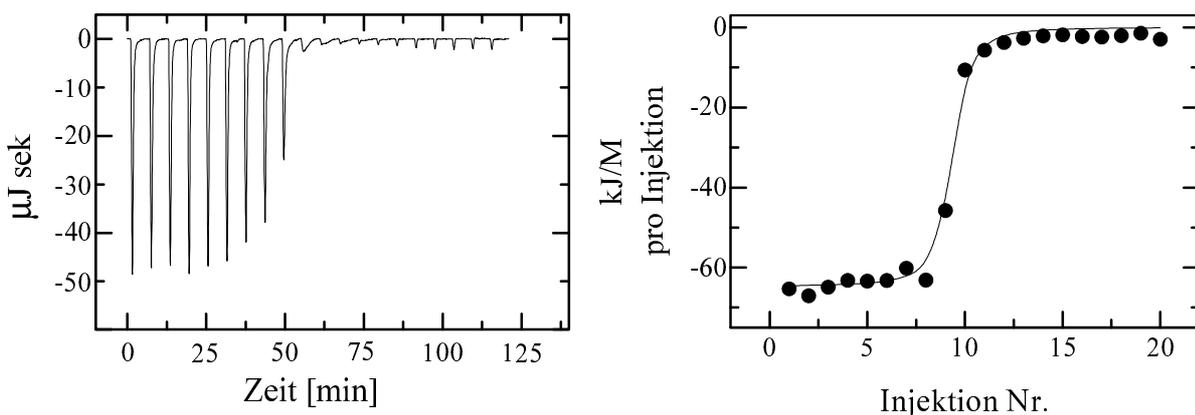
$\frac{n[\text{PmB}]}{n[\text{ReLPS}]}$	$T_m$ [ $^\circ\text{C}$ ]	$\Delta H_{cal}$ [ $\text{kJmol}^{-1}$ ]	$\text{pH}$
0	$44,3 \pm 0,2$	$58,5 \pm 0,4$	3,2
0	$21,3 \pm 0,1$	$25,1 \pm 0,4$	7,5
0,2	$21,9 \pm 0,2$	$20,9 \pm 0,8$	7,5
0,6	$23,9 \pm 0,2$	$9,2 \pm 0,8$	7,5

## Kapitel 4 Ergebnisse

Um die pH-Abhängigkeit der DSC-Messungen zu untersuchen, wurde ReLPS von *E. coli*, das in der freien Säureform vorlag, in einem Experiment in Aqua tridest. gelöst und eine DSC-Messung bei dem resultierenden pH-Wert durchgeführt. Der Phasenübergang verschiebt sich von  $T_m^{7,5} = 21,3^\circ\text{C}$  auf  $T_m^{3,2} = 44,3^\circ\text{C}$ . Die DSC-Kurve zeigt bei einem pH-Wert von 3,2 nach einem Anstieg im Bereich von 15 bis 25 °C einen Plateaubereich, der sich bis etwa 36,5 °C erstreckt. An diesen Vorphasenübergang schließt sich der Hauptphasenübergang an, der im Vergleich zu der DSC-Kurve des reinen ReLPS bei pH = 7,5 eine geringere Halbwertsbreite aufweist.

### 4.3.2 Isotherme Differenztitrations-Kalorimetrie (ITC) von ReLPS

Die Titrations-Messungen wurde überwiegend mit ReLPS von *Salmonella minnesota* durchgeführt, da von diesem Material ausreichende Substanzmengen zur Verfügung standen. Das hochreine LPS von *E. coli* wurde ausschließlich mit PmB titriert.



**Abbildung 29** Links ist die Titrationskurve von *E. coli* ReLPS bei 37°C abgebildet. Rechts ist die Auftragung zur Bestimmung von  $n$ ,  $k$  und  $\Delta H$  dargestellt.

Auffällig ist die in Tabelle 10 gezeigte Temperaturabhängigkeit des Vorzeichens der Bindungsenthalpie ( $\Delta H$ ). Während alle Messungen bei Temperaturen  $\leq 25^\circ\text{C}$  eine deutlich endotherme Reaktion zeigen, sind alle Enthalpien bei Temperaturen  $\geq 25^\circ\text{C}$  stark exotherm. Bei allen Messungen wurde eine Anzahl an Bindungsstellen für die Wechselwirkung von PmB mit ReLPS im Bereich von  $n [\text{PmB}] / n [\text{ReLPS}] \approx 0,67$  gemessen.

### 4.3 Kalorimetrische Untersuchungen

Die Titrationsmessungen von *E.coli* ReLPS mit PmB liefern ähnliche Daten für die Anzahl der Bindungsstellen und die Bindungsenthalpie. Allerdings ist bei 15°C der endotherme Enthalpiebetrag deutlich kleiner als der Wert von *S. minnesota* ReLPS bei 25°C. Für *E. coli* ReLPS wird schon bei 25°C eine stark exotherme Enthalpie gemessen, die bei 37°C bis auf einen Wert von  $\Delta H_{E.c.} = -65,21 \pm 0,84 \text{ kJmol}^{-1}$  abfällt.

Das PmB-Nonapetid zeigt bei Raumtemperatur einen deutlich kleineren endothermen Wert für die Bindungsenthalpie als Polymyxin B. Die Anzahl der Bindungsstellen ist im Vergleich mit den PmB-Messungen ebenfalls deutlich reduziert. Bei einer Temperatur von 37°C liefert PmBN in den kalorimetrischen Messungen keine auswertbaren Signale.

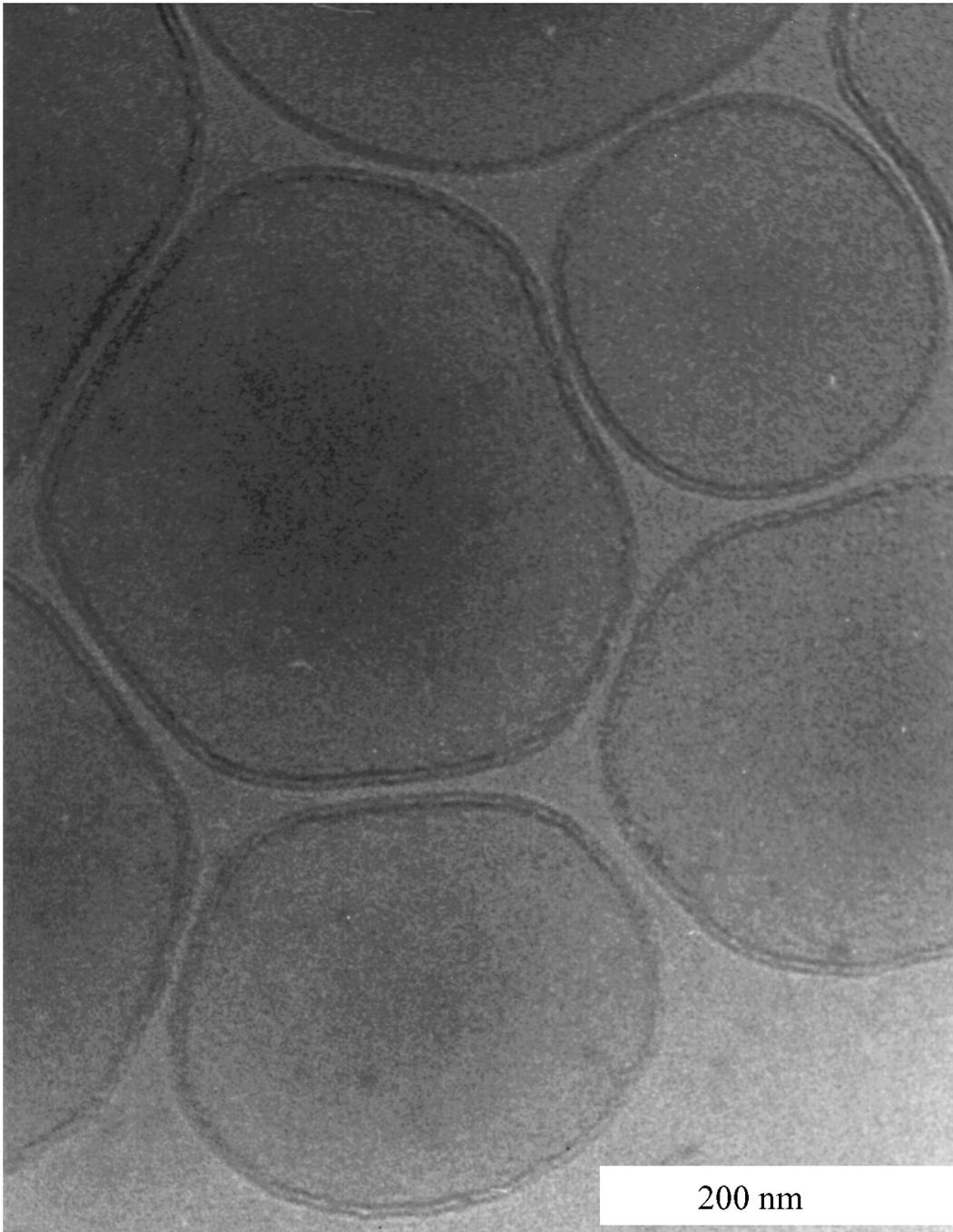
**Tabelle 10** Anzahl der Bindungsstellen ( $n$ ), der Bindungskonstanten ( $K$ ) sowie der Bindungsenthalpie ( $\Delta H$ ) für die Wechselwirkung von ReLPS von *Salmonella minnesota* (*S.m.*), bzw. von *Escherichia coli* (*E.c.*), mit Polymyxin B, Polymyxin B-Nonapetid.

ReLPS	Substanz	T [°C]	n	K [M <sup>-1</sup> ]	$\Delta H$ [kJM <sup>-1</sup> ]	pH
<i>S.m.</i>	<i>PmB</i>	25	0,60 ± 0,01	(5,2 ± 4) 10 <sup>8</sup>	82,76 ± 2,51	6,5
<i>S.m.</i>	<i>PmB</i>	37	0,61 ± 0,07	(9,0 ± 5) 10 <sup>2</sup>	-22,15 ± 4,18	6,5
<i>S.m.</i>	<i>PmBN</i>	25	0,22 ± 0,02	(3,9 ± 0,5) 10 <sup>4</sup>	22,21 ± 4,95	6,5
<i>E.c.</i>	<i>PmB</i>	15	0,55 ± 0,06	(3,3 ± 1,2) 10 <sup>6</sup>	15,47 ± 2,09	7,5
<i>E.c.</i>	<i>PmB</i>	25	0,68 ± 0,02	(1,0 ± 0,6) 10 <sup>6</sup>	-33,44 ± 1,25	7,5
<i>E.c.</i>	<i>PmB</i>	37	0,90 ± 0,01	(1,6 ± 0,2) 10 <sup>6</sup>	-65,21 ± 0,84	7,5

### 4.4 Cryo-Elektronenmikroskopie an ReLPS-Aggregaten

Reines ReLPS zeigt in Abhängigkeit von der Temperatur verschiedene Aggregationsformen. In der Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen finden sich sowohl bei 25 °C, als auch bei 37 °C ausschließlich Aggregate, die aus unilamellaren Schichten aufgebaut sind. Die Schichtdicke beträgt 7-9 nm. Die unilamellaren Vesikel zeigen einen sehr deutlichen Kontrast, wie in Abbildung 30 gezeigt. Der äußere und der innere Bereich der Doppelschicht erscheint dunkel, während der eingeschlossene Fettsäurebereich diffus und heller abgesetzt erscheint.

Die folgenden Aufnahmen sind repräsentativ für die gefundenen Aggregate von ReLPS bei den jeweiligen Bedingungen.



