

5 Diskussion

In diesem Kapitel werden zunächst die Ergebnisse der einzelnen Methoden separat diskutiert. Anschließend wird anhand der Einzelergebnisse ein Wechselwirkungsmodell erarbeitet. Dieses wird mit den Meßergebnissen dieser Arbeit überprüft und mit anderen Modellen verglichen.

5.1 Diskussion der Röntgenuntersuchungen

Die Untersuchungen der dreidimensionalen Struktur durch Röntgenbeugung ist prinzipiell eine sehr leistungsfähige Methode, um Aussagen über die räumliche Gestalt und, davon abgeleitet, der Funktionsweise von Molekülen zu gewinnen. Für Lipopolysaccharide sind eine Reihe röntgenographischer Studien zur Struktur in Lösung und von wasserfreien Multischichtpräparaten publiziert worden [22, 44, 45, 48]. Bisher ist es allerdings noch nicht gelungen, eine Einkristallröntgenstrukturanalyse von Lipopolysacchariden durchzuführen, da bisher noch keine Kristalle ausreichender Qualität erzeugt werden konnten. Darüber hinaus bietet auch die Kristallstruktur keine Gewähr, ob es sich bei der ermittelten Struktur um die biologisch aktive Form handelt.

5.1.1 Einfluß von Polymyxin B (PmBN) auf ReLPS

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmalig Mischsysteme von ReLPS mit Polymyxin B bzw. Polymyxin B-Nonapeptid untersucht. Ziel dieser Untersuchungen war es, zu klären, welche Veränderungen in den Streukurven durch die Zugabe von PmB(N) hervorgerufen werden und welche strukturellen Modifikationen der Lipidpackung damit verbunden sind. Da schon die reinen LPS Proben, unabhängig vom gewählten Präparationsverfahren (*Langmuir-Blodgett* Verfahren, oder durch Antrocknen s. Kapitel 3.2.1.1.), verglichen mit Proben verschiedener Phospholipide Streukurven mit wenigen Reflexen liefern [22, 95], wurde eine Nachbehandlung der Proben etabliert, die eine Untersuchung von LPS-Mischsystemen ermöglicht [96]. Darüber hinaus wurde durch diese Nachbehandlung für eine reine ReLPS-Probe sowohl die Stapelordnung der lamellaren Schichten als auch die Packung der einzelnen Moleküle innerhalb einer Doppelschicht soweit verbessert, daß die gemessene Streukurve eine vergleichbare Anzahl und Halbwertsbreite der Reflexe liefert, wie ein Diffraktogramm einer kristallinen DLPE-Probe [103].

Kapitel 5 Diskussion

Alle röntgenographisch untersuchten Proben von Mischungen aus ReLPS und Polymyxin B (bzw. PmBN) zeigen nach der anfänglichen Präparation nur einen breiten Reflex der ersten Ordnung. Durch die Nachbehandlung wurden bei allen Proben mindestens drei Reflexe beobachtet (s. Abbildung 18, Abbildung 20, Tabelle 3, Tabelle 4). Einzige Ausnahme bildet die äquimolare Mischung ReLPS / PmB, für die in allen Fällen jeweils nur ein einziger Reflex gemessen werden konnte.

Alle Streukurven zeigen ausschließlich Reflexe einer einzigen lamellaren Struktur. Mit zunehmendem PmB(N)-Anteil nimmt der Doppelschichtabstand deutlich ab. Die stetige Reduzierung der Schichtdicke und das Auftreten einer einzigen Periodizität kann verschiedene Ursachen haben. Eine Veränderung des Doppelschichtabstandes ist zu beobachten, wenn sich der Tiltwinkel der Moleküle bezogen auf die Membrannormale in einer Doppelschicht verändert. Dieser Effekt ist z.B. beim Übergang eines Lipidsystems von der unverkippten L_{β} -Phase in die verkippte L_{β}' -Phase zu beobachten. Vergrößert sich der Tiltwinkel, dann nimmt der Doppelschichtabstand ab. Allerdings wurde von Sabisch in theoretischen Simulationsrechnungen für die Anordnung von ReLPS-Molekülen in Multischichtsystemen nur eine geringe Abhängigkeit des Doppelschichtabstandes vom Tiltwinkel gefunden [104]. Berücksichtigt man, daß die Lipide in einer Membran nicht einen beliebigen Tiltwinkel einnehmen können, da ansonsten keine stabile Packung mehr möglich ist, dann ist davon auszugehen, daß die in den Röntgenmessungen ermittelte Abnahme der Periodizität nicht, bzw. nicht ausschließlich auf eine Änderung des Tiltwinkels der einzelnen Moleküle in den Lamellen zurückgeführt werden kann.

Eine Verringerung des Doppelschichtabstandes ist auch durch Aufschmelzen des Fettsäurebereiches, d.h. durch den Übergang in die L_{α} -Phase, möglich (s. Abbildung 6). In den untersuchten Mischsystemen aus Lipopolysacchariden und Polymyxin B wird das PmB nicht an der Oberfläche der lamellaren LPS Schichten gebunden, wie es für Phospholipide [66, 67, 105] und in ähnlicher Form auch für Lipopolysaccharide [16] vorgeschlagen worden ist, sondern vollständig in die Schichtstruktur integriert, da ansonsten keine Abnahme des Doppelschichtabstandes gemessen werden würde, sondern vielmehr eine Zunahme. Der Einbau von PmB in die LPS-Lamellen verändert die Eigenschaften einer LPS-Membran in zwei Bereichen. Da das hydrophile Ringsystem des PmB deutlich mehr Platz beansprucht als der lipophile Rest (s. Abbildung 5), kann nach Israelachvili für Polymyxin B ein Formfaktor von

5.1 Diskussion der Röntgenuntersuchungen

$S \ll 1$ angenommen werden. Die Querschnittsfläche des hydrophilen und des hydrophoben Bereichs des LPS ist in etwa gleich groß, so daß für LPS ein Formfaktor von $S \approx 1$ anzunehmen ist. Durch den Einbau des Polymyxins kommt es zum Aufschmelzen des Fettsäurebereiches der ReLPS-Lamellen, da einige Fettsäureketten der Lipide den geringen Flächenbedarf des PmB im lipophilen Bereich der Membran ausgleichen. Es kommt zu einer Abnahme des Doppelschichtabstandes.

Gleichzeitig wird durch die Integration des Polymyxin B die Oberflächenladung der Lamellen reduziert. Jedes ReLPS Molekül trägt bei physiologischen Bedingungen durchschnittlich vier negative Ladungen (in Abhängigkeit vom Substitutionsgrad) [106], während PmB unter denselben Bedingungen fünf positive Ladungen trägt.

Durch den Einbau von PmB in die Lamellen wird die Stapelordnung der Proben verringert. Die Anzahl an periodisch angeordneten Schichten ist bei den Mischsystemen kleiner als bei reinen ReLPS-Systemen. Dies wird durch die Zunahme der Halbwertsbreite der Reflexe - eine kleinere Halbwertsbreite entspricht einer größeren Anzahl an gestapelten Schichten [59] - bei steigendem PmB Anteil (s. Tabelle 3, Tabelle 4) belegt.

Ein ähnlicher Einfluß von Polymyxin B auf den Doppelschichtabstand verschiedener Phospholipid / PmB-Mischsysteme wurde in der Literatur beschrieben [107,108,109]. Bei hohen Polymyxin-Konzentrationen wurden bei diesen Systemen auch interdigitierte Phasen beschrieben. Für lamellare Phasen von DPPG / PmB-Mischungen wurde eine Abnahme des Doppelschichtabstandes von 5,85 nm für reines DPPG auf 4,49 nm für eine Mischung $n[\text{DPPG}] / n[\text{PmB}] = 5 / 1$ gemessen [108], die in sehr guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit stehen.

Für das Polymyxin B-Nonapeptid sind keine anderen Daten bekannt, so daß nur ein Vergleich mit den entsprechenden PmB-Mischsystemen möglich ist. Die Abnahme des Doppelschichtabstandes mit zunehmender PmBN-Konzentration fällt in allen Proben wesentlich kleiner aus, als für die vergleichbaren ReLPS / PmB-Mischungen. Die Beeinflussung von ReLPS-Lamellen durch PmBN ist von der Tendenz her vergleichbar mit dem Einfluß von Polymyxin B. Der Einfluß ist aber insgesamt deutlich schwächer. Zusammenfassend sind die folgenden Ergebnisse der Röntgenuntersuchungen an PmB(N) / ReLPS-Mischsystemen hervorzuheben:

- PmB und PmBN werden vollständig in die ReLPS-Membran integriert.
- Der Einbau von PmB(N) führt zu einer Reduzierung des Doppelschichtabstandes von ReLPS-Membranen durch Aufschmelzen des Fettsäurebereichs.
- Die Mischsysteme zeigen immer weniger Reflexe als vergleichbare Proben der reinen Lipide, gleichzeitig nimmt die Halbwertsbreite der Reflexe zu. Es wird sowohl die Stapelordnung als auch die Ordnung innerhalb der Schichten durch PmB(N) reduziert.

5.2 *Diskussion der Monofilmentuntersuchungen*

Die Monofilmentuntersuchungen gliedern sich in zwei Abschnitte. Zunächst wurde durch die Variation verschiedener Untersuchungsbedingungen versucht, eine möglichst exakte Charakterisierung von ReLPS-Monofilmen zu erzielen. Im Anschluß an diese Untersuchungen wurde die Wechselwirkung von ReLPS mit Polymyxin B (und PmBN) detailliert analysiert. Dazu wurden zwei strukturell verwandte ReLPS Typen von unterschiedlichen Bakterien untersucht. Einerseits wurde das kommerziell erhältliche ReLPS von *Salmonella minnesota* R595 in der Zusammensetzung verwendet, wie es von *SIGMA* vertrieben wird, und andererseits wurde hoch gereinigtes ReLPS von *Escherichia coli* verwendet, das freundlicherweise von N. Qureshi (Madison, USA) zur Verfügung gestellt worden ist. Der Grund für die Wahl dieser beiden Substanzen bestand darin, daß das Material von *SIGMA* zwar größeren Schwankungen in der Zusammensetzung der verschiedenen ReLPS-Komponenten unterliegt (s. 3.1.1.), gleichwohl dieses Material aber in großen Mengen und allgemein verfügbar ist und häufig in Studien anderer Arbeitsgruppen eingesetzt wird. Allerdings erlaubt dieses Material in vielen Fällen aufgrund seiner Inhomogenität [32,50] keine eindeutige Analyse von strukturellen Eigenschaften, da alle Untersuchungen immer an einem Gemisch aus verschiedenen Komponenten durchgeführt werden.

Im Gegensatz dazu erlaubt das gereinigte Material von *E. coli* genau in diesen Fällen eine klare Analyse, da es sich nur um eine einzige Komponente des natürlichen Isolates handelt (s. 3.1.1.2.). Allerdings ist dieses Material nur in geringen Mengen verfügbar, so daß wiederum umfangreichere Messungen mit diesem Material nicht möglich sind.

5.2 Diskussion der Monofilmmuntersuchungen

5.2.1 Unterschiede der Isothermen von *S. minnesota* und *E. coli* ReLPS

Wie eingangs erwähnt, wurden im Rahmen dieser Untersuchungen ReLPS von zwei unterschiedlichen Stämmen verwendet. Die Zusammensetzung von ReLPS von *Salmonella minnesota* ist insgesamt deutlich inhomogener und setzt sich aus mindestens fünf Komponenten zusammen [32, 50, 92]. Dementsprechend verwundert es nicht, daß die gemessenen Isothermen von *S. minnesota* ReLPS einen für komplexe Lipid-Mischsysteme typischen Verlauf (s. Abbildung 22) in Form eines gleichmäßigen Anstieges der Isotherme zeigen. Der Phasenübergang ist nur sehr schwach ausgeprägt.