**Abbildung 30** *ReLPS-Aggregate bei 37 °C. Es finden sich ausschließlich runde, unilamellare Vesikel. Es ist deutlich die Abstoßung der einzelnen Aggregate zu erkennen, die zu einer Deformation der kugelartigen Struktur führen. Die Doppelschicht der Vesikel ist deutliche zu erkennen.*

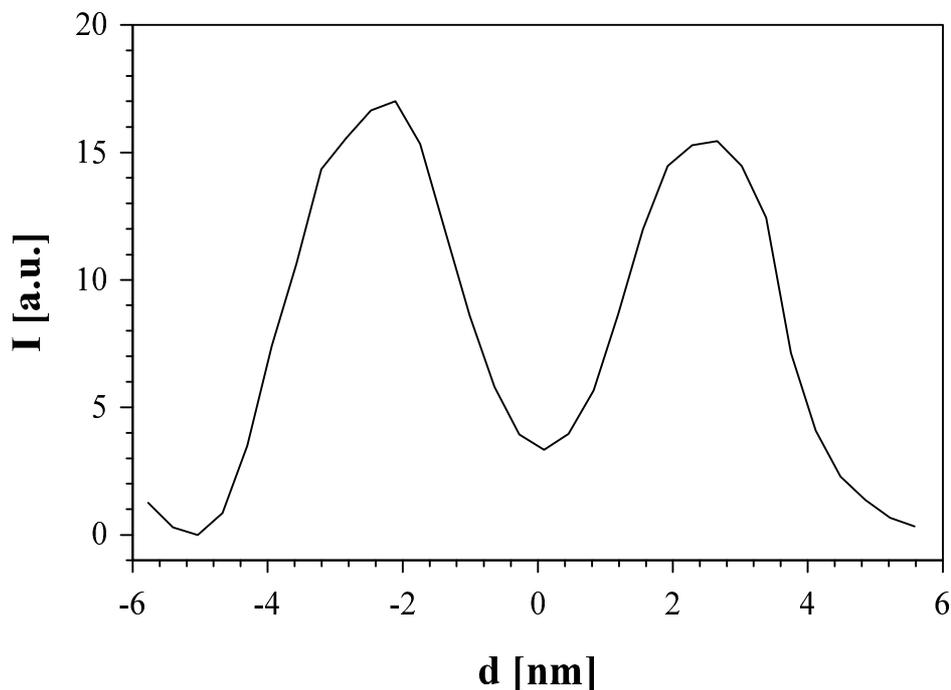
#### 4.4 Cryo-Elektronenmikroskopie an ReLPS-Aggregaten



**Abbildung 31** *Mischsysteme von PmB / ReLPS zeigen unabhängig von der Präparations-temperatur eine identische Aggregationsform. Im Bild sind multilamellare Strukturen uneinheitlicher Form und Größe zu erkennen. Es ist weder eine klare Abgrenzung einzelner Vesikel noch eine einheitliche Form der Aggregate zu erkennen.*

## Kapitel 4 Ergebnisse

Bei einer Temperatur von 37 °C, d.h. oberhalb des Phasenüberganges, findet man nur kugelförmige Aggregate, die ebenfalls aus einer einzigen Doppelschicht aufgebaut sind. Die Aggregate zeigen einen Durchmesser im Bereich von 300-800 nm. Bemerkenswert ist die zu beobachtende Deformation der Aggregate bei gegenseitiger Annäherung. Keine der untersuchten Aufnahmen zeigt eine Kontaktstelle zweier Aggregate. Im Gegensatz zu den Bandstrukturen bei 25 °C (nicht gezeigt) zeichnet sich die Kontour der Aggregatränder bei 37 °C immer klar ab (s. Abbildung 30). Die mittlere Schichtdicke, gemessen vom äußeren zum inneren Rand der Aggregate, beträgt ~8,5 nm bei einer Präparationstemperatur von 37 °C.

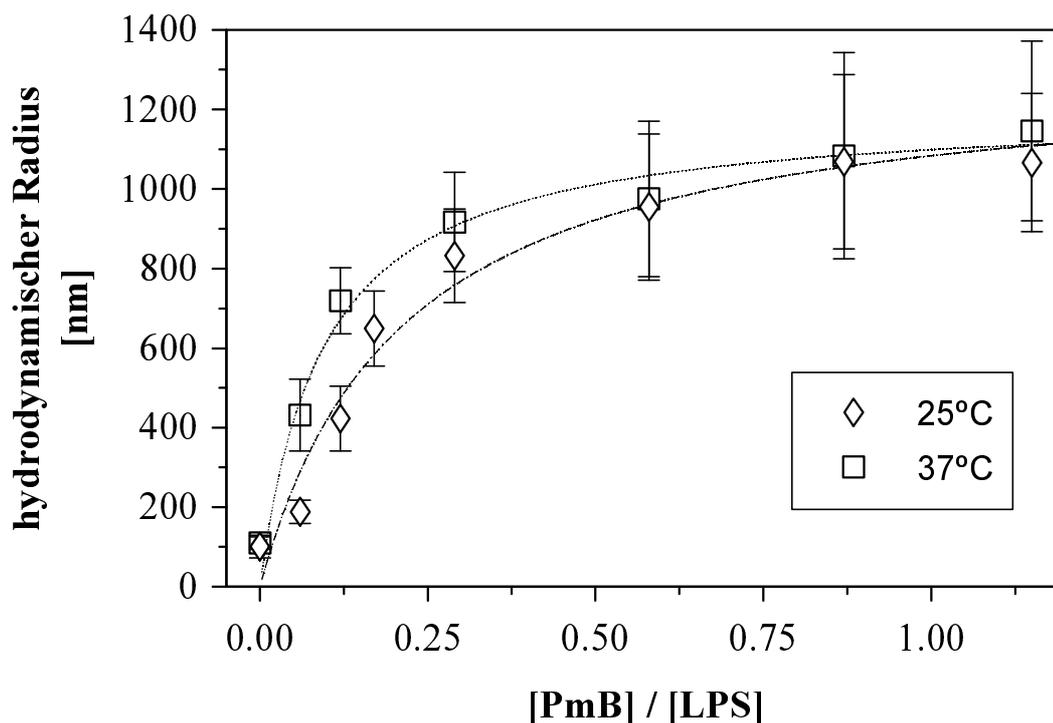


**Abbildung 32** Durch optisches Abtasten einer elektronenmikroskopischen Aufnahme ( $T = 37^\circ\text{C}$ ) erhält man den Kontrastverlauf einer ReLPS-Doppelschicht. Der Bereich der Fettsäureketten und des Lösungsmittels zeichnet sich durch einen sehr kleinen Kontrastwert ab. Die Doppelschichtstruktur der Vesikel ist deutlich zu erkennen.

In der Gegenwart von Polymyxin B ergibt sich ein gänzlich anderes Bild. Unabhängig von den Temperaturen (25 °C oder 37 °C) tritt nur eine einzige Aggregationsform auf, bei der keine einheitliche Form der Aggregate mehr zu erkennen ist. Es finden sich ausschließlich Multischichtsysteme, d.h. aufeinander gestapelte Doppelschichtsysteme, die im Gegensatz zu den reinen ReLPS Systemen keine Abstoßung mehr zeigen.

#### 4.5 Lichtstreuung an ReLPS / Polymyxin B-Mischungen

Neben der Cryo-Elektronenmikroskopie liefert die dynamische Lichtstreuung direkte Aussagen über die Veränderung von LPS-Aggregaten durch die Zugabe von PmB. Die Untersuchung der Aggregatgröße wurde ausschließlich an ReLPS von *Salmonella minnesota* durchgeführt. In Abwesenheit von Polymyxin B ergibt sich sowohl bei 25 °C als auch bei 37 °C eine durchschnittliche Größe von 100-150 nm für die reinen ReLPS-Aggregate.



**Abbildung 33** LPS-Aggregatgröße in Abhängigkeit vom PmB-Anteil. Die Linien stellen den aus den Meßwerten ermittelten interpolierten Kurvenverlauf dar.

Die Zugabe von PmB führt bei 37 °C zu einem etwas schnelleren Anstieg des mittleren hydrodynamischen Radius der Teilchen als bei 25 °C, aber insgesamt ähnelt sich der Verlauf beider Kurven sehr. Der Grenzwert für beide Kurven läßt sich durch Extrapolation des Verlaufes auf ca. 1300 nm ermitteln, d.h. der hydrodynamische Radius steigt durch die Zugabe von PmB auf mehr als das Zehnfache des ursprünglichen Wertes an.

Bemerkenswert ist der sehr schnelle Anstieg der Aggregatgröße bei kleinen PmB-Konzentrationen. Offensichtlich haben schon sehr geringe Mengen ( $0,1 < n \text{ [PmB]} / n \text{ [ReLPS]} < 0,2$ ) Polymyxin einen erheblichen Einfluß auf das Aggregationsverhalten und die Aggregationsform von LPS.

### 4.6 *Ergebnisse der Molekül-Dynamik Simulation*

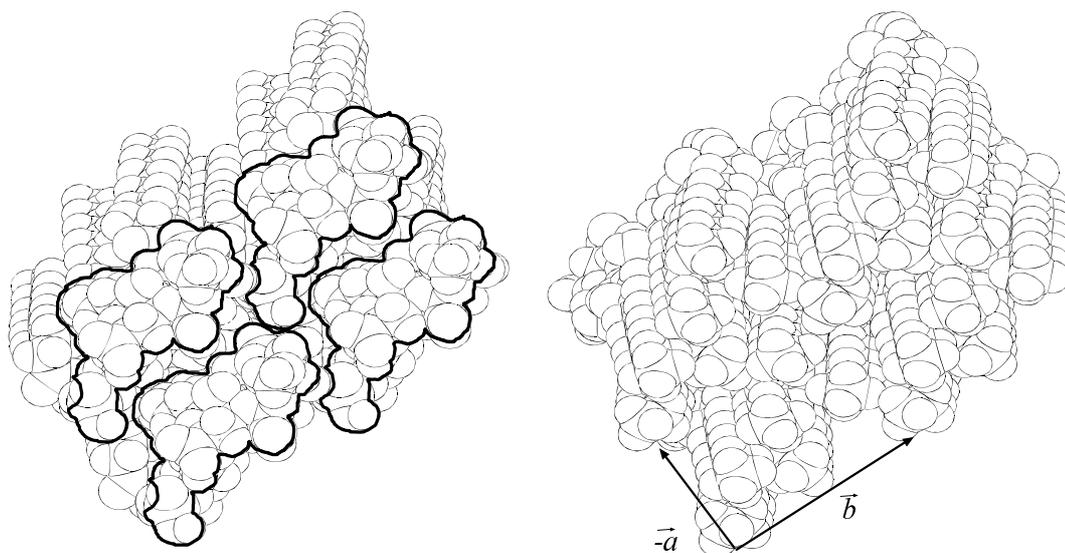
Die Ergebnisse der theoretischen Rechnungen sind dem gewählten Vorgehen entsprechend gegliedert. Dabei wurden verschiedene Zielsetzungen mit den MD-Simulationsrechnungen dieser Arbeit verfolgt. Zunächst sollte überprüft werden, ob mit Hilfe der von Kastowsky [95] entwickelten Methode zur Generierung von *statischen* Packungsmodellen Packungen erzeugt werden können, die sich auch im Verlauf einer MD-Simulation als stabil erweisen und somit als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen geeignet sind. Dazu wurde zunächst ein Parametersatz für eine aus *E. coli* ReLPS aufgebaute Packung ermittelt. Ausgehend von dieser Packung wurden anschließend durch Vergrößerung des Abstandes zwischen den einzelnen Molekülen, MD-Simulationen an kleinen Lipidsystemen (4 Moleküle, 2\*2 Packung) bei verschiedenen Flächenbelegungen pro Molekül im Vakuum durchgeführt, um die Stabilität der Anordnung zu überprüfen. Zusätzlich wurde eine hydratisierte Monoschicht simuliert, um den Einfluß von Wasser auf die Stabilität einer Lipidpackung zu studieren.

Die Ergebnisse dieses ersten Teils bildeten die Grundlage für die im folgenden Schritt untersuchten beiden größeren Lipidpackungen aus jeweils 16 Einzelmolekülen. Diese beiden Simulationen stellen den zentralen Punkt der theoretischen Rechnungen dar. Beim ersten System handelte es sich wiederum um eine reine ReLPS-Monoschicht, aufgebaut aus 4x4 Molekülen, die als Vergleich für das zweite Lipidsystem diente. In dem zweiten System, das ebenfalls aus 4x4 Molekülen aufgebaut wurde, wurden zwei ReLPS-Moleküle durch Polymyxin B substituiert, so daß ein Mischsystem aus ReLPS / PmB (7:1) vorlag. Anhand des zweiten Systems wurde untersucht, **ob** eine gestörte Membran simuliert werden kann und wenn ja, welchen Einfluß die Fremdmoleküle, in diesem Fall das PmB, auf die Eigenschaften der einzelnen Lipidmoleküle und auf die Membraneigenschaften haben. Die Ergebnisse dieser Rechnungen dienen somit auch dazu, eine Verbindung zwischen den aus den experimentellen Ergebnissen abgeleiteten Wechselwirkungsmodell des Polymyxins und der molekularen Struktur dieses Moleküls herzustellen.

#### 4.6.1 **Packungsgeometrie**

Das in Kapitel 3.2.3.1. beschriebenen Verfahren von Kastowsky liefert für ReLPS von *E. coli* die in Abbildung 34 gezeigte Molekülanordnung.

#### 4.6 Ergebnisse der Molekül-Dynamik Simulation



**Abbildung 34** Ansicht des Zucker- und des Fettsäurebereichs der ermittelten Packung für ReLPS von *E. coli*. Dargestellt ist eine aus vier Molekülen aufgebaute Einheit. Die Zuckerbereiche (linke Abbildung) der vier Moleküle ist zur besseren Übersicht umrandet. Die beiden Translationsvektoren sind im Fettsäurebereich (rechts) eingezeichnet.

Alle ReLPS-Aggregate in dieser Arbeit basieren auf dieser einen Molekülanordnung. Weitere Packungsvarianten wurden nicht untersucht. Eine systematische Untersuchung verschiedener Packungsvarianten von ReLPS war im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Zur Beschreibung des Aufbaus einer zweidimensionalen Monoschicht aus ReLPS-Molekülen werden lediglich die beiden folgenden Translationsvektoren benötigt, um aus einem einzelnen Molekül beliebig große Monoschichten aufzubauen.

$$\vec{a} = \begin{pmatrix} 0,513 \\ -0,779 \\ 0,000 \end{pmatrix} nm \quad \text{und} \quad \vec{b} = \begin{pmatrix} 1,161 \\ 0,854 \\ 0,000 \end{pmatrix} nm \quad .$$

Diese Packungsvariante zeichnet sich durch eine sehr kompakte Anordnung der ReLPS-Moleküle aus. Pro Molekül wird eine Fläche von  $1,34 \text{ nm}^2$  belegt, ein Wert, der auch in Monofilmmessungen (s. Kapitel 4.2.1.) für ReLPS in der fest-analogen Phase gemessen wird. Nach der Generierung einer Packung ist bei einer visuellen Kontrolle der Membran eine nahezu vollständig geschlossene, sehr kompakte Oberfläche zu erkennen, in der nur vereinzelt

kleine Spalte gefunden werden. Die Fettsäureketten entsprechen der von Kastowsky beschriebenen Heptaacyl-Lipid A-Packung und liegen in einer hexagonalen Anordnung vor [ 95].

### 4.6.2 MD-Simulation von ReLPS-Monoschichten unterschiedlicher Packungsdichte

Die ermittelten Packungsvektoren wurden zum Aufbau unterschiedlich dicht gepackter Monoschichten verwendet. Durch Multiplikation der Packungsvektoren mit einem Skalierungsfaktor wurde die Packung der Moleküle gleichmäßig aufgeweitet, so daß den Molekülen eine größere Fläche pro Molekül zur Verfügung steht. Auf diese Weise können auch aus den zugrunde liegenden Translationsvektoren Packungen mit einer größeren Flächenbelegung pro Molekül erzeugt werden. Anhand dieser Rechnungen wurde sowohl die Stabilität der Packungen bei den gegebenen Simulationsbedingungen als auch das Verhalten der Einzelmoleküle bei verschiedenen Flächenbelegungen pro Molekül untersucht. Es sollte damit sichergestellt werden, daß die ermittelten Packungsvektoren nicht nur eine befriedigende *statische* Anordnung der Moleküle liefern, sondern auch Monoschichten ergeben, die bei einer MD-Simulation stabil sind.

ReLPS Monoschichten unterschiedlicher Packungsdichte wurden bei einer Temperatur von 350 °K im Vakuum ( $\epsilon = 80$ ) unter Verwendung periodischer Randbedingung simuliert. Für die elektrostatischen und nichtbindenden Wechselwirkungen wurde ein Cut Off<sub>NB(IMG)</sub> = 1,2 nm verwendet. Die Simulationsdauer betrug für alle Systeme 100 ps. In Tabelle 11 sind die verschiedenen Parameter der Simulationsrechnungen zusammengefaßt. Die unterschiedliche Flächenbelegung der einzelnen Packungen entspricht verschiedenen Phasenzuständen der Lipide. Die in Tabelle 11 angegebenen Phasenzustände wurden aus der Flächenbelegung pro Molekül der jeweiligen Packung ermittelt, wobei die Isotherme von *E. coli* ReLPS (s. Abbildung 24) zugrunde gelegt wurde.

#### 4.6 Ergebnisse der Molekül-Dynamik Simulation

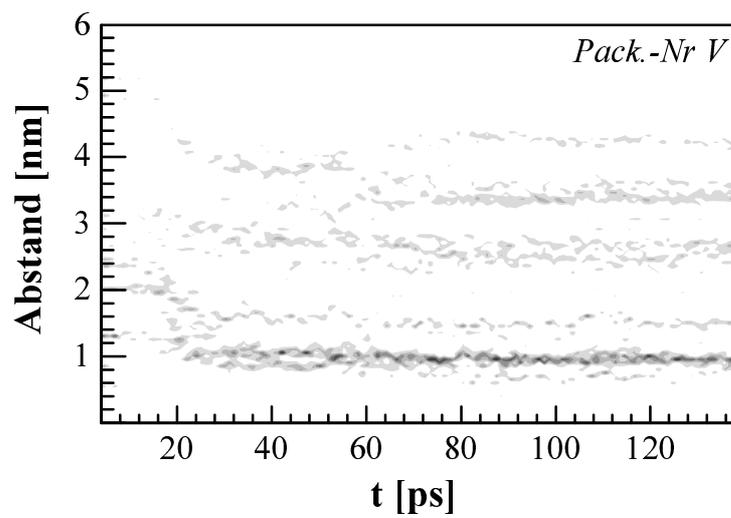
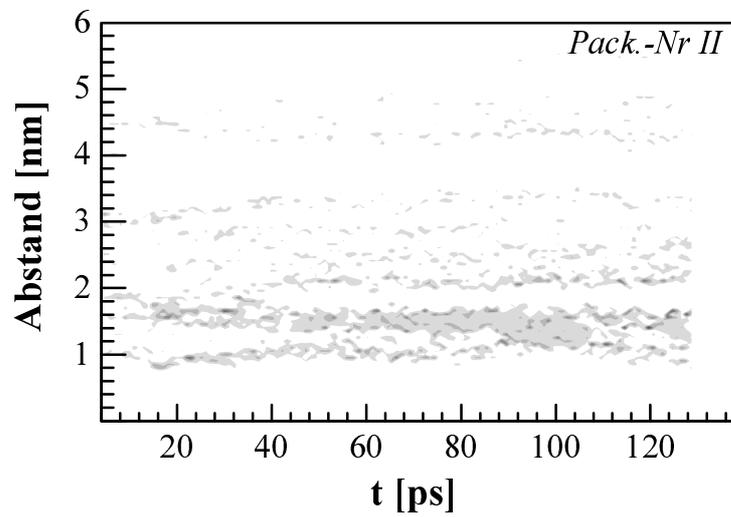
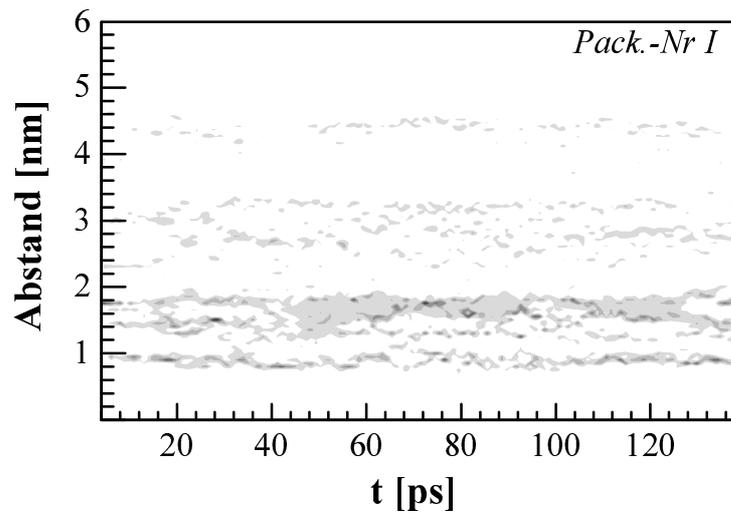
**Tabelle 11** Skalierungsfaktor und Flächenbelegung pro Molekül der ReLPS Monoschichten.

Der angegebene Phasenzustand bezieht sich auf die Flächenbelegung pro Molekül, die für die jeweilige Phase in den Monofilmmessungen ermittelt worden ist.

<i>PackungNr.</i>	<i>Skalierungs- faktor</i>	<i>Fläche pro Molekül [ nm<sup>2</sup> ]</i>	<i>Fläche pro Fettsäure [ nm<sup>2</sup> ]</i>	<i>Phasenzustand</i>
<b>I</b>	1,00	1,34	0,2236	fest
<b>II</b>	1,10	1,62	0,2706	flüssig/fest
<b>III</b>	1,20	1,93	0,3220	flüssig
<b>IV</b>	1,30	2,27	0,3779	flüssig/gasförmig
<b>V</b>	1,40	2,63	0,4383	gasförmig
<b>VI</b>	1,50	3,02	0,5025	gasförmig

Die Unterschiede der einzelnen Packungen während der MD-Simulation lassen sich mit den in Tabelle 11 angegebenem Phasenzustand korrelieren. In Abbildung 35 ist der zeitliche Verlauf der Abstandsverteilung eines Phosphatatoms (Phosphatatom 4', s. Abbildung 15) dargestellt. Die Packungen **I**, **II** und **III** zeigen insgesamt einen ähnlichen Verlauf der Abstandsverteilung. Im Bereich zwischen 1 und 2 nm sind drei, teilweise deutlich abgegrenzte, bandartige Strukturen bei definierten Abständen zu erkennen. Bei Packung **I** sind die ersten drei Bänder bei  $\sim 1,0$  nm,  $\sim 1,5$  nm und bei  $\sim 1,8$  nm zu finden. Die Breite eines Bandes ist ein Maß für die Veränderungen der intermolekularen Abstände zwischen den einzelnen Molekülen und dem Molekülverband. Da die Abstände zwischen allen identischen Atomen (Phosphatatom 4' in diesem Fall) einer Packung bei der Auswertung ermittelt werden, führen schon sehr kleine Positionsveränderungen der Atome zu einer Verbreiterung dieser Bänder, da die Bewegungen der Atome in der Regel in verschiedene Richtungen erfolgen, so daß die Veränderung des Abstandes zwischen den Atomen entsprechend größer ausfällt.