Im Kontrast zu diesen Messungen stehen die Isothermen von *E. coli* ReLPS. Bei dieser Substanz handelt es sich ausschließlich um die hexa-acyl-Variante des ReLPS, bestehend aus einem Bisphosphoryl-Lipid A, an das zwei KDO-Einheiten gebunden sind. Die Isotherme auf reinem Wasser zeigt einen völlig anderen Verlauf. Der Anstieg bis zum Phasenübergang ist flacher, während der Phasenübergang sich deutlicher in Form eines Sattelpunktes in der Isotherme abzeichnet. Die Kompressibilität im sich anschließenden fest-analogen Bereich ist erheblich kleiner, was auf eine sehr dichte Packung der Moleküle im Monofilm hinweist. Der Phasenübergang reagiert auf eine Temperaturveränderung bzw. auf Kationen in der Subphase völlig analog wie das ReLPS von *Salmonella minnesota*.

Die unterschiedliche Flächenbelegung pro Molekül für die beiden LPS, einerseits $A_0(S. minnesota) = 1,59 \text{ nm}^2$ und andererseits $A_0(E. coli) = 1,45 \text{ nm}^2$, ist auf die unterschiedliche Zusammensetzung der verwendeten Substanzen zurückzuführen. Für *Salmonella minnesota* ReLPS wurden für drei unterschiedliche Chargen drei verschiedene A_0 -Werte ermittelt ($1,55 \text{ nm}^2$; $1,59 \text{ nm}^2$; $1,64 \text{ nm}^2$). Die Abweichung durch die Präparation innerhalb einer Charge ist wesentlich kleiner ausgefallen (i.d.R. $\delta A_0 = 0,02 \text{ nm}^2$). Demnach ist für Wechselwirkungsstudien sicherzustellen, daß nur Material einer einzigen Charge eingesetzt wird.

Der Phasenübergang wird mit zunehmender Temperatur linear zu höheren Druckwerten verschoben, wie in Abbildung 23 gezeigt. Dieses Verhalten ist auf die proportional zur Temperatur gesteigerte kinetische Energie der Moleküle zurückzuführen, die der Ausbildung von geordneten Strukturen (Kristallisation) entgegenwirkt. Bei Raumtemperatur ist ein Druck von $\sim 30 \text{ mN/m}$ nötig, um auf Aqua tridest. einen ReLPS-Monofilm in die Gel-Phase zu überführen.

Kapitel 5 Diskussion

Die in der Literatur beschriebenen Isothermen für ReLPS von *S. minnesota* [46] unterscheiden sich kaum von den hier vorgestellten Messungen. Für reines *E. coli* ReLPS sind bisher keine Isothermen publiziert, so daß ein Vergleich mit Literaturdaten nicht möglich ist. Aufgrund der komplexen Struktur von LPS, durchschnittlich sechs Fettsäureketten gebunden an zwei Glucosamine, ist der Vergleich der Isothermen von Phospholipiden oder anderen Membranbausteinen kaum möglich, da die Unterschiede in der chemischen Konstitution, der Einheitlichkeit des Materials und dem Aggregationsverhalten zu groß sind.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß Isothermen von *Salmonella minnesota* ReLPS einen einfachen Verlauf zeigen, während Isothermen von *E. coli* ReLPS ein sehr charakteristisches Erscheinungsbild aufweisen. In beiden Fällen ist eine sehr hohe Sensitivität gegenüber Temperatur- und Subphasenbedingungen zu konstatieren. Aufgrund des ausgeprägten Phasenübergangs des *E. coli* ReLPS sind bei diesem Lipid schon sehr geringe Einflüsse durch Ionen und andere Substanzen festzustellen. Bei *S. minnesota* sind Veränderungen der Isotherme aufgrund des nur schwach ausgeprägten Phasenübergangs schwerer zu analysieren, aber dennoch möglich.

5.2.2 Einfluß von Alkali- und Erdalkaliionen auf den Isothermenverlauf

ReLPS-Monofilme reagieren sehr empfindlich auf veränderte Bedingungen. Sowohl Veränderungen der Temperatur als auch der Ionenzusammensetzung in der Subphase lassen sich unmittelbar am Isothermenverlauf ablesen.

Besondere Beachtung ist dem unterschiedlichen Einfluß von Alkali- und Erdalkaliionen zu widmen. Während Natrium- und Kaliumionen in Vorversuchen ein nahezu identisches Verhalten gezeigt haben und der Phasenübergang sich kontinuierlich zu höherem Druck verschoben hat, d.h. der Ordnungsgrad des Monofilms reduziert wird, zeigen die Erdalkaliionen mit Ausnahme von Magnesiumchlorid, einen genau entgegengesetzten Einfluß. Der Phasenübergang in die Gel-Phase findet bei einem deutlich niedrigeren lateralen Druck statt.

5.2 Diskussion der Monofilmmuntersuchungen

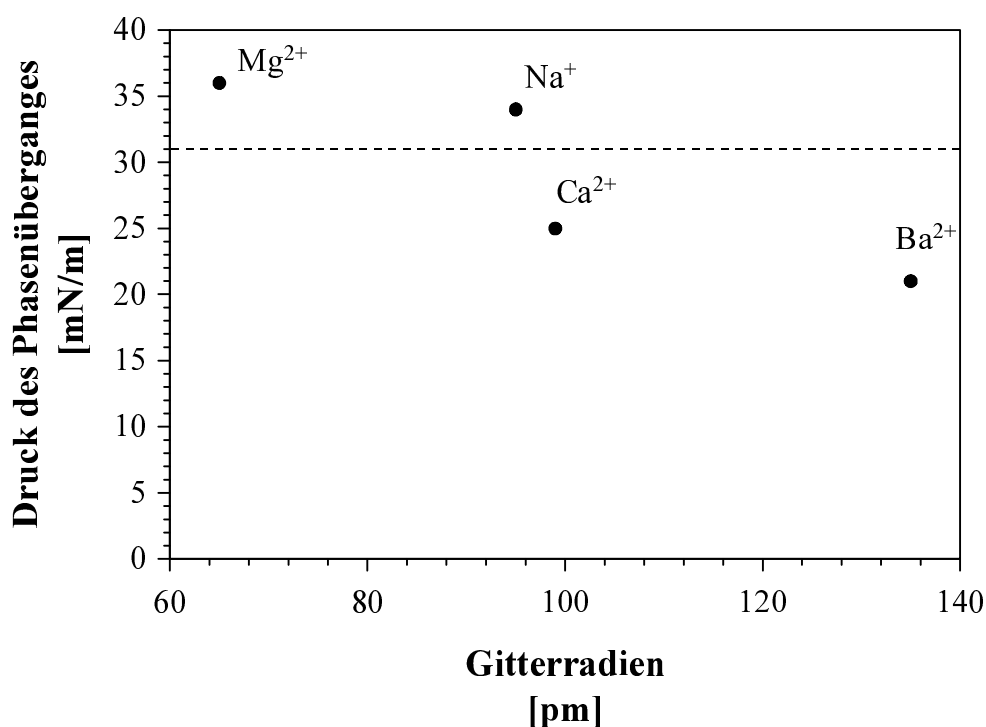


Abbildung 51 Zusammenhang zwischen dem Gitterradius [110] verschiedener Ionen und dem Phasenübergang von ReLPS-Monofilmen. Die gestrichelte Linie markiert den Phasenübergang von ReLPS auf *Aqua tridest*.

Während MgCl_2 bei gleicher Ionenstärke ebenso wie Natriumchlorid zu einer etwas stärkeren Anhebung des Phasenüberganges führt, der dem Einfluß von Natriumionen entspricht, ist in Gegenwart von Calcium- oder Bariumchlorid ein genau entgegengesetztes Verhalten zu konstatieren. Der Phasenübergang wird in der Gegenwart dieser zweiwertigen Ionen signifikant zu niedrigen Drücken verschoben. In Abbildung 51 ist der Lateraldruck des ReLPS-Monofilms beim Phasenübergang über dem jeweiligen Ionenradius aufgetragen. Der Ionenradius von Natrium und Calcium ist nahezu identisch, allerdings trägt Calcium zwei Ladungen, während Natrium nur einfach positiv geladen ist. Nur Ionen, die eine bestimmte Größe und Ladungsdichte nicht unterschreiten, scheinen in der Lage zu sein, intermolekulare Salzbrücken (Phosphat-Kation-Phosphat) zwischen verschiedenen Lipidmolekülen in Monofilmen auszubilden. Diese intermolekularen Wechselwirkungen führen zu einer höheren Ordnung der Packung einzelner Moleküle im Monofilm, so daß schon bei einem kleineren lateralen Druck der Übergang in den festanalogen Zustand beobachtet wird [111]. Dies bedeutet auch, daß eine direkte Verbindung zwischen der Wechselwirkung benachbarter ReLPS-Kopfgruppen und dem Ordnungsgrad des Fettsäurebereiches besteht. Diese Beein-

flussung des Phasenübergangs von ReLPS-Monofilmen durch Kationen wird in analoger Form auch für verschiedene Phospholipide beschrieben [112,113,114] und stellt demnach keine spezielle Eigenschaft von ReLPS dar, sondern vielmehr ein allgemein anzutreffendes Verhalten von negativ geladenen Lipidmonofilmen.

Die Ergebnisse der beiden vorangegangenen Abschnitte über das Phasenverhalten von ReLPS-Monofilmen unter verschiedenen Bedingungen bilden die Grundlage für die anschließende Wechselwirkungsstudie mit Polymyxin B und PmBN.

5.2.3 Wechselwirkung von ReLPS-Monofilmen mit PmB(N)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig die Wechselwirkung von Polymyxin B und dem daraus abgeleiteten Polymyxin B-Nonapetid mit ReLPS durch Monofilmmessungen untersucht. Diese Messungen sollten Rückschlüsse über die Stöchiometrie, die Affinität und über die molekulare Orientierung des eingelagerten Polymyxin B bzw. des PmBN in ReLPS-Monofilmen liefern.