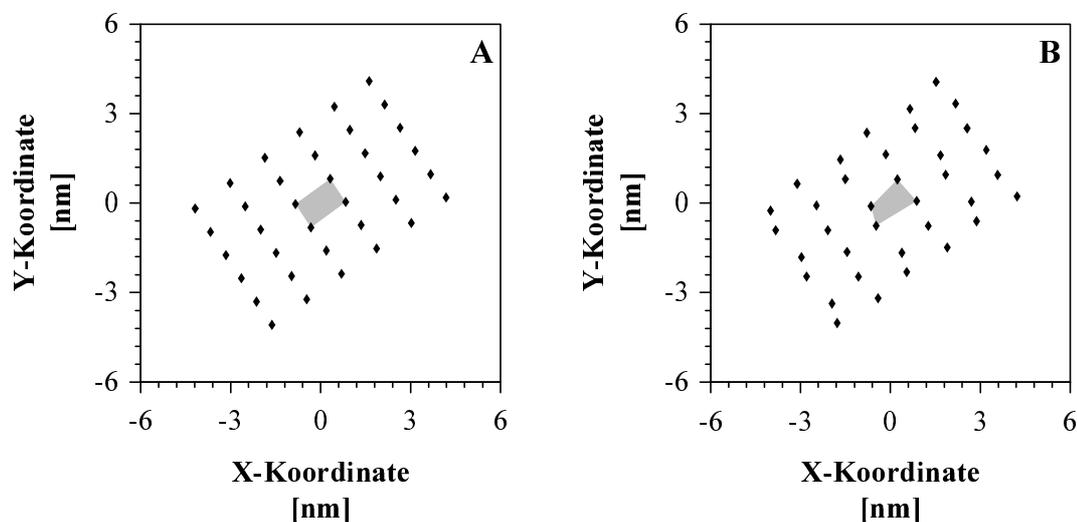
Kapitel 4 Ergebnisse



## 4.6 Ergebnisse der Molekül-Dynamik Simulation

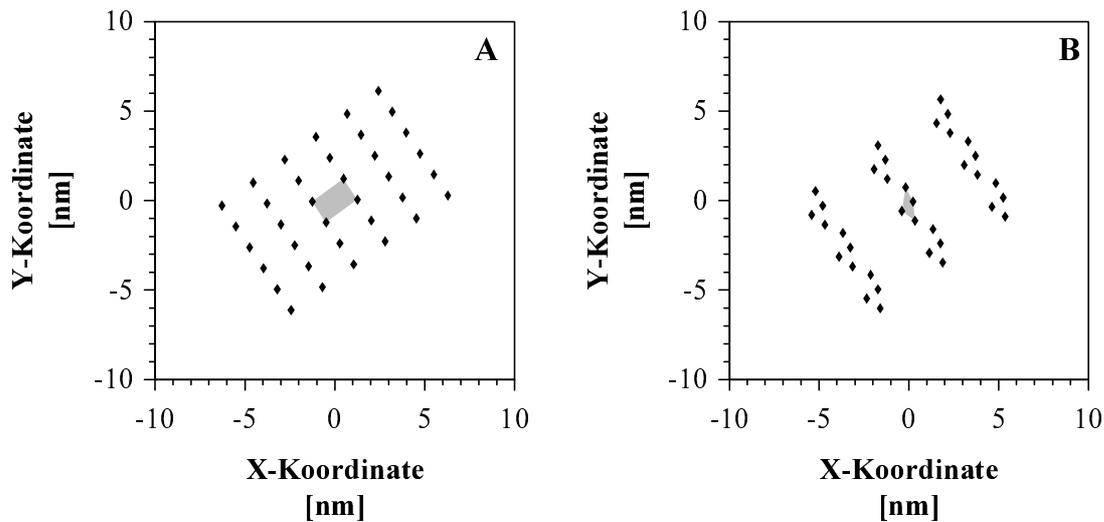
**Abbildung 35** (vorherige Seite) Zeitlicher Verlauf der Abstandsverteilung des Phosphatatoms 4' des ReLPS der Packungen **I**, **II** und **V** (s. Abbildung 15). Es wurden die Abstände zwischen dem ausgewählten Atom an allen Molekülen unter Einbeziehung der periodischen Kopien ermittelt (s. Kapitel 2.7.4.). Je häufiger ein Abstand auftritt, desto dunkler ist der Bereich in den Diagrammen dargestellt. In dieser Auswertung wurde die **Aufheiz- und Äquilibrierungsphase** explizit mit einbezogen, da die Veränderung der Molekülpackung überwiegend in diesem Zeitraum stattfindet.

Die Packung **IV** zeigt noch im Ansatz eine den Packungen **I-III** ähnliche Bandstruktur, während die folgenden Packungen (**V** und **VI**) ein deutlich verändertes Profil aufweisen, wie es am Beispiel von Packung **V** in Abbildung 35 gezeigt ist. Es findet sich über dem Simulationszeitraum ein breiteres Band im Bereich von 1,0 nm sowie ein deutlich schwächer abgezeichnetes Band bei ~1,6 nm. Besondere Beachtung ist in diesem Fall dem Zeitraum  $t = 0-20$  ps zu widmen. Man erkennt bei  $t = 0$  ps drei schmale Bänder bei 1,38 nm, 2,0 nm und bei 2,4 nm, die sich innerhalb von 20 ps in die beiden Bänder bei 1,0 nm bzw. 1,6 nm umgruppieren. Diese Veränderung ist auf eine drastische Umorientierung der Moleküle in der Packung zurückzuführen.



**Abbildung 36** Anordnung der Moleküle unter Einbeziehung der periodischen Randbedingungen in Packung **I** zu Beginn (A) und nach der MD-Simulation (B). Jedes Trapez symbolisiert ein einzelnes Molekül. Zur Orientierung sind die vier ReLPS-Moleküle der Originalpackung mit einer grauen Schraffur hinterlegt worden. Der zeitliche Verlauf der Positionsveränderung kann Abbildung 35 entnommen werden.

## Kapitel 4 Ergebnisse



**Abbildung 37** Anordnung der Moleküle unter Einbeziehung der periodischen Randbedingungen in Packung **V** zu Beginn (A) und nach der MD-Simulation (B).

Die Veränderung der Abstandsverteilung wird durch eine Modifikation der jeweiligen Molekülpackungen hervorgerufen. Während die Position der Moleküle in den Packungen **I**, **II** und **III** nahezu unverändert bleibt, ist in allen anderen Fällen (**IV** bis **VI**) eine sehr schnelle Veränderung der Moleküllage zu beobachten. In Abbildung 36 und Abbildung 37 sind exemplarisch die Positionen des Phosphatatoms 4' zu Beginn und nach der MD-Simulation in einem Koordinatensystem eingezeichnet. Während Packung **I** keine signifikanten Unterschiede in der Lage der Atome bzw. der Moleküle aufweist, zeigt Packung **V** nach 100 ps eine im Vergleich zur Ausgangsposition völlig veränderte Molekülanordnung, die durch eine Aggregation von vier Einzelmolekülen hervorgerufen wird (s. Abbildung 37). Dieses Verhalten wird völlig analog auch für die Packung **VI** beobachtet. Die vier einzelnen Moleküle lagern sich zusammen und bilden einen Cluster, während der restliche zur Verfügung stehende Raum nicht genutzt wird. Diese Umlagerung der Moleküle erfolgt schon in den ersten 20 ps, d.h. noch während der Aufheiz bzw. Äquilibrationsphase des Systems (s. Abbildung 36).

## 4.6 Ergebnisse der Molekül-Dynamik Simulation

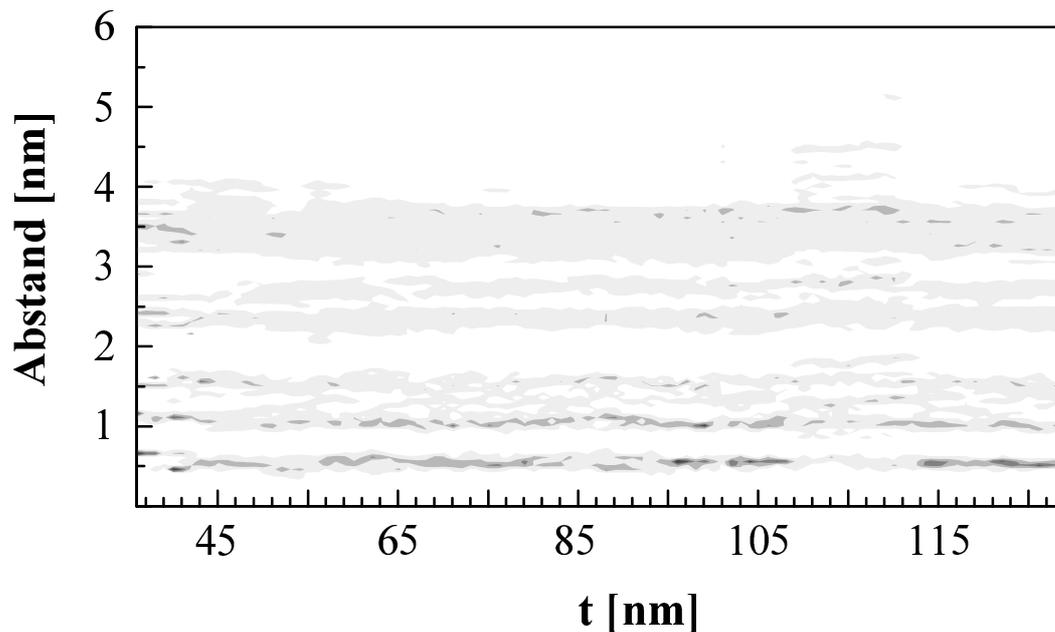
Die Ergebnisse der MD-Simulation von ReLPS-Packungen bei unterschiedlicher Flächenbelegung können wie folgt zusammengefaßt werden:

- Sowohl die ursprüngliche Packung **I**, als auch die leicht aufgeweiteten Packungen **II** und **III** sind über den gesamten Simulationszeitraum stabil und zeigen keine signifikante Veränderung der Lage und Orientierung der einzelnen Moleküle.
- Bei einer weiteren Vergrößerung der Flächenbelegung pro Molekül (**IV-VI**) kommt es zu einer veränderten Orientierung und einer veränderten Anordnung der Moleküle innerhalb der Packung.

### 4.6.3 MD-Simulation einer hydratisierten ReLPS-Monoschicht

Der Einfluß von Wasser auf die Stabilität der Packungsanordnung und die Beweglichkeit der einzelnen Lipidmoleküle wurde im nächsten Schritt untersucht. Die zentrale Fragestellung lautete, ob bei der Simulation von Lipidmonoschichten Wassermoleküle explizit einbezogen werden müssen, was zu einer erheblichen Verlängerung der einzelnen Rechnungen führen würde, oder ob die Beurteilung der *Packungsstabilität* auch durch Simulationsrechnungen im Vakuum erfolgen kann.

Dazu wurde eine mit Packung **I** des vorherigen Kapitels identische Molekülanordnung zusätzlich mit einer 1,5 nm hohen, frei beweglichen Wasserschicht über dem hydrophilen ReLPS-Teil überschichtet und mit 8 Calciumionen im Bereich der Phosphatgruppen zur Ladungskompensation erweitert. Dieses System wurde unter nahezu identischen Simulationsbedingungen (Ausnahme  $\epsilon = 1$ ) zu Vergleichszwecken untersucht, um den Einfluß der Solvensmoleküle auf die Lipidpackung abzuschätzen. Dementsprechend werden nachfolgend nur die Ergebnisse dargestellt, die einen Vergleich der Vakuumsimulation mit der Simulation der hydratisierten Monoschicht gestatten. Die Ergebnisse der Vakuumrechnung beziehen sich auf Packung **I** des vorherigen Kapitels.