Die in Tabelle 6 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen deutliche Unterschiede in den Flächenänderungen des Monofilms, in Abhängigkeit vom verwendeten LPS und der eingelagerten Komponente. Die unterschiedlichen prozentualen Flächenänderungen sind einerseits auf die verschiedenen A_0 -Werte von *S. minnesota* und *E. coli* ReLPS zurückzuführen, da dieser Wert direkt mit der prozentualen Flächenänderung verknüpft ist. Bei einem kleineren A_0 -Wert der Lipidkomponente ist die prozentuale Flächenänderung, die durch die Einlagerung einer definierten Menge PmB hervorgerufen wird, größer als bei einem Lipid mit einem großen A_0 -Wert. Die Stöchiometrie der Wechselwirkung zwischen PmB und ReLPS errechnet sich allgemein aus

$$n = \frac{(\Delta A_{\text{Einlagerung}} - 100) * A_0 (\text{Lipid})}{100 * A_0 (\text{PmB})}$$

Aus den Werten der Tabelle 6 und der Flächenbelegung von ReLPS und Polymyxin B ergeben sich damit die folgenden Stöchiometrien

$$n_{S. \text{ minnesota}} = \frac{(150,6 - 100) * 1,59 \text{ nm}^2}{100 * 1,17 \text{ nm}^2} = 0,69 \quad \text{und}$$

5.2 Diskussion der Monofilmmuntersuchungen

$$n_{E.coli} = \frac{(184,4 - 100) * 1,45 \text{ nm}^2}{100 * 1,17 \text{ nm}^2} = 1,02$$

Demnach binden Monofilme von *E. coli* ReLPS im Vergleich zu Monofilmen von *S. minnesota* ReLPS bis zu 48% ($n_{E.coli} / n_{S.minnesota}$) mehr Polymyxin B. Dieser Unterschied in der Stöchiometrie ist auf das unterschiedliche Substitutionsmuster der beiden LPS-Typen zurückzuführen. Neben der variablen Zusammensetzung im Fettsäurebereich von *S. minnesota* LPS findet man auch Substitutionen der beiden Phosphatgruppen und der beiden KDO-Zucker durch Pyrophosphat, Ethanolamin oder Aminoarabinose [32, 50]. Diese Substitutionen reduzieren die negative Ladung des Moleküls, was dazu führt, daß weniger PmB gebunden, bzw. in den Monofilm integriert wird. Der gleiche Effekt ist bei PmB-resistenten Bakterienstämmen zu beobachten, bei denen ebenfalls eine deutliche Abnahme der negativen Ladung der jeweiligen Lipopolysaccharide durch zusätzliche Substitution der geladenen Gruppen zu beobachten ist [115, 116].

Aufgrund der ermittelten Stöchiometrie der Wechselwirkung zwischen PmB und ReLPS ist davon auszugehen, daß Polymyxin B in den Monofilm eingebaut wird, bis die negative Ladung der Lipidmoleküle in etwa neutralisiert ist. Während PmB bei pH = 7,0 fünf positive Ladungen trägt, liegt ReLPS von *E. coli* am Neutralpunkt vierfach negativ geladen vor, so daß theoretisch ein Wert von $n = 0,8$ zu erwarten wäre, der gut mit den experimentell ermittelten Werten übereinstimmt. Allerdings muß bei sehr hohen Polymyxin-Konzentrationen berücksichtigt werden, daß die Flächenbelegung von ReLPS nicht mehr dem theoretischen A_0 -Wert einer idealen Packung entspricht, sondern zu größeren Werten verschoben ist, so daß die ermittelten Stöchiometrien einen oberen Grenzwert darstellen. Eine Ladungsneutralisation durch den Einbau von PmB ist analog für eine Reihe von negativ geladenen Phospholipidsystemen beschrieben worden [66, 67, 105, 68, 109]. In allen Fällen wird eine Stöchiometrie für die Wechselwirkung zwischen dem Lipid und PmB angegeben, die einer Ladungsneutralisation entspricht. Die ermittelte Flächenbelegung von PmB mit $A_0(\text{PmB}) = 1,17 \text{ nm}^2$ stimmt gut mit der Flächenbelegung von Polymyxin B in DPPG-Monofilmen ($A_0(\text{PmB}) = 1,23 \text{ nm}^2$) überein, die von Mashak et al. ermittelt worden ist [68].

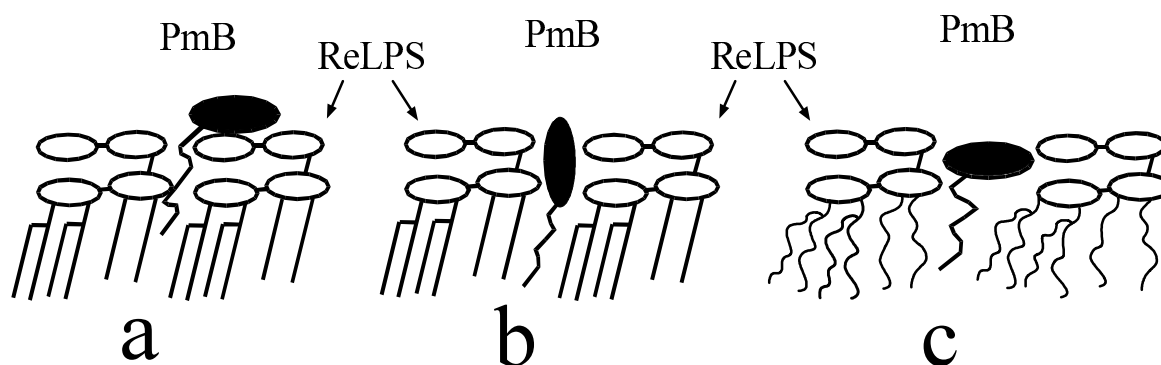


Abbildung 52 *Drei Modelle für den Einbau von PmB in eine Membran. Modell (a) wurde von Hartmann für Phospholipidsysteme diskutiert [66, 67, 105]. Allerdings kann mit diesem Modell weder die Flächenänderung für Phospholipid- [66, 67, 68, 105, 109] noch für LPS-Monofilme erklärt werden [63].*

Denkbar wäre auch ein Einbau des PmB, bei dem das Ringsystem parallel zur Membrannormalen angeordnet ist (b). Auch mit diesem Modell läßt sich die gemessene Flächenvergrößerung nicht erklären. Für diese beiden Modelle wäre mit einer Flächenvergrößerung von 1/6 (Einbau einer Fettsäure) bis zu maximal 1/3 (Einbau einer Fettsäure und des Ringsystems) der ursprünglichen Monofilmsfläche zu rechnen. Die dritte Variante (c) erklärt die experimentell ermittelte Flächenänderung und steht darüber hinaus in voller Übereinstimmung mit der ermittelten Reduzierung des Doppelschichtabstandes in den Röntgenmessungen. Die beiden anderen Varianten (a,b) würden keine Erklärung für eine Abnahme des Doppelschichtabstandes liefern, für die Variante (a) wäre sogar mit einer Zunahme des Doppelschichtabstandes zu rechnen.

Die Flächenbelegung des Polymyxin B von ca. $1,17\text{nm}^2$ (s. 4.2.4.), entspricht beinahe der Fläche eines ReLPS Moleküls ($A_{E.coli} = 1,45\text{nm}^2$). Daher können eine Reihe von möglichen Modellen für die Wechselwirkung von PmB mit einem ReLPS-Monofilm von vornherein verworfen werden. Um eine solche Flächenbelegung zu erzielen, muß das Ringsystem des PmB vollständig parallel zur Membranebene eingebaut werden. Die Integration der Fettsäure allein (s. Abbildung 52 a) würde nur zu einer geringfügigen Flächenvergrößerung in der Größenordnung von 15 - 20% ($\sim 0,2\text{-}0,25\text{nm}^2$ für eine einzelne Fettsäurekette) in den Monofilmsexperimenten führen. Gleichzeitig müßte das Ringsystem des PmB oberhalb der Membranebene angeordnet sein, wie es von Hartmann et al. vorgeschlagen worden ist [67]. Eine solche Anordnung hätte in den Röntgenmessungen zu einer Zunahme des Doppelschichtabstandes führen müssen, was nicht beobachtet wurde.

5.2 Diskussion der Monofilmsuntersuchungen

Ein Einbau (s. Abbildung 52 b) des Ringsystems parallel zur Membrannormalen würde ebenfalls keine Erklärung für die Ergebnisse der Monofilmsuntersuchungen und der Röntgenmessungen liefern, da die zu erwartende Flächenänderung bei höchstens 30 - 40% liegt. Nur die in Abbildung 52 c gezeigte Anordnung des Polymyxin B mit einem parallel zur Membran angeordneten Ringsystem, das vollständig in die Monoschicht integriert ist, erklärt alle vorliegenden Meßergebnisse.

Im direkten Vergleich der Flächenänderung, die durch die Einlagerung von PmB bzw. von PmBN hervorgerufen wird, fällt auf, daß PmBN eine deutlich kleinere Änderung der Monofilmsfläche bewirkt. Strukturell unterscheiden sich PmB und PmBN nur durch das Fehlen der lipophilen Fettsäurekette und einer Aminosäure. Es wird durch PmBN nicht annähernd die Flächenänderung hervorgerufen, die unter gleichen Bedingungen durch PmB erzeugt wird. Da sich die positive Ladung von PmB und PmBN bei physiologischen pH-Werten nicht unterscheidet, muß die fehlende Fettsäure ausschlaggebend für die unterschiedlich starke Wechselwirkung mit ReLPS-Monofilmen sein, da die räumliche Struktur des Ringsystems im Polymyxin B und im PmBN identisch ist [24, 41].

Kahle hat in Monofilmsuntersuchungen gezeigt, daß die Einlagerung von PmBN und PmB um die selben Bindungsstellen konkurrieren [117]. Dabei wurde unter anderem auch gezeigt, daß PmB in der Lage ist, PmBN vollständig aus einem ReLPS-Monofilm zu verdrängen, während keine Flächenänderung festgestellt wurde, wenn ein PmB gesättigter Film über eine Subphase plaziert wurde, in der PmBN gelöst ist. Zusätzlich wurde von Kahle festgestellt, daß ein mit PmBN gesättigter Monofilm nicht in der Lage ist zusätzlich Polymyxin B zu binden, sondern immer eine Substitution von PmBN durch PmB zu beobachten ist [118]. Es ist daher bei den gemessenen Flächenänderungen von einer Sättigung des ReLPS-Monofilms mit PmBN auszugehen, so daß die Flächenbelegung von PmBN wie folgt aus den Meßergebnissen abgeschätzt werden kann:

$$A_0(PmNB) = \frac{(\Delta A_{\text{Einlagerung}} - 100) * A_0(\text{Lipid})}{100 * n} \quad , \text{daraus folgt}$$

$$A_0^{S. \text{minnesota}}(PmNB) = \frac{(129,8 - 100) * 1,59 \text{ nm}^2}{100 * 0,7} = 0,68 \text{ nm}^2$$

$$A_0^{E. coli} (PmNB) = \frac{(137,0 - 100) * 1,45 \text{ nm}^2}{100 * 1,0} = 0,54 \text{ nm}^2$$

Die Flächenbelegung von PmBN ist im Mittel mit $A_0 \approx 0,61 \pm 0,07 \text{ nm}^2$ anzusetzen. Eine direkte Bestimmung, wie für PmB (s. Kapitel 4.2.5.), war nicht möglich, da keine stabilen Monofilme durch Aufgeben von Mischungen von PmBN / ReLPS auf die Subphase in den Experimenten erhalten werden konnten. Dieser im Vergleich zu PmB relativ kleine Wert für die Flächenbelegung deutet auf eine andere Orientierung des Moleküls im Monofilm hin, wenn man zugrunde legt, daß die Orientierung der Lipidmoleküle unverändert bleibt. Eine Anordnung wie in Abbildung 52b gezeigt, würde in etwa dieser Flächenbelegung entsprechen.

Die vorliegenden Ergebnisse der Monofilmsuntersuchungen belegen, daß die amphiphilen Eigenschaften des Polymyxin B-Moleküls einen erheblichen Einfluß auf die Wechselwirkung mit ReLPS-Monofilmen haben.

5.2.4 Beeinflussung der Penetration durch Variation der Ladung des Monofilms

Neben strukturellen Aspekten wurde die Rolle der elektrostatischen Wechselwirkung für die Einlagerung von PmB in ReLPS-Monofilme durch Variationen der Lipidmatrix untersucht. Durch Zugabe von positiv geladenem Stearylamin zum ReLPS wurde die negative Ladung des Monofilms schrittweise reduziert. Während sehr kleine Mengen an Stearylamin [$n[\text{Stearylamin}] / n[\text{ReLPS}] \leq 1$] keine Beeinträchtigung auf die Penetration des Monofilms durch PmB bewirken, nimmt die Einlagerung bei steigendem Stearylaminanteil stetig ab. Dieses Verhalten wurde auch von Teuber für die Wechselwirkung von radioaktiv markiertem PmB mit verschiedenen Lipiden in Gegenwart von Stearylamin beschrieben [119].