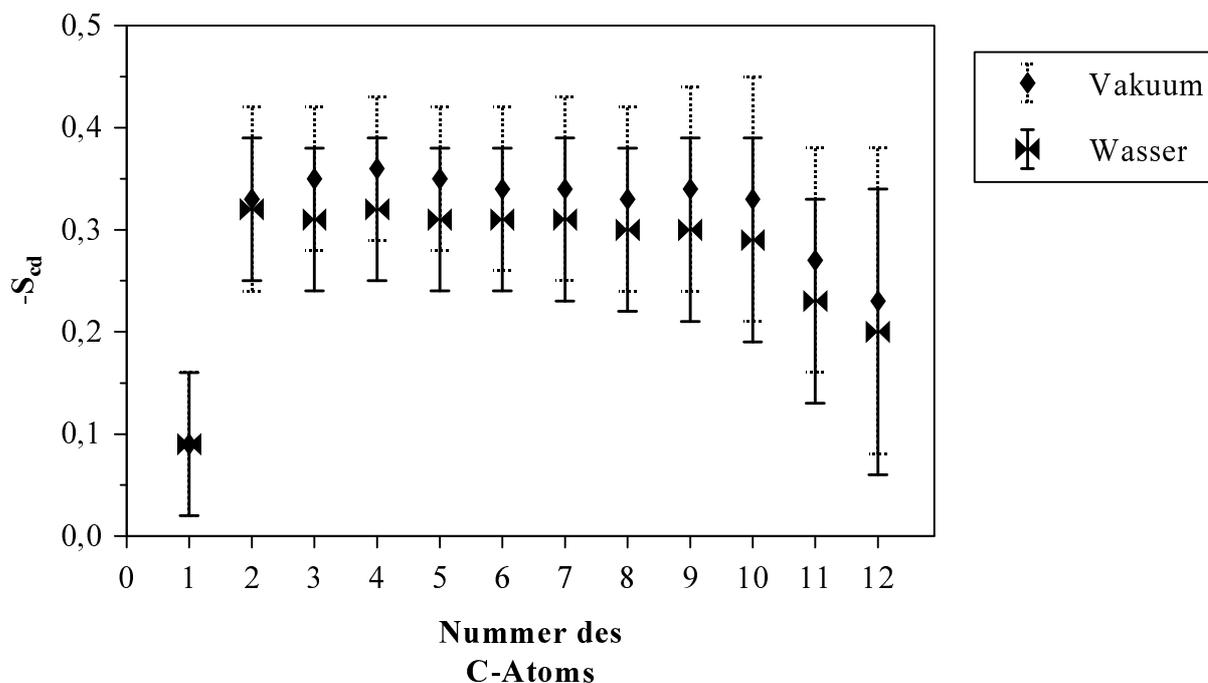
**Abbildung 38** *Abstandsverteilung des Phosphatatoms 4' des hydratisierten Systems bei 350 K. Dargestellt ist lediglich der eigentliche Simulationszeitraum von 100 ps ohne Aufheiz- und Äquilibrierungsphase. Andere Atome des Zuckerbereichs liefern nahezu identische Abstandsverteilungen.*

Das wasserhaltige System zeichnet sich durch eine sehr geringe Beweglichkeit der Lipidmoleküle aus, wie es in Abbildung 38 am Beispiel der Abstandsverteilung für das Phosphatatom **I** gezeigt ist. Die ersten drei Bänder ( $\sim 0,6$  nm,  $\sim 1,1$  nm und  $\sim 1,5$  nm) sind deutlicher voneinander separiert und schmäler als es in Abbildung 35 für Packung **I** (identische Packungsanordnung im Vakuum) der Fall ist.

Die durch die Wassermoleküle gedämpfte Beweglichkeit der Atome findet sich ebenfalls im Fettsäurebereich wieder. Die Beweglichkeit der Fettsäureketten ist anhand des Ordnungsparameters in Abbildung 39 dargestellt. In beiden Systemen ähnelt sich der Verlauf der Ordnungsparameter, gemittelt über alle Fettsäureketten, sehr. Der Ordnungsparameter für das erste C-Atom unterscheidet sich in beiden Simulationen von denen der restlichen Fettsäureketten, da durch die Anknüpfung der Fettsäureketten die Orientierung des ersten Kohlenstoffatoms beeinflusst wird.

#### 4.6 Ergebnisse der Molekül-Dynamik Simulation

Während sich der Ordnungsparameter entlang der Fettsäureketten nahezu nicht unterscheidet, zeigen die Kettenenden (C-Atom 11 u. 12) eine erhöhte Beweglichkeit. In beiden Systemen ist der Ordnungsgrad der Fettsäureketten mit einem Wert von  $S_{CD} < -0,3$  sehr hoch.



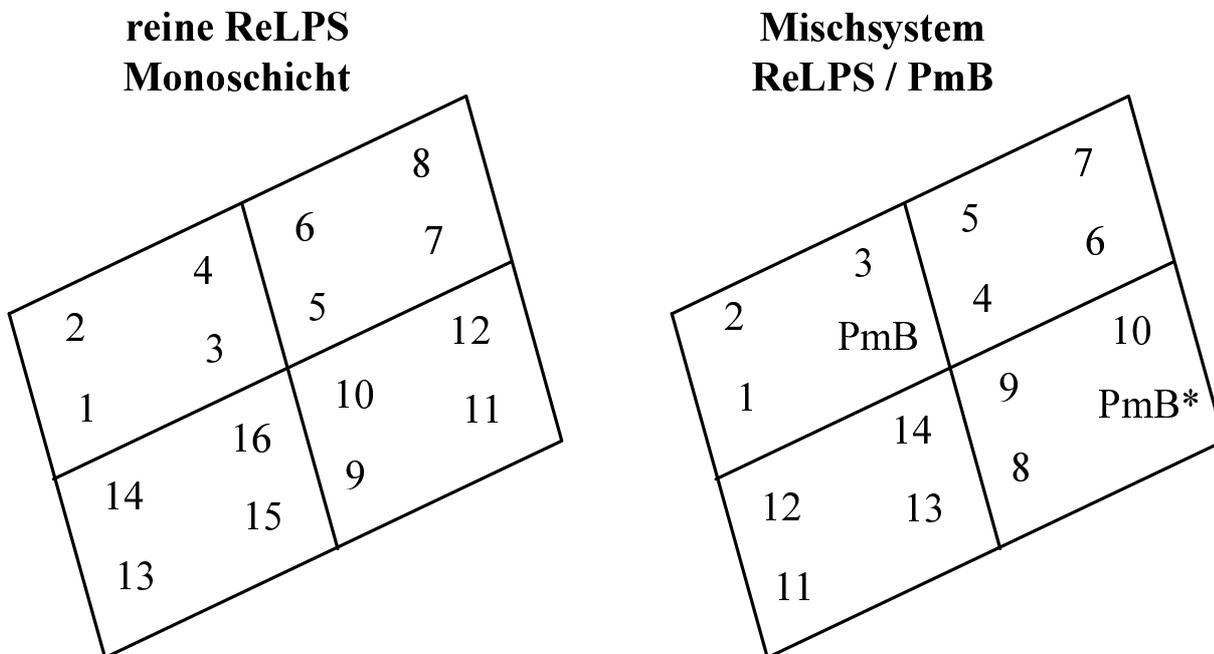
**Abbildung 39** Mittelwert des Ordnungsparameters  $S_{CD}$  über alle Fettsäureketten der beiden simulierten Systeme. Atom 1 bezeichnet das erste Kohlenstoffatom nach der Anknüpfung der Fettsäure an das Zuckergerüst und entsprechend bezeichnet Atom 12 das letzte Atom der Fettsäurekette.

Bezogen auf die Packung der Lipidmoleküle unterscheiden sich die beiden untersuchten Systeme nicht. Die hydratisierte Monoschicht zeigt unter ansonsten identischen Bedingungen eine etwas geringere Beweglichkeit sowohl im Zucker- als auch im Fettsäurebereich, so daß es für die Untersuchung von Packungseffekten nicht notwendig ist, Wassermoleküle explizit mit einzubeziehen.

#### 4.6.4 MD-Simulation an großen ReLPS-Monoschichten

Die Ergebnisse der vorangegangenen Kapitel dienen einerseits zur Überprüfung, ob MD-Simulationen an ReLPS-Packungen prinzipiell möglich sind und wenn ja, welche Randbedingungen bei der Simulation besonders zu beachten bzw. auf jeden Fall einbezogen

werden müssen. Das zentrale Ziel der Simulationsrechnungen bestand darin, ein Mischsystem aus ReLPS und PmB mittels MD-Simulation zu untersuchen, um so Ansätze für die Interaktion des Polymyxin B mit ReLPS auf molekularer Ebene zu ermitteln.



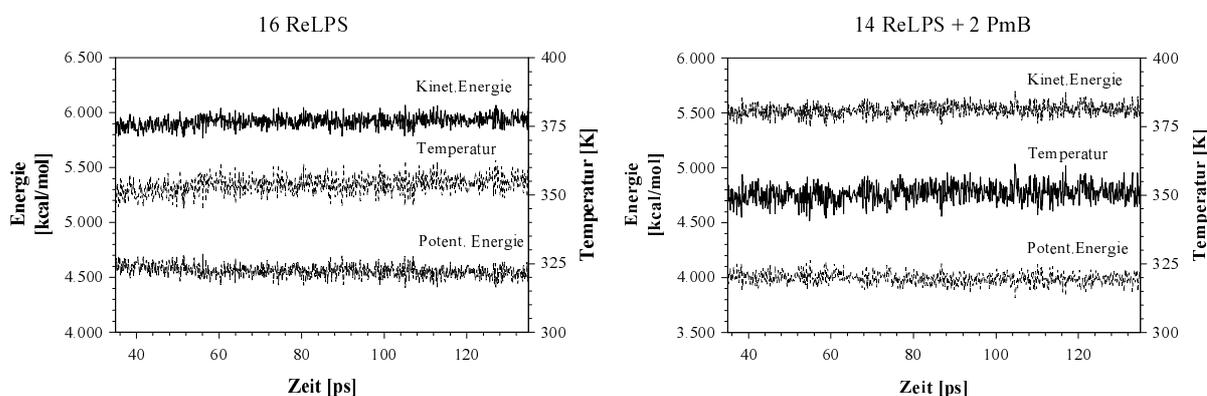
**Abbildung 40** Anordnung und Schema der Numerierung der beiden Monoschichten. Im Falle des Mischsystems wurden zwei der sechzehn ReLPS Moleküle durch jeweils ein PmB-Molekül substituiert. Alle anderen Parameter der MD-Simulation waren identisch.

Aufbauend auf den Ergebnissen der kleineren ReLPS-Packungen (s. 4.6.2., 4.6.3.) wurden zu diesem Zweck zwei Systeme aus jeweils 16 Einzelmolekülen aufgebaut. Das erste System wurde aus 16 ReLPS-Molekülen unter Verwendung der bekannten Packungsvektoren (s. Kapitel 4.6.1.) aufgebaut. Die Flächenbelegung entspricht Packung I (Kapitel 4.6.2.), allerdings ist dieses System aus 16 Einzelmolekülen aufgebaut und damit erheblich größer als die aus vier Molekülen gebildete Packung I. Dieses reine ReLPS-System diente als Referenz für das zweite Ensemble. Das zweite System wurde aus einer Kopie des ersten Systems erzeugt, wobei jedoch zwei ReLPS-Moleküle durch Polymyxin B ersetzt wurden. In Abbildung 40 ist das Numerierungsschema der beiden Monoschichten dargestellt.

Beide Systeme wurden bei einer Temperatur von 350 K unter den gleichen Bedingungen wie in Kapitel 4.6.2. einer MD-Simulation im Vakuum unterzogen. Da sich bezüglich der Lipidanordnung keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den MD-Simulationen im

#### 4.6 Ergebnisse der Molekül-Dynamik Simulation

Vakuum und im hydratisierten Zustand ergeben haben und anhand der experimentellen Befunde primär eine Beeinflussung der Lipidpackung durch PmB zu erwarten war, wurde bewußt auf die Einbeziehung von Wasser verzichtet. Dadurch konnte der Zeitaufwand pro Rechnung auf 100 CPU-Tage (auf einer SGI-Indigo R4000) reduziert werden.