Im Gegensatz zeigt die Zugabe eines neutralen Lipids (Diacylglycerol = DAG) keinerlei Einfluß auf die Einlagerung von Polymyxin B [63]. Diese beiden Befunde sind in zweierlei Hinsicht von Bedeutung. Einerseits kann anhand des Experiments mit dem neutralen Lipid DAG darauf geschlossen werden, daß die Einlagerung von PmB in eine Membran, bzw. in einen Monofilm durch eine Reduzierung der Membranladungsdichte nicht beeinflußt wird. An die Membran gebundene Kationen, die im Gleichgewicht mit dem Lösungsmittel stehen,

5.2 Diskussion der Monofilmmuntersuchungen

behindern die Penetration des Monofilms durch PmB ebenfalls nicht. Positiv geladene Lipide beeinträchtigen hingegen die Einlagerung von PmB in einen ReLPS-Monofilm. Ursächlich für den unterschiedlichen Einfluß der Kationen bzw. der positiv geladenen Lipide sind die sehr unterschiedlichen Gleichgewichtslagen der beiden Bestandteile. Während die Kationen, die an der Membran gebunden sind, verhältnismäßig schnell mit ungebundenen Kationen im Lösungsmittel ausgetauscht werden können, erfolgt nahezu kein Austausch der Lipidmoleküle des Monofilms bzw. der Membran mit freien im Solvents gelösten Lipidmolekülen. Durch den Einbau eines positiv geladenen Lipids bzw. Amphiphils in einen Monofilm wird die Anlagerung von Kationen oder anderen positiv geladenen Substanzen erschwert, d.h die Gleichgewichtslage zwischen gebundenem und ungebundenem Zustand zugunsten des Ungebundenen verschoben wird. Daraus kann gefolgert werden, daß sowohl die Einlagerung von PmB in einen Monofilm als auch die Anlagerung von Kationen mit steigendem Anteil einer positiv geladenen Substanz im Monofilm erschwert bzw. völlig unterbunden wird. Die starke Reduzierung der Penetration von PmB durch die Zugabe des positiv geladenen Stearylamins unterstrichen die Bedeutung der elektrostatischen Wechselwirkung für die Einlagerung in den Monofilm. Aus der Literatur ist bekannt, daß partiell acyliertes Polymyxin eine deutliche geringere antibiotische Aktivität zeigt [120] und daß man bei Bakterienstämmen, die eine deutlich reduzierte Polymyxinsensibilität aufweisen, eine markante Reduzierung der freien Ladungen findet. In diesen Fällen ist die Ladung der Phosphatgruppen durch Substitutionen verringert [115, 116].

Die Daten der Monofilmmuntersuchungen zeigen deutlich, daß das Eindringen einer Substanz in eine LPS-Membran ohne elektrostatische Wechselwirkungen nicht stattfindet. Um demnach eine Penetration in eine LPS-Membran zu erreichen, müssen weitere strukturelle Kriterien erfüllt sein. Den vorliegenden experimentellen Ergebnissen muß ein Molekül neben einer möglichst hohen positiven Ladung einen räumlich getrennten lipophilen Bereich aufweisen, d.h. es muß amphiphil sein. Im Falle des Polymyxins trägt das Ringsystem 3 der 5 positiven Ladungen, während die Seitenkette des Moleküls einen überwiegend lipophilen Charakter aufweist. PmBN hingegen hat keinen lipophilen Rest mehr, ist also ausschließlich hydrophil. Eine Wechselwirkung mit negativ geladenen Membranen ist möglich. Sie ist aber deutlich schwächer ausgeprägt als der Effekt, den nur PmB auf solche Membranen hat.

5.3 *Diskussion der kalorimetrischen Untersuchungsergebnisse*

Kalorimetrische Untersuchungsmethoden sind geeignet, physikalische Größen zu liefern und somit auch Hinweise auf Wechselwirkungen biologischer Systeme zu geben [69,70]. Moderne Geräte reagieren auf kleinste Wärmemengen und arbeiten mit Zellvolumina von 1-2 ml, so daß es nun auch möglich ist, biologische Fragestellungen zu untersuchen, die bisher aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Substanzmengen nicht untersucht werden konnten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden kalorimetrische Methoden eingesetzt, um neben den Ergebnissen der Monofilmmessungen weitere Daten über die Stöchiometrie der Wechselwirkung von Polymyxin mit ReLPS zu sammeln. Außerdem wurde die Frage untersucht, wie stark Polymyxin B in die Ordnung des Fettsäurebereiches und damit in den Phasenübergang der LPS Aggregate eingreift. Während bei Raumtemperatur ReLPS in der gel-Phase (L_{β}') vorliegt, findet man die aufgeschmolzene Phase (L_{α}) bei physiologischen Bedingungen. Diese Fragestellung kann durch Monofilmmessungen nicht quantitativ beantwortet werden, aber sie ist in Hinblick auf die Funktion der äußeren Membran gramnegativer Bakterien als Permeationsbarriere von großer Bedeutung.

Die in Tabelle 8 und Tabelle 9 zusammengefaßten Daten der DSC-Messungen liefern zunächst wichtige Aussagen über die Homogenität des verwendeten LPS Materials. Das kommerziell erhältliche ReLPS (*S. minnesota* R595) von **Sigma** besteht aus mindestens drei verschiedenen Komponenten, wie Abbildung 53 zu entnehmen ist.

Da die Zusammensetzung der Lipopolysaccharide von *Salmonella minnesota* deutlich größere Variationen, gerade auch im Substitutionsmuster des Fettsäurebereiches als *E. coli* zeigt [32, 49, 50], ist anzunehmen, daß es sich bei den drei zu separierenden Signalen in den DSC-Messungen um die penta-, hexa- und heptaacyl-Varianten des ReLPS von *Salmonella minnesota* handelt. Ein direkte Überprüfung dieser Annahme war nicht möglich, da die notwendigen Mengen der reinen Einzelkomponenten von *S. minnesota* ReLPS nicht erhältlich sind. Allerdings entspricht vom chemischen Aufbau das untersuchte Material von *E. coli* der Hauptkomponente von *S. minnesota* ReLPS, so daß ein Vergleich mit dieser Substanz möglich ist. Die Phasenumwandlungstemperatur und die ermittelte Enthalpie des Phasenübergangs von *S. minnesota* ReLPS stimmt sehr gut mit den Werten des *E. coli* Materials überein. In Tabelle 12 sind die einzelnen Daten einander gegenüber gestellt.

5.3 Diskussion der kalorimetrischen Untersuchungsergebnisse

Tabelle 12

Vergleich der DSC-Daten von *E.coli* ReLPS mit dem ersten Peak von *S. minnesota* ReLPS.

	<i>S. minnesota</i>	<i>E. coli</i>
T_m [°C]	24,0 ± 0,1	21,3 ± 0,1
ΔH_{cal} [kJmol ⁻¹]	23,36 ± 0,03	25,1 ± 0,4
<i>ph</i>	6,5	7,5

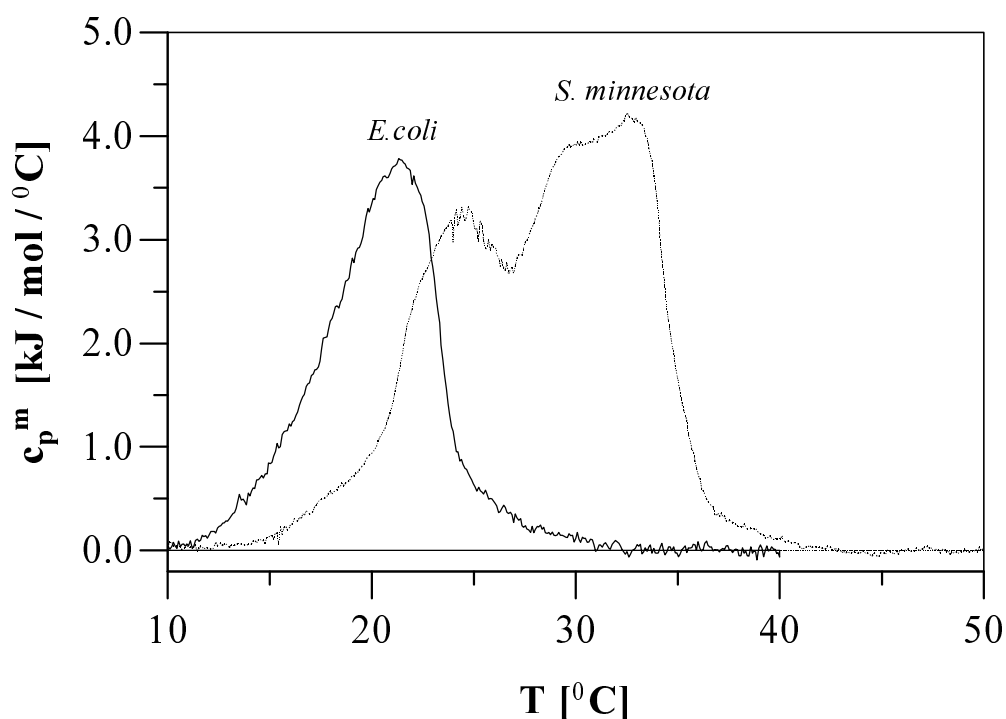


Abbildung 53 Vergleich der DSC-Kurven für ReLPS von *S. minnesota* und *E. coli*. Das hoch gereinigte Material von *E. coli* zeigt in der DSC-Messung einen einzigen Peak, während ReLPS von *Salmonella minnesota* ein aus mehreren Komponenten bestehendes Signal liefert.

Die Unterschiede der einzelnen Werte sind auf die unterschiedlichen Bedingungen zurückzuführen (s. 4.3.1.). Berücksichtigt man die Inhomogenität des *S. minnesota* Materials, stimmen die Daten für beide Substanzen gut überein. Anhand dieser Daten kann davon ausgegangen werden, dass es sich beim ersten Peak des *S. minnesota*-Materials um die hexaacetyl-Form handelt.

Kapitel 5 Diskussion

Die von Brandenburg et al. [46] publizierten DSC-Daten liegen für *S. minnesota* mit $\Delta H_{cal} = 29,0 \text{ kJmol}^{-1}$ deutlich unter dem in dieser Arbeit ermittelten Gesamtwert von $\Delta H_{cal} = \text{ca. } 50 \text{ kJmol}^{-1}$. Vergleicht man anstelle des Gesamtwertes der Phasenumwandlungsenthalpie nur den ersten Peak (s. Tabelle 8) mit den Ergebnissen von Brandenburg et al., dann stimmen die Werte gut überein. Der Unterschied ist im wesentlichen auf das verwendete Material zurückzuführen. Von Brandenburg et al. wurde sehr einheitliches ReLPS eingesetzt, das von H. Brade (Forschungsinstitut Borstel) isoliert und gereinigt wurde, während in dieser Untersuchung Material von *Sigma* eingesetzt worden ist. Weitere Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse sind wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Bedingungen (Ionengehalt, pH-Wert) und eine anderen Meßmethode zurückzuführen, da die Phasenumwandlungsenthalpie von Brandenburg et al. nicht direkt, sondern relativ in Bezug auf die Phasenumwandlungsenthalpie eines Phospholipides bestimmt worden ist. Die gemessenen Phasenumwandlungstemperaturen (T_m) unterscheiden sich nur unwesentlich.