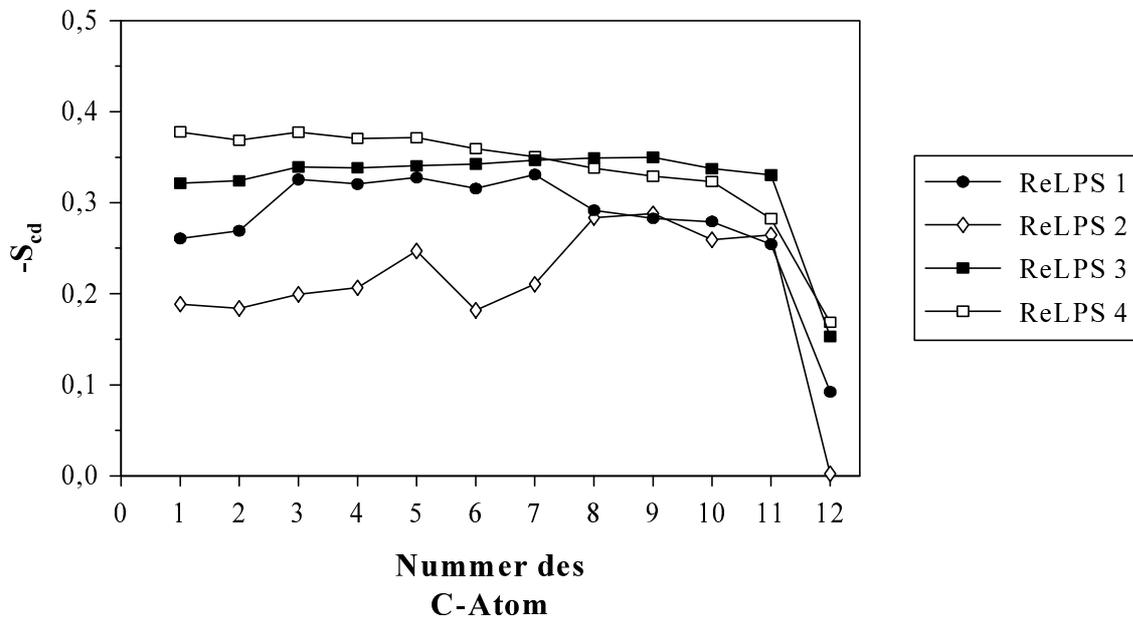
**Abbildung 41** Energieverlauf der reinen ReLPS-Monoschicht (links) und des ReLPS/PmB-Mischsystems (rechts). Weder im Verlauf der Temperatur noch im Verlauf der Energie (kinetische und potentielle Energie) sind starke Schwankungen festzustellen.

Beide Systeme zeigten über den gesamten Simulationszeitraum keine Tendenzen, die Molekülanordnung aufzulösen oder eine veränderte Moleküllage einzunehmen. Der in Abbildung 41 gezeigten Verlauf der Energie und der Temperatur beider Monoschichtsysteme zeigt eine leichte Fluktuation um einen mittleren Wert. Sprünge oder systematische Veränderungen der Werte sind nicht zu erkennen. Packungsveränderungen, wie z.B. durch den Verlust eines einzelnen Moleküls aus der Packung, würde sich in einem deutlichen Sprung im Energieverlauf abzeichnen.

Um zu überprüfen, ob es aufgrund der dichten Packung der Moleküle zu gekoppelten Bewegungen im Fettsäurebereich kommt, wurde der Ordnungsparameter für jeweils eine einzelne Fettsäure an allen ReLPS-Molekülen ausgewertet. Ein ähnlicher Verlauf des Ordnungsparameters ist ein Hinweis für eine gekoppelte Bewegung der LPS-Moleküle. Unterschiede im Verlauf der Ordnungsparameter lassen auf eine entkoppelte Bewegung der Moleküle schließen. Eine eindeutige Aussage anhand des Ordnungsparameters, ob es sich um eine gekoppelte Bewegung handelt, wäre nur unter Einbeziehung der Simulationszeit und der absoluten Orientierung der Fettsäureketten in der Auswertung möglich. Eine Auswertung des Ordnungsparameters, die diese Randbedingungen berücksichtigt, ist bis jetzt noch nicht

## Kapitel 4 Ergebnisse

publiziert worden. In Abbildung 42 ist der Verlauf des Ordnungsparameters der Fettsäurekette Nr. 3 (vergl. Abbildung 15 der ReLPS-Moleküle 1 bis 4 gezeigt. Die Numerierung entspricht dem in Abbildung 40 gezeigtem Schema.



**Abbildung 42** In der Abbildung ist für die ersten vier LPS-Moleküle des reinen ReLPS Systems jeweils der Verlauf des Ordnungsparameters einer einzelnen Fettsäure (Fettsäure Nr. 3) dargestellt.

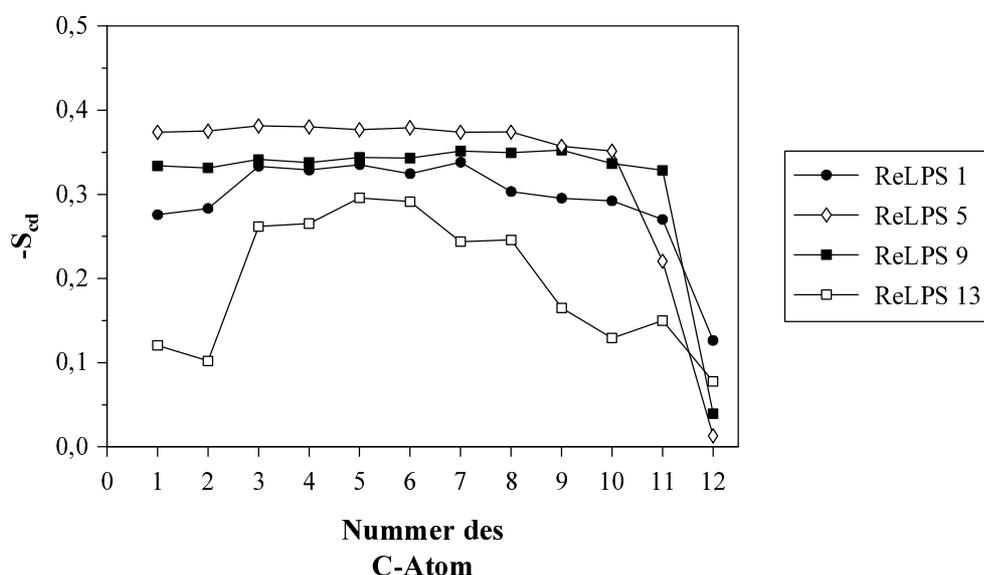
Die Standardabweichung wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet. Der Wert für die Standardabweichung variiert von 0,05 im mittleren Teil der Kette bis zu einem Wert von 0,2 am Kettenende.

Zwischen den vier dargestellten Ordnungsparametern der Fettsäureketten besteht keine Übereinstimmung. Jede Fettsäure zeigt in den einzelnen Werten aber auch im Verlauf des Ordnungsparameters eine von den anderen Ketten abweichende Charakteristik. Identische Auswertungen wurden für andere ReLPS-Gruppen sowohl für das reine ReLPS-System als auch für das ReLPS / PmB-Mischsystem durchgeführt. In keiner der untersuchten Gruppen kommt es zu größeren Übereinstimmungen im Verlauf des Ordnungsparameters.

Neben direkt benachbarten Molekülen wurden auch solche ReLPS-Moleküle in beiden Systemen miteinander verglichen, die nicht unmittelbar benachbart sind. In Abbildung 43 ist dieses am Beispiel des über alle Fettsäuren eines Moleküls gemittelten Ordnungsparameters der ReLPS-Moleküle Nr. 1, 5, 9 und 15 der reinen ReLPS-Monoschicht dargestellt. Bei diesen vier Molekülen handelt es sich um die »Eckmoleküle« einer kleineren 2x2-Untereinheit, wie

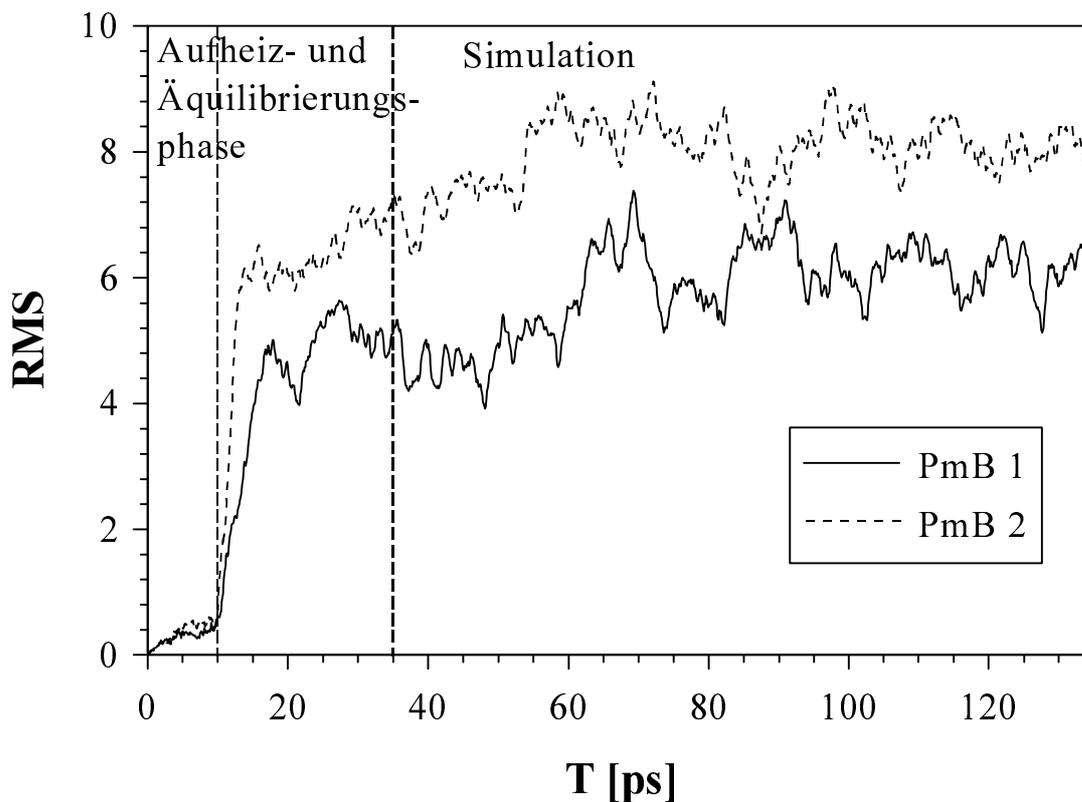
#### 4.6 Ergebnisse der Molekül-Dynamik Simulation

in Abbildung 40 gezeigt. Auch in diesem Fall ist kein übereinstimmender Verlauf des Ordnungsparameters festzustellen. Die visuelle Auswertung der Trajektorie des Gesamtsystems und unterschiedlicher Teilbereiche der Monoschichten mit dem Programmpaket Quanta 4.1.1. von MSI (Waltham, MA, USA) hat ebenfalls keine Anzeichen für eine gekoppelte Bewegung geliefert, so daß von einer völlig entkoppelten Bewegung der einzelnen ReLPS-Moleküle in beiden Packungen, sowohl für das Reine- als auch für das Mischsystem, ausgegangen werden kann.



**Abbildung 43** Mittlerer Ordnungsparameter für vier Moleküle der reinen ReLPS Monoschicht. Es finden sich in Analogie zu Abbildung 42 zwei Moleküle mit einem recht ähnlichen Verlauf des Ordnungsparameters (Nr. 1 und 9) und zwei, bei denen der Verlauf des Ordnungsparameters keinerlei Ähnlichkeit zu den anderen Molekülen aufweist.