Die von Fukuoka et al. publizierten Daten sind an LPS-Spezies durchgeführt worden, die einen wesentlich größeren Zuckeranteil enthalten (RaLPS von *E. coli* EH-100 und *Erwinia carotovota*) [121], so daß nur ein qualitativer Vergleich mit den vorliegenden Messungen ist. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Materialien und der jeweiligen Bedingungen stimmen die gemessenen Werte der Phasenübergangstemperatur und der Phasenumwandlungsenthalpie sehr gut mit diesen Daten überein. PmB führt auch bei diesem Material zu einer drastischen Verkleinerung der Phasenumwandlungsenthalpie.

Die von N. Qureshi zur Verfügung gestellte freie ReLPS-Säure von *E. coli* zeigt immer nur einen einzigen Peak in der DSC-Messung. Dieser Befund stimmt mit den in Kapitel 4.2. gezeigten Isothermen überein. Gleichzeitig unterstreicht es die Vermutung, daß das DSC-Signal der *Salmonella*-Messung sich aus einer Überlagerung mehrerer Komponenten ergibt. Während *Salmonella minnesota* ReLPS nur andeutungsweise einen Phasenübergang in den Isothermen der Monofilm-Messungen zeigt, ist der Phasenübergang von *E. coli* ReLPS sehr ausgeprägt. Demnach ist es schon anhand der Isothermen von Lipopolysacchariden möglich, konkrete Aussagen über die Einheitlichkeit des verwendeten Materials zu machen.

Durch die Zugabe von Polymyxin B wird die Phasenumwandlung von ReLPS stark beeinflusst. Schon kleine Mengen von PmB führen zu einer erheblich kleineren Phasenumwandlungsenthalpie. Bei Anwesenheit stöchiometrischer Mengen PmB

5.3 Diskussion der kalorimetrischen Untersuchungsergebnisse

(n [PmB] / n [ReLPS] \sim 0,7) ist eine Phasenumwandlung kaum noch festzustellen. Demnach wird der Phasenübergang von der L_{β}' - in die L_{α} -Phase durch den Einbau von PmB stark forciert, bzw. zu deutlich niedrigeren Temperaturen verschoben, so daß die Fettsäureketten des ReLPS bei Raumtemperatur nahezu vollständig aufgeschmolzen vorliegen. Diese Beeinflussung von Membranen durch PmB ist in ähnlicher Form für eine Vielzahl von negativ geladenen Phospholipidsystemen beschrieben worden [66, 67, 68, 107, 108, 122, 123]. Polymyxin führt auch bei diesen Systemen zu einer Reduktion des Ordnungsgrades, zu einer Verschiebung der Phasenübergangstemperatur und zu einer deutlichen Verminderung der Phasenübergangsenthalpie. Andere DSC-Untersuchungen zur Wechselwirkung von PmB mit LPS sind nur von Fukuoka et al. [121] publiziert worden, die ebenfalls eine erhebliche Abnahme der Phasenumwandlungsenthalpie von RaLPS festgestellt haben. Schröder et al. berichten, daß die Ionenleitfähigkeit von asymmetrischen Membranen (Blacklipid-Membranen vom Typ ReLPS / PL) ebenfalls durch die Zugabe von kleinen Mengen PmB erheblich gesteigert wird [122].

Die Ergebnisse der Titrationskalorimetrie (ITC) liefern Daten über die Stöchiometrie der Wechselwirkung und die Bindungsenthalpie zwischen Polymyxin B und ReLPS bei verschiedenen Temperaturen. Während die Stöchiometrie in fast allen Messungen unabhängig von den Bedingungen im Bereich von $n \approx 0,6$ und damit unterhalb des Wertes liegt, der in den Monofilmmessungen mit $n = 0,8$ ermittelt worden ist, unterscheiden sich die Werte für die Bindungsenthalpie erheblich. Während unterhalb der Phasenumwandlung immer *endotherme* Enthalpien gemessen werden, findet man für LPS oberhalb der Phasenumwandlung nur *exotherme* Enthalpiewerte. Simal et al. bestätigen diese Ergebnisse, allerdings wurden in der Arbeit alle Lipopolysaccharide unterhalb des Phasenübergangs titriert [124]. Da sowohl das ReLPS von *S. minnesota* als auch das *E. coli*-Material oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur eine exotherme Enthalpie aufweisen, kann davon ausgegangen werden, daß oberhalb der Phasenumwandlung der Bindungsprozeß exotherm abläuft. Weitere titrationskalorimetrische Daten für die Bindung von Polymyxin an negativ geladenen Lipiden liegen nicht vor, so daß die Ursache für den Vorzeichenwechsel nicht eindeutig geklärt werden kann. Eine wichtige Rolle beim Vorzeichenwechsel spielt die Phasenumwandlung von der geordneten L_{β}' -Phase in die aufgeschmolzene L_{α} -Phase, da für diesen Prozeß Energie erforderlich ist. Die aus den DSC-Messungen ermittelten Werte für die Phasenumwandlungs-

Kapitel 5 Diskussion

enthalpien für ReLPS von *S. minnesota* und *E. coli* (s. Tabelle 8 und Tabelle 9) unterscheiden sich um den Faktor zwei. Wahrscheinlich ist diese Diskrepanz der Meßwerte auf die unterschiedliche Zusammensetzung des LPS und die verschiedenen Ionen in der Lösung zurückzuführen. Allerdings erscheint es bedingt durch die aufwendige Extraktion des LPS und Isolation der einzelnen Komponenten fraglich, ob DSC- und ITC-Studien an chemisch einheitlichem LPS, das in definierter Salzform vorliegt, durchgeführt werden können, um zu klären, in welchem Maße andere Faktoren (Ionenstärke, Temperatur, Konzentration, pH-Wert) die Bindungsenthalpie beeinflussen.

Das Polymyxin B-Nonapeptid wurde nur in der ITC-Messung zu Vergleichszwecken hinzugezogen. Weitere Messungen waren, bedingt durch die geringen Materialmengen an PmBN bzw. ReLPS nicht möglich. Die Stöchiometrie der Wechselwirkung PmBN / ReLPS fällt ebenso wie die Bindungsenthalpie deutlich kleiner aus als die entsprechenden Werte der PmB / ReLPS-Messungen. Insofern zeigt PmBN auch in den kalorimetrischen Untersuchungen von der Tendenz her ein dem Polymyxin B sehr ähnliches Verhalten, allerdings immer in stark abgeschwächter Form d.h. mit deutlich kleineren Änderungen der Enthalpiewerte. Literaturdaten über kalorimetrische Messungen für dieses oder ein ähnliches Lipidsystem liegen nicht vor, allerdings hat C. Schultz mit FT-IR-Messungen gezeigt, daß PmBN bei Raumtemperatur einen fast ebenso starken Einfluß auf den Ordnungsgrad von ReLPS-Membranen hat wie Polymyxin B [125], der allerdings mit zunehmender Temperatur im Gegensatz zum Einfluß des PmB stark rückläufig ist. Oberhalb der Phasenumwandlung von Lipopolysacchariden wurde von Schultz nur noch eine geringe Beeinflussung des Ordnungsgrads der Lipide durch PmBN festgestellt.

Die Ergebnisse der DSC- und der ITC-Messungen können wie folgt zusammengefaßt werden:

- PmB beeinflusst schon bei kleinen Konzentrationen massiv die Enthalpie des Phasenübergangs von ReLPS.
- Bei stöchiometrischen PmB-Konzentrationen (0,6-0,7) ist nahezu keine Phasenübergangsenthalpie mehr festzustellen.
- Die Bindungsenthalpie von PmB an ReLPS ist unterhalb des Phasenübergangs immer endotherm, oberhalb des Phasenübergangs immer exotherm.

5.3 Diskussion der kalorimetrischen Untersuchungsergebnisse

- Die Stöchiometrie der Wechselwirkung zwischen PmB und ReLPS liegt in den kalorimetrischen Experimenten etwas niedriger als in den Monofilmentexperimenten.
- PmBN zeigt ein ähnliches Verhalten wie PmB, allerdings ist die Wechselwirkung deutlich schwächer ausgeprägt.

5.4 Beeinflussung von ReLPS-Aggregaten durch PmB

Die Beeinflussung des Aggregationsverhaltens von ReLPS durch Polymyxin B ist ein weiterer wesentlicher Aspekt der Wechselwirkung zwischen PmB und ReLPS Membranen. Die Messungen im Rahmen der dynamischen Lichtstreuung zeigen unterhalb und oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur von ReLPS nur geringe Unterschiede im Verlauf der Meßkurve (s. Abbildung 33). Die Zugabe von PmB führt zu einer Vergrößerung von ReLPS Vesikel bis auf das Dreizehnfache ihres ursprünglichen Durchmessers (100 nm \leftrightarrow ca. 1300 nm). Diese Beeinflussung der Vesikelgröße durch Polymyxin B ist deutlich stärker als die Veränderung der ReLPS-Monofilmfläche durch die Einlagerung vom PmB, die in etwa zu einer Verdoppelung der Filmfläche führt. Die elektronenmikroskopischen Bilder im Kapitel 4.5. liefern wichtige Anhaltspunkte für die Interpretation dieser Daten. In Abbildung 31 ist ein typisches Beispiel für die durch große Mengen (n [PmB] / n [ReLPS] \sim 1) an Polymyxin B hervorgerufene Veränderung von LPS-Aggregaten gezeigt. Die ansonsten bei der jeweiligen Temperatur einheitliche Form der Aggregate, unterhalb des Phasenübergangs in Form einer langgezogenen Bandstruktur und oberhalb des Phasenübergangs von gleichmäßig großen, runden Vesikeln, ist verschwunden. Den entscheidenden Unterschied stellt aber nicht die Veränderung der Gestalt dieser Aggregate dar, sondern vielmehr die Ausbildung von multilamellaren Schichtsystemen anstelle der vorher zu beobachtenden ausschließlich unilamellaren Schichten. Dies läßt sich wie folgt interpretieren. Da sich die einzelnen Aggregate durch den Einbau von PmB und die damit verbundene Neutralisation der Oberflächenladung nicht mehr abstoßen, kommt es vermehrt zu Fusionsprozessen, so daß deutlich größere Aggregate gebildet werden, die sich dann in der dynamischen Lichtstreuung durch einen erheblich größeren Gyrationradius auszeichnen. In den Monofilmentexperimenten ist eine solche Veränderung durch den Versuchsaufbau ausgeschlossen. Durch die Einlagerung von PmB kann nur die Fläche des Monofilms verändert werden.

Kapitel 5 Diskussion

Ein prinzipiell ähnliches Phänomen wird beobachtet, wenn man Bakterien-Kulturen kurzzeitig mit Polymyxin B behandelt. Man erkennt auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen Ausstülpungen der äußeren Membran der Bakterien, sogenannte Blebs [17, 18, 125]. Diese Oberflächenvergrößerung bei lebenden Bakterien steht in voller Übereinstimmung sowohl mit den Ergebnissen der dynamischen Lichtstreuung als auch mit den Resultaten der Monofilmsuntersuchungen.

Die Schutzfunktion der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien beruht im wesentlichen auf der Funktion als Permeationsbarriere für lipophile Substanzen. Durch die sehr kompakte Packung des Fettsäurebereiches und die hohe Oberflächenladung der Membran, die sich in Abbildung 31 als deutliche Abstoßung der einzelnen Vesikel manifestiert, wird das Eindringen von unerwünschten lipophilen Molekülen sehr effizient unterbunden. Der Einbau von Polymyxin führt zu massiven morphologischen Veränderungen in der Membran und zu einer drastischen Reduzierung des Oberflächenpotentials, so daß die Funktion als Permeationsbarriere nahezu vollständig außer Kraft gesetzt wird. Die in Abbildung 33 gezeigten morphologischen Veränderungen der ReLPS Aggregate und das Auftreten von multilamellaren Schichten belegen die massive Beeinflussung, die von Polymyxin B hervorgerufen wird.