Eine besondere Rolle nehmen die beiden Polymyxin B-Moleküle in der Auswertung des Mischsystems ein, da diese beiden Moleküle als Störung in die ReLPS-Monoschicht eingefügt worden sind. Da es nicht möglich ist die Lage und die Beweglichkeit des PmB in der Monoschicht im Verlauf der Simulation direkt zu zeigen, wurde zum einen der RMS-Wert (root mean square displacement) der 23 Ringatome als Funktion der Simulationszeit in Abbildung 44 aufgetragen. Bei der Berechnung des RMS-Wertes wurde die Ausgangs-

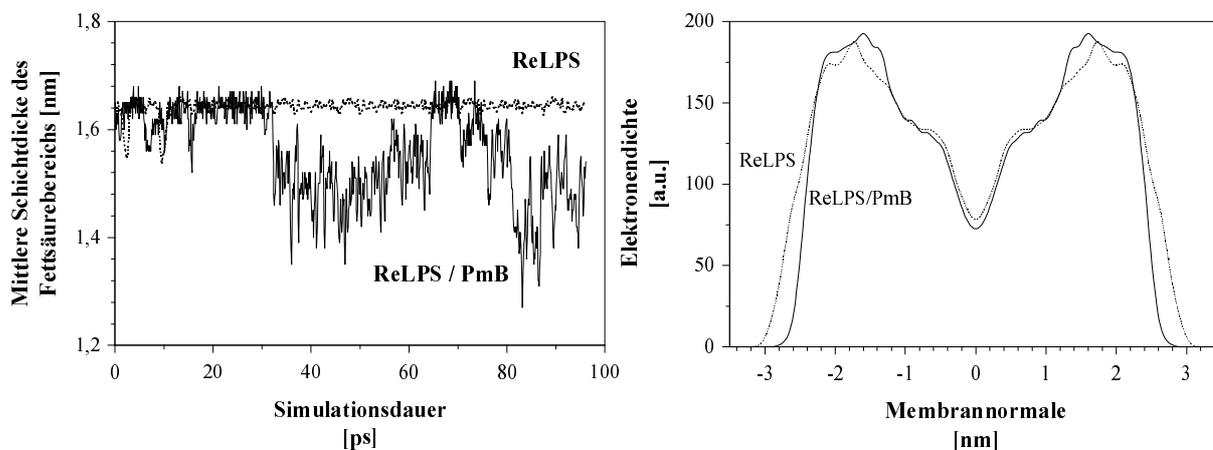


**Abbildung 44** Auftragung des RMS-Wertes der 23 Ringatome des Polymyxins als Funktion der Simulationszeit. Das Mischsystem wurde in 10 ps von 0K auf 350K aufgeheizt und anschließend für weitere 25 ps äquilibriert.

konformation des PmB-Moleküls zu Beginn der Simulation zugrunde gelegt. Man erkennt am starken Anstieg des RMS-Wertes deutlich, daß beide PmB-Moleküle nach der Aufheizphase sehr schnell, im Zeitraum von  $t = 10$  bis  $t = 15$  ps, ihre Position in der Monoschicht verändern.

Stärkere Schwankungen des RMS-Wertes sind bis  $t \sim 75$ ps zu erkennen. Anschließend bleibt der RMS-Wert im Bereich von 6 für das erste PmB-(PmB-1) und 8 für das zweite PmB-Molekül (PmB-2). Die Fluktuation der RMS-Werte ist auf die Beweglichkeit des Ringsystems zurückzuführen. Hervorzuheben ist, daß beide PmB-Moleküle nicht in gleicher Art und Weise in den Monofilm integriert werden, wie an den beiden unterschiedlichen Verläufen des RMS-Werte zu erkennen ist. Zu Beginn der Simulation liegen beide Moleküle in identischer Konformation vor. Bei einer ähnlichen Anordnung beider Ringe in der Monoschicht während der Simulation müßten beide Verläufe auf demselben Niveau liegen, was nicht der Fall ist.

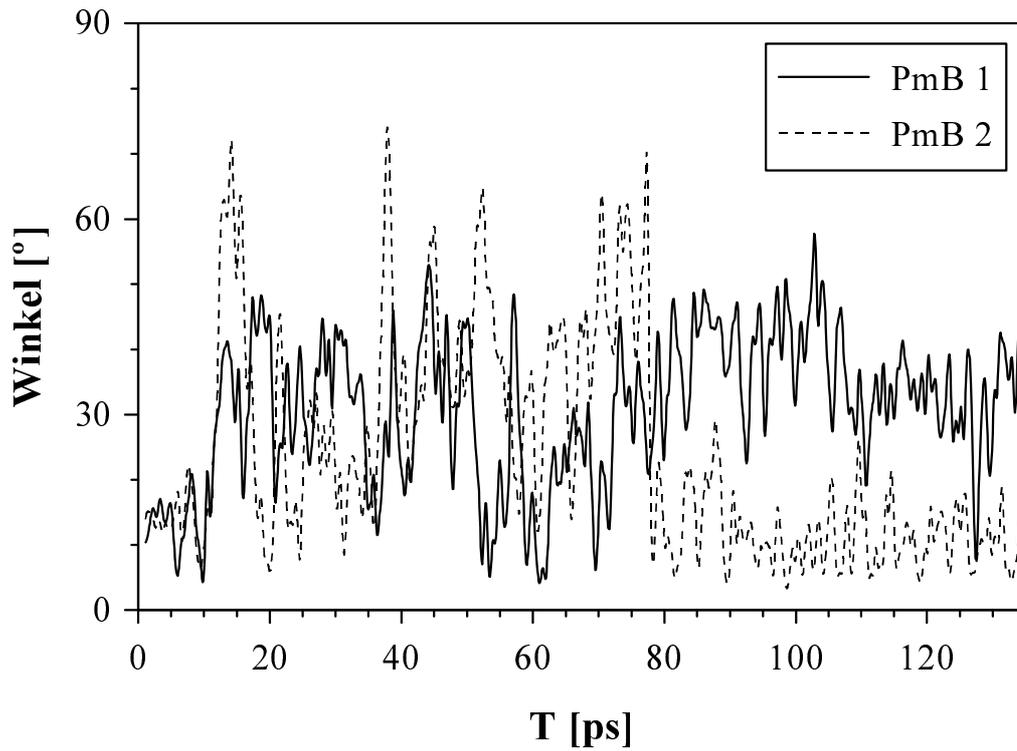
#### 4.6 Ergebnisse der Molekül-Dynamik Simulation



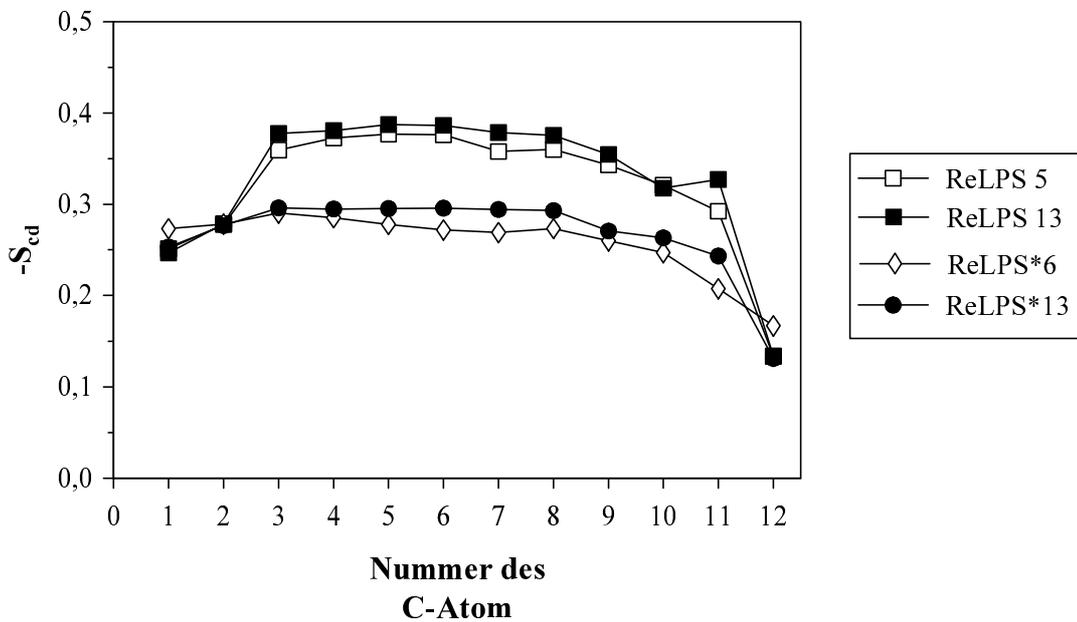
**Abbildung 45** Im linken Teil der Abbildung ist die mittlere Schichtdicke des reinen ReLPS-Systems der Schichtdicke des ReLPS / PmB-Mischsystems während des Simulationszeitraums von 100 ps einander gegenübergestellt.

Im rechten Teil ist die mittlere Elektronendichte (jeweils erweitert zu einer Doppelschicht) beider Monoschichtsysteme dargestellt. Das Mischsystem (durchgezogene Linie) zeigt einen um  $\sim 0,4$  nm reduzierten Doppelschichtabstand.

Die Beweglichkeit des Ringsystems wird auch in Abbildung 46 anhand des Winkels zwischen einer Ebene, die aus den 23 Ringatomen des PmB errechnet wurde, und der Membranoberfläche deutlich. Während wiederum in den ersten 80 ps (einschließlich Heiz- und Äquilibrierungsphase) ein schneller Anstieg des Winkelwertes und eine starke Fluktuation zu beobachten ist, sind die Veränderungen des Winkels nach diesem Zeitpunkt erheblich kleiner. Das Ringsystem von PmB-2 liegt nahezu unverkippt in der Membran, während das Ringsystem von PmB-1 leicht geneigt ist, was wiederum eine unterschiedliche Anordnung der beiden Polymyxinmoleküle im Monofilm belegt. Die Auswirkungen des Einbaus von PmB in eine ReLPS-Membran sind in Abbildung 45, Abbildung 47 und in Abbildung 50 zusammengefasst. In Abbildung 50 ist die Anordnung zum Beginn (**I**) der Simulation dargestellt, während in Teil **II** und **III** der Abbildung zwei typische Anordnungen während des Simulationszeitraums abgebildet sind. Man erkennt, daß das PmB-Molekül tief in die Membran integriert wird und keinerlei Lücken in der Membranoberfläche zu erkennen sind.