5.5 Diskussion der MD-Simulationen

Das Ziel der MD-Simulationen von ReLPS-Monoschichten bestand in erster Linie darin, zu überprüfen, ob eine Molekül-Dynamik Simulation von diesen sehr komplex aufgebauten Lipiden überhaupt zu auswertbaren Ergebnissen führt. Da jede Simulationsrechnung sehr viel Rechenzeit und Computerressourcen benötigt und nur eine sehr begrenzte Zeitspanne von 100 ps simuliert werden konnte, ist diese Fragestellung nicht trivial. Aufbauend auf den Ergebnissen für reine ReLPS-Monoschichten wurde ein Mischsystem aus ReLPS und PmB im Hinblick auf die Fragestellung untersucht, welche strukturellen Veränderungen in LPS-Membranen durch den Einbau von PmB hervorgerufen werden.

Die theoretischen Rechnungen dieser Arbeit an verschiedenen ReLPS-Monoschichtsystemen sind die ersten MD-Simulationen, die an solchen Lipidsystemen durchgeführt worden sind. Die einzigen in direktem Kontext zu den Ergebnissen dieser Arbeit stehenden Untersuchungen stammen von S. Obst und analysieren die konformationellen Veränderungen eines monomeren ReLPS Moleküls in einer Wasserbox [23] sowie die Epitopexponierung verschiedener ReLPS-Monoschichten [25].

5.5 Diskussion der MD-Simulationen

Ein Vergleich mit den zum Teil sehr komplexen Lipidsimulationen, die in der Literatur veröffentlicht sind [77, 78, 79], ist nur bedingt möglich, da die chemische Struktur der Phospholipide wesentlich einfacher als die der Lipopolysaccharide ist. Während an den Lipidanker der Lipopolysaccharide das Lipid A mit bis zu 7 Fettsäureketten, kovalent geknüpft ist, sind es bei Phospholipiden in der Regel nur zwei an Glycerin gebundene Fettsäuren, die geringeren sterischen Zwängen ausgesetzt sind als die Fettsäureketten der Lipopolysaccharide. Ebenso ist der Aufbau der Kopfgruppe von Lipopolysacchariden erheblich komplizierter als es bei Phospholipiden der Fall ist.

Aufgrund der großen strukturellen Unterschiede zwischen den Phospholipiden und den Lipopolysacchariden wird in der folgenden Diskussion nur bedingt ein direkter Vergleich mit Phospholipidsimulationen gezogen. Statt dessen werden primär Vergleiche mit den vorliegenden experimentellen Daten für die Beurteilung der Ergebnisse der MD-Simulationen herangezogen.

5.5.1 Reine ReLPS Monoschichten

Die in Kapitel 4.3.2. und 4.3.3. präsentierten Ergebnisse der Simulationsrechnungen zeigen eine deutliche Trennung der untersuchten Packungen in zwei Gruppen. Die drei Packungen **I**, **II** und **III** behalten über den gesamten Simulationszeitraum eine Anordnung bei, die einer geschlossenen Monoschicht entspricht. Die Packung **IV** ist einem Übergangszustand zuzuordnen, während keine der folgenden stark aufgeweiteten Packungen (**V-VI**) eine gleichmäßige Verteilung der Moleküle beibehält, die für eine geschlossene Membranoberfläche notwendig ist.

In Abbildung 36 und Abbildung 37 ist zu erkennen, daß bei stark aufgeweiteten Packungen die ursprünglich gleichmäßige Anordnung der Moleküle in der Membranebene zugunsten der Ausbildung eines isolierten Molekülclusters aufgegeben wird. Außerdem zeigt Abbildung 37, daß die äquidistante Anordnung der Moleküle nahezu völlig verloren geht. Diese Veränderung des Packungsmusters erfolgt schon vor der eigentlichen Simulation in der Aufheiz- bzw. Äquilibrierungsphase und ist, wie in Abbildung 35 am Beispiel der Packung **V** gezeigt, nach 20 ps vollständig abgeschlossen.

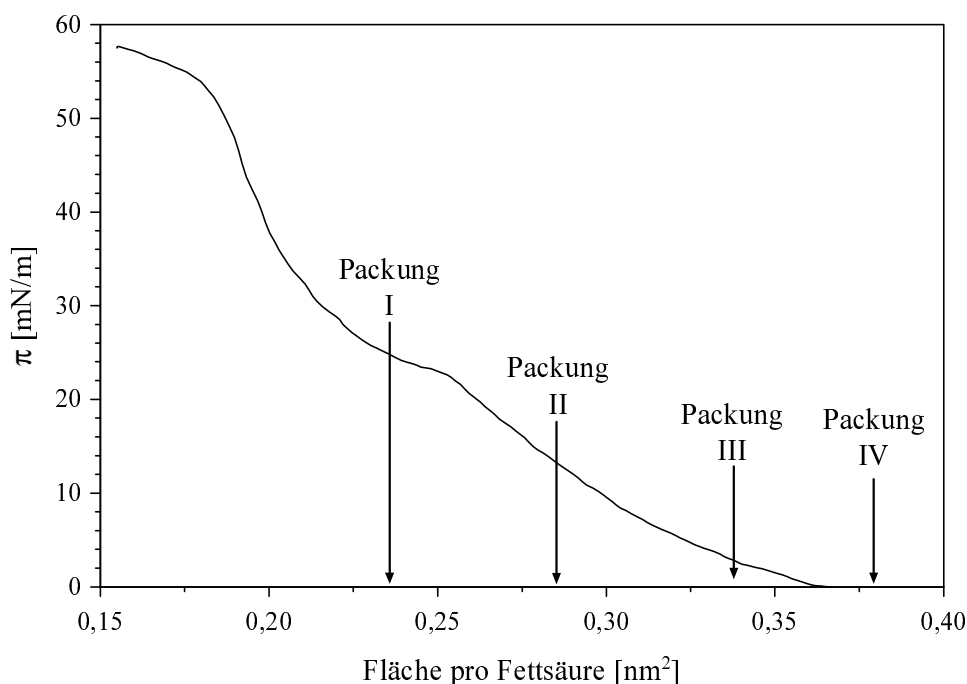


Abbildung 54 Vergleich der unterschiedlichen Flächenbelegungen der untersuchten Packungen mit einer Isothermen von *E. coli* (s. 4.2.2.). Es ist gut zu erkennen, daß nahezu alle Phasenbereiche des Monofilms in der Simulation erfaßt worden sind.

Als Vergleich für die sehr hohe Geschwindigkeit dieser Umwandlung der Molekülanordnung kann die Zeit bis zum Beginn der Zersetzung einer dichtgepackten Lipid A-Monoschicht (hepta-acyl von *S. minnesota*) herangezogen werden. Bei Voruntersuchungen zeigte eine solche Packung unter – bis auf die Temperatur - gleichen Simulationsbedingungen bei 600 K erst nach 42 ps erste Anzeichen der Zersetzung und war erst nach 67 ps völlig aufgelöst.

Einen Ansatz für eine Erklärung liefert die Abbildung 54. Bei den Packungen **I**, **II** und **III**, das heißt, den Packungen, die sich nicht im gas-analogen Zustand befinden, bleiben die Molekülanordnungen erhalten und während des gesamten Simulationszeitraum stabil. Die weniger dicht gepackten Systeme zeigen eine Aggregation der einzelnen Moleküle unter Auflösung der Membran. Die Packung **IV** zeigt erste Tendenzen, aus der Startpackung einen Molekülclusters auszubilden, allerdings bleiben die einzelnen Moleküle in etwa an ihrer Position, während sich in den beiden Packungen **V** und **VI** die ursprüngliche Anordnung sehr schnell auflöst. Für dieses Verhalten der Moleküle sind zwei Aspekte von besonderer Bedeutung. Einerseits sind jeweils sechs Fettsäureketten kovalent an das Lipid A gebunden. Vergrößert man die durchschnittliche Fläche pro Fettsäure in einer Modellmembran, dann

5.5 Diskussion der MD-Simulationen

wächst der Abstand zwischen zwei LPS-Molekülen wesentlich schneller als bei Phospholipiden, die nur zwei Fettsäureketten gebunden haben. Da der Abstand der kovalent an den Grundkörper der Lipide gebundenen Fettsäureketten nicht verändert werden kann, wird eine Aufweitung der Packung immer nur durch Vergrößerung des Abstands zwischen den einzelnen Molekülen erreicht. Durch die Anknüpfung der Fettsäuren an das Lipid A kommt es zu einer sehr kompakten Anordnung der sechs Fettsäureketten eines einzelnen LPS-Moleküls [21], so daß der Abstand zwischen zwei LPS-Molekülen verglichen mit dem Abstand einfacher Phospholipide bei der selber Flächenbelegung pro Molekül größer ist. Bei MD-Simulationen von monomerem ReLPS im Vakuum [126], aber auch unter Einbeziehung von Wasser, wird diese kompakte Anordnung der Fettsäureketten, die auch als Mikrodomäne bezeichnet wird [125], nicht aufgegeben [23]. Die LPS-Moleküle können den Raum im hydrophoben Bereich nur durch einen veränderten Tiltwinkel ausfüllen.

Die Simulationsbedingungen spielen ebenfalls eine wichtige Rolle. Da Moleküle bei Simulationen im Vakuum die Moleküloberfläche minimieren, kommt es somit bei sehr großen Abständen zwischen einzelnen Molekülen immer zu Zusammenlagerungen der einzelnen Moleküle. Dieser Effekt wird nur bei großen Abständen zwischen den Molekülen beobachtet, wie es bei Packung **V** und **VI** der Fall ist.

Die Simulationsrechnungen an kleinen ReLPS-Monoschichten bei unterschiedlichen Flächenbelegungen haben gezeigt, daß die MD-Simulationen von dichtgepackten Lipidpackungen stabile Systeme liefern und somit sehr gut geeignet sind, verschiedene Packungsvarianten eines Lipides in Hinblick auf ihre Stabilität zu überprüfen. Bei einer Aufweitung der Lipidpackung kommt es allerdings bei Flächenbelegungen, die in Monofilmmessungen der Gas-analogen Phase entsprechen, zu artifiziellen Ergebnissen.

5.5.2 Einfluß von Wasser auf die Simulation von ReLPS-Monoschichten

Die Einbeziehung von Wassermolekülen zeigte nahezu keinen Einfluß auf die Ergebnisse der Packungssimulationen. Unter ansonsten identischen Simulationsbedingungen nimmt in Anwesenheit von Wasser lediglich die Beweglichkeit im Zuckergerüst (s. Abbildung 38) und auch im Fettsäurebereich der Packung (s. Abbildung 39) deutlich ab. Während im Vergleich zur Simulation im Vakuum die Dämpfung der Bewegungen derjenigen Atome, die direkten Kontakt zur Solvens haben, offensichtlich ist, besteht ebenfalls ein indirekter Zu-

Kapitel 5 Diskussion

sammenhang zwischen der Präsenz des Solvens und der reduzierten Beweglichkeit der Fettsäureketten. Durch die Gegenwart der Kationen aber auch durch die Wassermoleküle, kommt es zu einem Verklammern benachbarter ReLPS-Moleküle. Diese Versteifung der Molekülanordnung ist in den Monofilmeexperimenten ebenfalls beobachtet worden. Die Anordnung der Phosphatgruppen in einer ReLPS-Packung ermöglicht es, zweiwertige Kationen, gleichzeitig an Phosphatgruppen zweier benachbarter Moleküle zu binden [95], was zu einer stark eingeschränkten Beweglichkeit der Phosphatgruppen und damit des ganzen Zuckergerüsts führt, wie von Obst in Simulationsrechnungen gezeigt worden ist [25]. Durch die geringe Beweglichkeit des Zuckergerüsts werden wiederum Veränderungen im Fettsäurebereich erschwert, da die Ketten direkt an das Zuckergerüst gebunden sind und damit auf eine gewisse Beweglichkeit des Zuckergerüsts angewiesen sind, um eigene Bewegungen auszuführen. Somit führt eine Versteifung des Zuckergerüsts automatisch auch zu einer geringeren Beweglichkeit der Fettsäureketten, wie sie in Abbildung 39 gezeigt ist. In MD-Simulationen von monomerem ReLPS in Wasser wurde in Gegenwart von zweiwertigen Kationen ebenfalls eine reduzierte Beweglichkeit der Fettsäureketten festgestellt, die durch intramolekulare Salzbrücke zwischen der Carboxylatgruppe eines KDO-Zuckers, dem zweiwertigen Kation und der benachbarten Phosphatgruppe bewirkt wird [23]. Ein sehr hoher Ordnungsgrad des Fettsäurebereichs wurde von Labischinski et al. anhand von Röntgenmessungen postuliert [131]. Schulz hat in FT-IR-Untersuchungen für den Fettsäurebereich einen deutlich höheren Ordnungsgrad festgestellt, als für DMPC [125]. Diese experimentellen Ergebnisse stimmen sehr gut mit den MD-Simulationen von LPS-Aggregaten in Vakuum und den Simulationen in der Gegenwart von Wasser überein.

Da im direkten Vergleich der Simulation einer ReLPS-Monoschicht im Vakuum mit einer identischen Monoschicht unter Einbeziehung von Wasser lediglich sehr kleine Unterschiede in der Beweglichkeit von einzelnen Atomen bzw. des Ordnungsgrades im Fettsäurebereich festgestellt worden sind, wurden alle weiteren Simulationsrechnungen im Vakuum ausgeführt.

Aufgrund der größeren Beweglichkeit im Vakuum sind Modifikationen in der Molekülanordnung durch instabile Systeme oder aber ganz allgemein Systemveränderungen, bei Vakuum-Simulationen in wesentlich kleineren Simulationszeiträumen zu erwarten. Gleichzeitig ist der Bedarf an Rechenzeit und Computerressourcen um fast 50% kleiner als bei vergleichbaren Systemen, in denen Wasser mit in die Simulation einbezogen wird.

5.5 Diskussion der MD-Simulationen

Der gewählte Ansatz für den Aufbau von ReLPS-Monoschichten und deren MD-Simulation liefert ein Modellsystem, das in sehr guter Übereinstimmung mit den vorliegenden experimentellen Daten steht. Die Ergebnisse der Simulationen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Dichtgepackte ReLPS-Aggregate sind im Verlauf einer MD-Simulation über 100 ps völlig stabil.
- Die Beweglichkeit aller Atome nimmt durch die Einbeziehung von Solvensmolekülen ab.
- Die Unterschiede zwischen Simulationen im Vakuum und von hydratisierten Systemen sind im Fettsäurebereich sehr gering.
- Es besteht eine gute Übereinstimmung der Simulationsergebnisse mit experimentellen Daten (Ordnungsgrad, Einfluß von Kationen).

5.5.3 Einfluß von Polymyxin B auf ReLPS-Aggregate

Nachdem gezeigt werden konnte, daß MD-Simulationsrechnungen an ReLPS-Membranen möglich sind, war die Beeinflussung von ReLPS-Monoschichten durch den Einbau von Polymyxin B der zentrale Punkt der theoretischen Untersuchungen. Aufbauend auf den Ergebnissen an reinen ReLPS-Systemen wurde untersucht, welche Veränderungen im Modellsystem durch den Einbau von PmB in eine ReLPS-Monoschicht hervorgerufen werden. Da die Einbeziehung von Wassermolekülen in eine Simulation lediglich die Beweglichkeit der Atome reduziert, aber keinen Einfluß auf die Packung der Moleküle zeigt, wurde diese Simulationen ebenfalls im Vakuum bei einer Temperatur von 350 K durchgeführt.

In Abbildung 40 ist der Aufbau der beiden simulierten Systeme, das eine 2 PmB- und 14 ReLPS Moleküle und das zweite 16 ReLPS-Molekülen enthaltend, gut zu erkennen. Letzteres System diene als Referenz in der Auswertung. Jede Packung besteht aus 4 x 4 Einheiten, so daß die vier Moleküle im Zentrum keinerlei Kontakt zum Rand haben. Somit sind Randeffekte weiter verringert. Die molare Polymyxin B-Konzentration ergibt sich zu $1/8 = 12,5\%$. Im Gegensatz zu den Experimenten in denen molare Verhältnisse von bis zu $\text{PmB} / \text{ReLPS} = 1:1$ untersucht worden sind, wurde hier bewußt ein kleinerer PmB-Anteil gewählt, um mögliche Veränderungen des Systems durch den Einbau von PmB klein zu halten und somit einen Vergleich mit dem reinen Ensemble einfach zu gestalten.

Kapitel 5 Diskussion

Während der gesamten Simulationsdauer von 150 ps (Aufheiz-, Äquilibration- und Produktionsphase), zeigten beide Systeme keine Veränderung in der Anordnung der einzelnen Moleküle. Anhand der Beweglichkeit der Fettsäureketten durch den Vergleich des Ordnungsparameters S_{CD} wurde überprüft, ob sich alle Einzelmoleküle beider Packungen völlig unabhängig voneinander bewegen. In Abbildung 42 ist anhand des Verlaufes des Ordnungsparameters eine der sechs Fettsäureketten des ReLPS exemplarisch gezeigt, daß zwar an vier benachbarten Molekülen in einigen Fällen ein ähnlicher Verlauf des Ordnungsparameters, aber keine völlige Übereinstimmung gefunden wird. Derselbe Befund ergibt sich, wenn der Ordnungsgrad aller sechs Fettsäureketten eines Moleküls gemittelt wird und diese mittleren Ordnungsparameter der einzelnen ReLPS-Moleküle miteinander verglichen werden, wie es beispielsweise in Abbildung 43 gezeigt ist. Dieses Verhalten wird sowohl für das reine ReLPS-Monoschicht-, als auch für das ReLPS / PmB-Mischsystem beobachtet. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde so eine Beeinflussung der Simulationsergebnisse durch gekoppelte Bewegungen ausgeschlossen.

Die Auswirkungen des Einbaus von PmB in eine ReLPS-Monoschicht sind in Abbildung 45 und in Abbildung 47 zusammengefaßt. Die Dicke der Monoschicht wird durch den Einbau von PmB im Verlauf der MD-Simulation deutlich reduziert. Bezogen auf eine Doppelschicht nimmt die Schichtdicke um $\sim 0,4$ nm ab. In den Röntgenmessungen wurde bei einer vergleichbaren PmB-Konzentration (Probe III) ein Doppelschichtabstand von 5,34 nm ermittelt. Dies entspricht ebenfalls einer Abnahme des Doppelschichtabstands um 0,4 nm bezogen auf eine reine ReLPS-Probe (Probe I). Somit besteht eine sehr gute Übereinstimmung zwischen dem experimentellen Ergebnis und der Simulation.

In Kapitel 5.1.2. wurde diskutiert, daß PmB im Kopfgruppenbereich der Monoschicht nahezu genau soviel Platz wie ReLPS benötigt, obwohl es nur eine Fettsäurekette trägt, während sechs Fettsäuren kovalent an ReLPS gebunden sind. In Abbildung 49 ist in der Aufsicht auf die Packung keine Lücke in der Membranoberfläche zu erkennen. Der Fettsäurebereich des Mischsystems zeigt ebenfalls keine Lücken in der Packung. Demnach wird im Verlauf der MD-Simulation, die durch den Einbau des PmB zunächst entstandene Lücke im Fettsäurebereich durch Fettsäureketten benachbarter ReLPS Moleküle wieder aufgefüllt. Die dazu notwendigen Konformationsänderungen der Fettsäureketten führt zu einem reduzierten Ordnungsgrad im gesamten Bereich der Fettsäuren, wie es in Abbildung 47

5.5 Diskussion der MD-Simulationen

gezeigt ist. Auch die in den Röntgenmessungen der Mischsysteme gefundene Abnahme des Doppelschichtabstands, ist in derselben Größenordnung in der MD-Simulation zu beobachten und ist auf das Aufschmelzen der Fettsäureketten zurückzuführen.

In Abbildung 47 erkennt man deutlich, daß durch den Einbau von Polymyxin B im gesamten Fettsäurebereich der Ordnungsgrad reduziert wird. Eine ähnliche Beeinflussung des Fettsäurebereichs durch PmB wurde auch bei FT-IR-Untersuchungen von LPS / PmB-Mischsystemen festgestellt [125]. Gleichzeitig entspricht die Abnahme der Ordnung im Fettsäurebereich auch den Ergebnissen der DSC-Messungen. Dort wurde festgestellt, daß durch die Zugabe von PmB die Enthalpie für den Übergang von der geordneten L_{β}' - in die aufgeschmolzene L_{α} -Phase von ReLPS deutlich reduziert wird.

Nachdem sich in der Aufheiz- und der Äquilibrierungsphase der Simulation beide PmB-Moleküle von der vorgegebenen Startposition tiefer in die Monoschicht hineinbewegt haben, ändert sich die Lage der beiden Polymyxinmoleküle in der Monoschicht während der weiteren Simulation nur wenig (s. Abbildung 44). Hervorzuheben ist, daß es keinerlei Anzeichen dafür gab, daß die Polymyxinmoleküle während der Simulation aus der Membran herausgedrückt werden, oder durch die Membran hindurch diffundieren.

Insgesamt ist eine sehr gute Übereinstimmung der Simulationsergebnisse mit den experimentellen Daten festzustellen. Die Entscheidung, auf die explizite Berücksichtigung von Wassermolekülen in der Simulation zu verzichten, hat sich bewährt. Die Systemeigenschaften wurden dadurch nicht beeinflusst. Lediglich die Geschwindigkeit von Atombewegungen und damit verbunden von Veränderungen der Moleküle bzw. der Molekülanordnung ist höher, als es im Falle der Einbeziehung von Wassermolekülen in die Simulation der Fall gewesen wäre

Der Verzicht, Wassermoleküle in die Simulation mit einzubeziehen, wodurch der Rechenzeitbedarf für beide Systeme auf ein akzeptables Maß gesenkt werden konnte, hat offensichtlich keinerlei negative Einflüsse auf die Eigenschaften der verschiedenen Packungen. Vielmehr konnte im vorherigen Abschnitt gezeigt werden, daß durch die Einbeziehung von Wasser und Kationen ein ReLPS-Monofilm zusätzlich stabilisiert wird, d.h. Veränderungen des Systems verlangsamt werden. Somit hat sich die Simulation von ReLPS-Packungen im Vakuum in Hinblick auf die Fragestellung dieser Arbeit hervorragend bewährt.