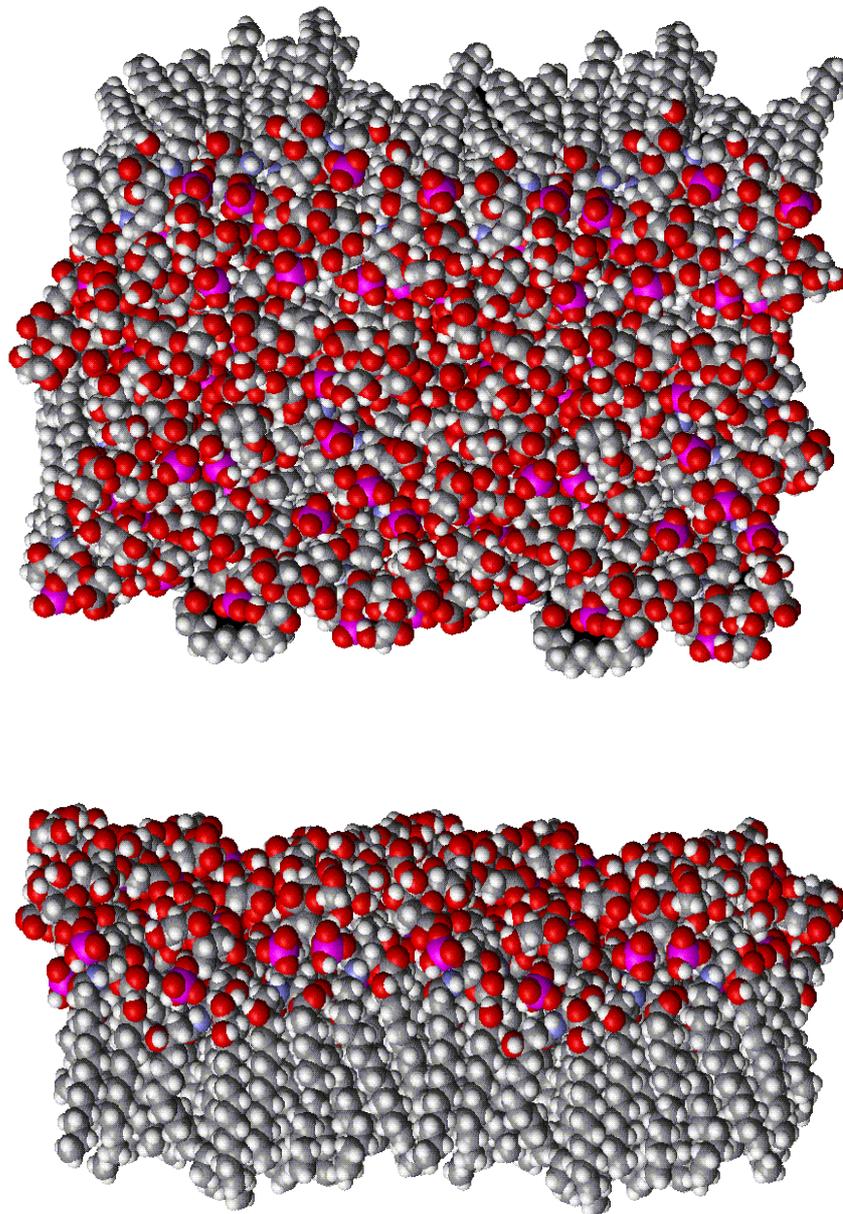


**Abbildung 46** Zeitlicher Verlauf des Winkels zwischen dem Ringsystem des PmB und der Membranebene.

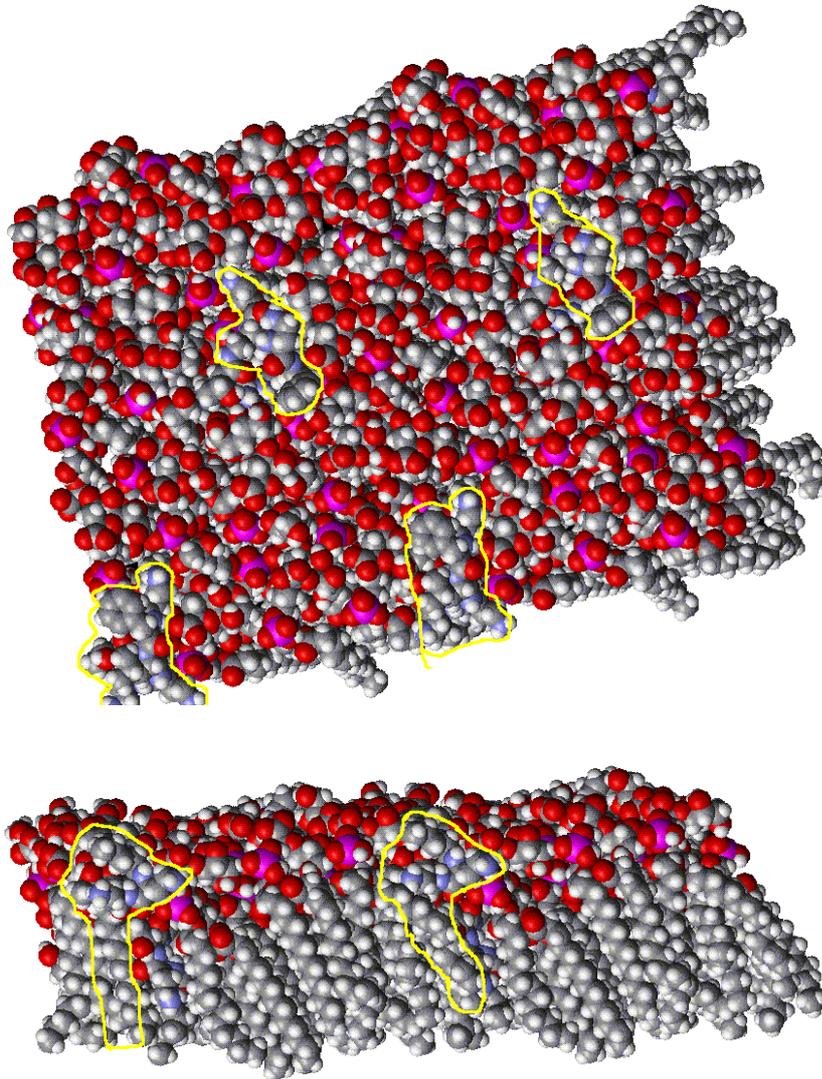


**Abbildung 47** Vergleich des mittleren Ordnungsparameters für jeweils zwei Moleküle beider Systeme (\* Mischsystem). Der Verlauf der Ordnungsparameter ist für das Mischsystem zu deutlich niedrigeren Werten verschoben.

#### 4.6 Ergebnisse der Molekül-Dynamik Simulation

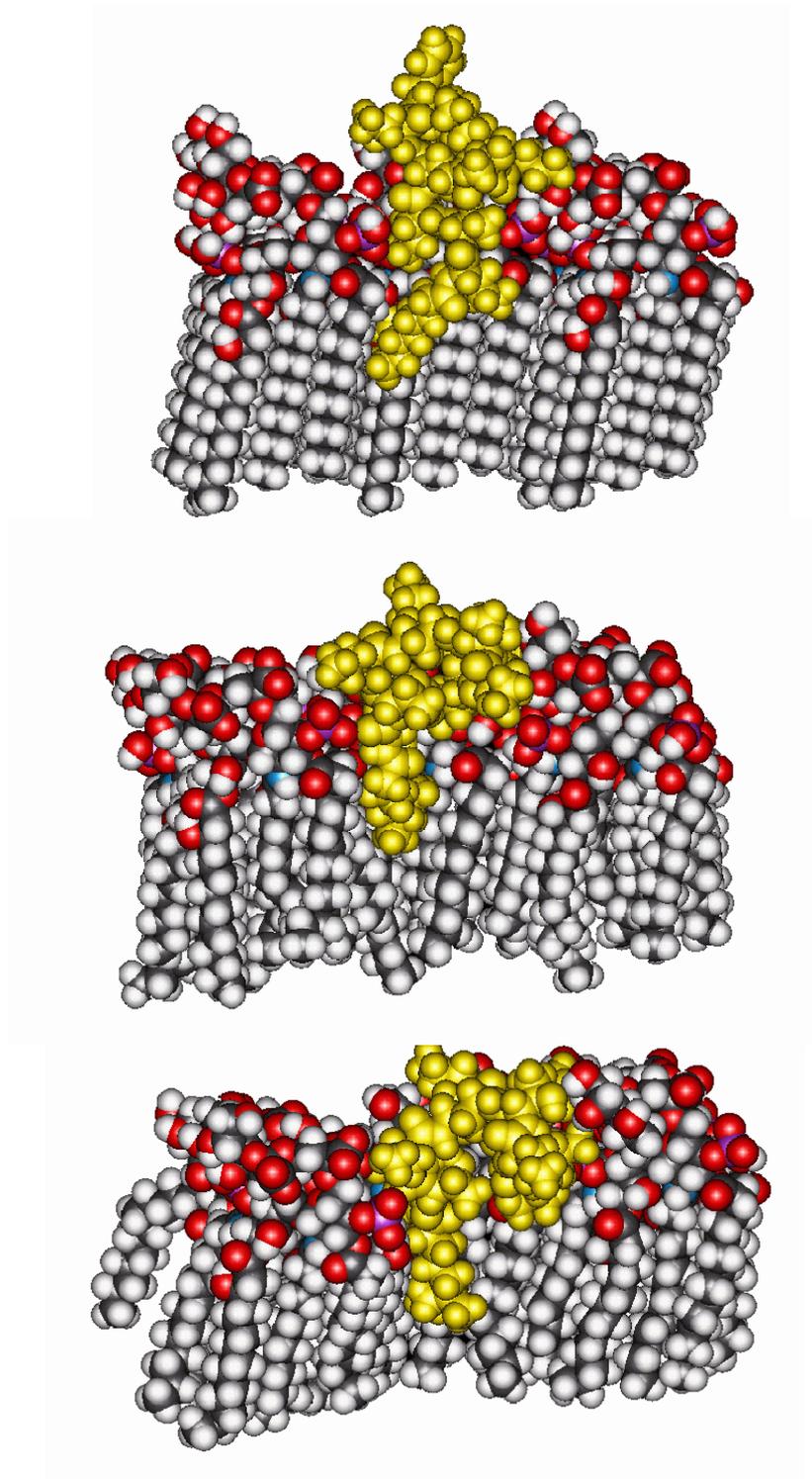


**Abbildung 48** *Verschiedene Ansichten der reinen ReLPS-Monoschicht nach 148 ps MD-Simulation bei 350 K. Zur besseren Übersicht ist die eigentliche Packung erweitert um eine Kopie abgebildet (insgesamt 32 Moleküle). Beide Ansichten zeigen die sehr dichte Packung sowohl im Fettsäure- als auch im Zuckerbereich.*



**Abbildung 49** Die Ansicht des Mischsystems PmB / ReLPS wurde ebenfalls um eine Kopie erweitert. In keiner der beiden Ansichten treten die Polymyxinmoleküle aus der Packung hervor. Auch in diesem System ist eine sehr dichte und geordnete Packung der Moleküle zu beobachten.

#### 4.6 Ergebnisse der Molekül-Dynamik Simulation



**Abbildung 50** *Abgebildet sind Ausschnitte des Mischsystems zu drei unterschiedlichen Simulationszeitpunkten. Das Polymyxin B-Molekül ist farblich von den Lipidmolekülen abgesetzt dargestellt.*

## Kapitel 4 Ergebnisse

In Abbildung 45 ist zu erkennen, daß im Unterschied zum reinen ReLPS-System, welches keinerlei Schwankungen der Schichtdicke zeigt, das ReLPS / PmB-Mischsystem deutlichen Veränderungen unterworfen ist. Im rechten Teil der Abbildung 45 ist anhand der Elektronendichteverteilungen beider Systeme die Abnahme der Schichtdicke dargestellt. Die Projektion der Elektronendichte wurde mit dem Programm MEMBRANE [127] aus einer über den gesamten Simulationszeitraum gemittelten Konformationen beider Monoschichten berechnet. Die Abnahme der Schichtdicke des Mischsystems beträgt bezogen auf den gesamten Simulationszeitraum  $\sim 0,2$  nm. Ebenso ist im direkten Vergleich der beiden Ensembles ein sehr unterschiedlicher Verlauf des Ordnungsparameters zu erkennen, wie in Abbildung 47 gezeigt. Die Fettsäureketten im Mischsystem weisen einen deutlich niedrigeren Ordnungsgrad auf als die entsprechenden Ketten im reinen ReLPS-Monoschichtsystem.

In der Abbildung 48 und in Abbildung 49 sind die beiden Monoschichtsysteme in zwei Ansichten abgebildet. In beiden Systemen sind weder in der Aufsicht noch in der Seitenansicht Lücken zu erkennen. Der Fettsäurebereich ist ebenfalls in beiden Fällen sehr kompakt. Das Polymyxin B (in Abbildung 49 umrandet) ist vollständig in die Membran eingebaut. Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefaßt werden:

- Es ist mit dem Verfahren von Kastowsky möglich [95], statische Monoschichtsysteme zu generieren, die auch in MD-Simulationen stabil sind.
- Die Einbeziehung von Wasser verringert nur die Beweglichkeit der Atome, hat aber keinen Einfluß auf die *Packung* der Moleküle.
- ReLPS-Moleküle zeigen unter den gegebenen Bedingungen entkoppelte Bewegungen im Fettsäurebereich.
- Der Einbau von PmB in die Monoschicht führt nicht zur Zersetzung der Monoschicht.
- Der Einbau von PmB führt a) zu einer Abnahme der Schichtdicke der Monoschicht, b) zu einem geringeren Ordnungsgrad im Fettsäurebereich und c) zu einer allgemein gesteigerten Molekülbeweglichkeit.