5.6 Wechselwirkungsmodell zur Interaktion von Polymyxin B mit Lipopolysacchariden

In den vorherigen Kapiteln sind eine Reihe von experimentellen Daten und theoretischen Modellen zur Wechselwirkung von Polymyxin B mit ReLPS-Membranen diskutiert worden, die zum Teil sehr unterschiedliche Aspekte dieser Fragestellung analysieren. Faßt man die einzelnen Ergebnisse zusammen, dann zeigt sich, daß PmB weniger ein einzelnes ReLPS-Molekül in seinen physikochemischen Eigenschaften verändert, sondern vielmehr die Eigenschaften der aus ReLPS-Molekülen - oder auch von anderen Lipiden - gebildeten Aggregate moduliert. Die Beeinflussung von ReLPS-Aggregaten durch Polymyxin läßt sich wie folgt zusammenfassen:

- Keine Ausbildung von separaten Mischphasen, d.h. PmB ist vollständig mischbar mit ReLPS-Monofilmen (s. 4.1. und 4.2.)
- Erhebliche Flächenvergrößerung von Monofilmen und Vesikeln (s. 4.2., 4.5., 4.6.)
- Reduzierung des Ordnungsgrads des Fettsäurebereichs von LPS-Aggregaten (s. 4.2., 4.4., 4.5.)
- Reduzierung bzw. Kompensation der Oberflächenladung von LPS-Membranen (s. 4.5.)

Alle Ergebnisse lassen sich ohne Widersprüche durch das in Kapitel 5.1. vorgestellte Modell der vollständigen Integration von PmB in die Membran erklären, das in Abbildung 55 schematisch skizziert ist. Aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen lagert sich das positiv geladene Polymyxin B an negativ geladene Membranen an. Im nächsten Schritt werden die Lipidmoleküle der Membran auseinandergedrückt, so daß das PmB-Molekül vollständig in die Membran integriert wird. Da das PmB-Molekül ein im Verhältnis zur Fettsäurekette großes hydrophiles Ringsystem aufweist, also entsprechend Abbildung 5 einen Formfaktor von $S \ll 1$ hat, wird die Anordnung der Lipidmoleküle in der Membran, die einen Formfaktor von $S \sim 1$ haben, gestört.

5.6 Wechselwirkungsmodell zur Interaktion von Polymyxin B mit Lipopolysacchariden

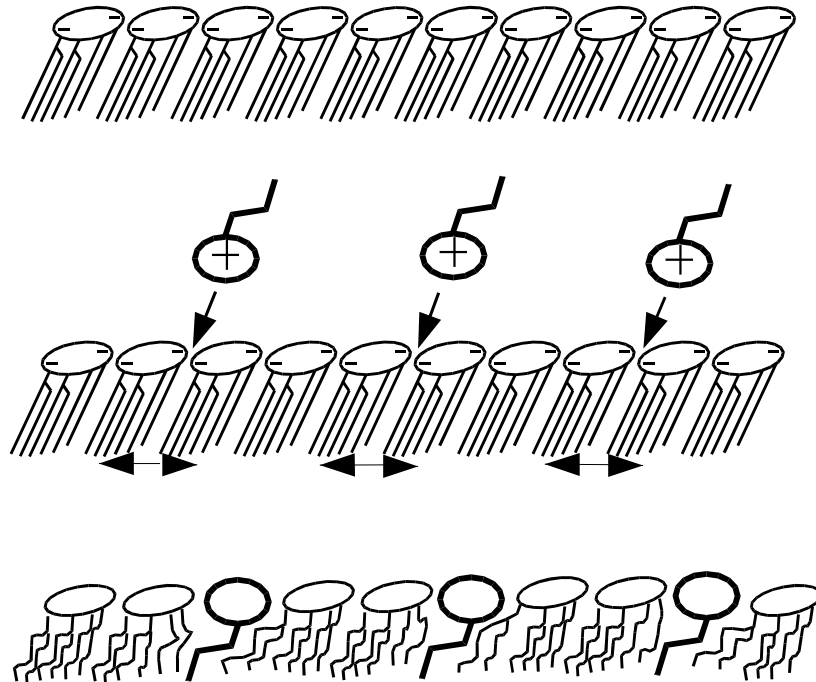


Abbildung 55 Wechselwirkungsmodell zur Einlagerung von Polymyxin in LPS-Membranen. Das positiv geladene Polymyxin B lagert sich aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen an die negative Membranoberfläche an. Anschließend wird das komplette Molekül vollständig in die Membran integriert. Da PmB lediglich eine Fettsäure hat aber das Ringsystem fast denselben Flächenbedarf wie ein ReLPS-Molekül, kommt es zu einem Aufschmelzen der Fettsäureketten, die sich auch in einer Abnahme der Lipidschichtdicke äußert.

Um den Platz, der im Fettsäurebereich durch den Einbau von PmB nicht belegt worden ist auszufüllen, kommt es zum Aufschmelzen von benachbarten Fettsäureketten der Lipidmoleküle, um diesen Hohlraum zu schließen. Demnach wird durch den Einbau von Polymyxin B eine Änderung des Phasenzustandes und damit des Formfaktors (von $S \sim 1$ auf $S > 1$) der benachbarten Lipidmoleküle erzwungen.

Somit kann die röntgenographisch beobachtete Reduzierung der Schichtdicke auf die molekulare Struktur des Polymyxins zurückgeführt werden. Beim Einbau in eine Membran belegt ein einzelnes PmB-Molekül eine mittlere Fläche von $A_0(\text{PmB}) = 1,165 \pm 0,05 \text{ nm}^2$, während ein ReLPS je nach Herkunft eine Flächenbelegung von $A_0(\text{ReLPS}) = 1,45$ für *E. coli* bis zu $A_0(\text{ReLPS}) = 1,59 \pm 0,09 \text{ nm}^2$ für *S. minnesota* aufweist. Im Gegensatz zum ReLPS, das

Kapitel 5 Diskussion

6 bis 7 Fettsäureketten aufweist [49, 50], hat PmB lediglich eine einzelne Fettsäure. Demnach belegt PmB in einer Membran ungefähr 2/3 der Fläche eines ReLPS Moleküls im Kopfgruppenbereich, im Fettsäureteil aber weniger als 1/6. Während man für ReLPS aufgrund der Meßergebnisse und theoretischer Überlegungen einen Formfaktor von $S = 1$ für das Verhältnis zwischen lipophiler- und hydrophiler Querschnittsfläche unter den gegebenen Bedingungen zugrunde legen kann [21, 22, 23, 25, 95, 104], ist für Polymyxin B von einem Formfaktor von $S \ll 1$ auszugehen. Anhand dieser Daten kann die zu erwartende Schichtdicke von Mischsystemen näherungsweise berechnet werden. Bezeichnet man die Schichtdicke einer einzelnen Schicht mit D , dann gilt

$$D = V / A \quad \text{[I]}$$

wobei V für das Volumen und A für die Fläche eines Moleküls stehen. Für eine reine ReLPS Lamelle ergibt sich daraus für die Schichtdicke einer Doppelschicht:

$$D = 2 * (V_{ReLPS} / A_{ReLPS}) \quad \text{[II]}$$

da eine Lamelle aus 2 Molekülen (kleinste Zelle) aufgebaut ist. Für die Schichtdicke eines Mischsystems aus ReLPS und PmB kann diese Formel wie folgt erweitert werden

$$D(n) = 2 * \left[(1 - n) * \left(\frac{V_{ReLPS}}{A_{ReLPS}} \right) + n * \left(\frac{V_{PmB}}{A_{PmB}} \right) \right] \quad \text{[III]}$$

wobei n den durchschnittlichen Anteil an PmB Molekülen ausdrückt (bzw. Molfraktion). Die Fläche eines Moleküls kann entweder durch Monofilmsuntersuchungen ermittelt (s. 4.2.) oder aber aus Molekülmodellen abgeleitet werden. In erster Näherung kann davon ausgehen, daß die Flächenbelegung der Lipide sowohl im hoch komprimierten Monofilm als auch in ange-trockneten multilamellaren Schichtsystemen ähnlich ist. Legt man die experimentellen Ergebnisse der Monofilmsuntersuchungen zugrunde und verwendet den aus den Röntgenmessungen ermittelten Doppelschichtabstand für reines ReLPS von $d = 5,74 \pm 0,01$ nm, so ergeben sich die folgenden Volumina:

5.6 Wechselwirkungsmodell zur Interaktion von Polymyxin B mit Lipopolysacchariden

$$\begin{aligned} V_{ReLPS}(S. \text{minnesota}) &= 5,74 \text{ nm} * 1,59 \text{ nm}^2 / 2 = 4,563 \text{ nm}^3 \\ V_{ReLPS}(E. \text{coli}) &= 5,74 \text{ nm} * 1,45 \text{ nm}^2 / 2 = 4,162 \text{ nm}^3 \end{aligned}$$

Die so errechneten Volumina setzen sich additiv aus mehreren Partialvolumina zusammen. Neben dem Volumen des LPS Moleküls sind auch die Volumina von gebundenen Wassermolekülen und Kationen in diesem Wert enthalten. Anhand eines energetisch günstigen Konformationsmodells von ReLPS von *E. coli* [21, 104] errechnet sich das Volumen eines LPS-Moleküls unter Verwendung des Programmpakets *MEMBRANE* zu $V_{ReLPS}^M(E. \text{coli}) = 3,1138 \text{ nm}^3$ [127]. Mit diesem Wert kann das Volumen für das gebundene Wasser und die Kationen überschlägig ermittelt werden.

$$V_{Wasser\&Kation} = V_{ReLPS}(E. \text{coli}) - V_{ReLPS}^M(E. \text{coli}) = 1,048 \text{ nm}^3$$

Für Polymyxin B kann das Volumen nur von Molekülmodellen ausgehend berechnet werden, da multilamellare Schichtsysteme aus reinem PmB weder durch das *Langmuir Blodgett*-Verfahren, noch durch Antrocknen wäßriger Lösungen zugänglich sind. Ausgehend von einem Molekülmodell für PmB [24] ergibt sich ein Molekülvolumen von $V_{PmB}^M = 1,720 \text{ nm}^3$. Zusammen mit dem Wert für die Flächenbelegung von PmB, der in den Monofilmenexperimenten ermittelt worden ist, ergibt sich durch Einsetzen in Formel **III** dann

$$D(n) = 2 * \left[(1 - n) * \left(\frac{4,563 \text{ nm}^3}{1,59 \text{ nm}^2} \right) + n * \left(\frac{1,72 \text{ nm}^3}{1,165 \text{ nm}^2} \right) \right] \quad \text{[IV]}$$

In Abbildung 56 ist der Funktionsverlauf von Formel **IV** zusammen mit den Ergebnissen der Röntgenmessungen aufgetragen. Die gute Übereinstimmung des Funktionsverlaufes dieses simplen Modellansatzes mit den gemessenen Doppelschichtabständen und die Abwesenheit von Reflexen einer zweiten lamellaren Periodizität oder auch einer anderen Struktur, unterstützen die These, daß Polymyxin B vollständig in die Membranen integriert wird. Das von Hartmann und Galla für Phospholipide entwickelte Modell [66, 67, 105], in dem lediglich die Fettsäure des PmB in die Membran eindringt, während der zyklische Teil als flache Scheibe auf der Membran aufliegt, konnte weder mit Monofilmenuntersuchungen [68], noch mit Röntgenmessungen in Übereinstimmung gebracht werden [107, 108, 109]. Vielmehr lassen sich

alle Ergebnisse dieser Arbeit mit dem oben vorgestellten Modell, d.h. dem vollständigen Einbau des Polymyxins in die Membran, völlig zwanglos erklären.

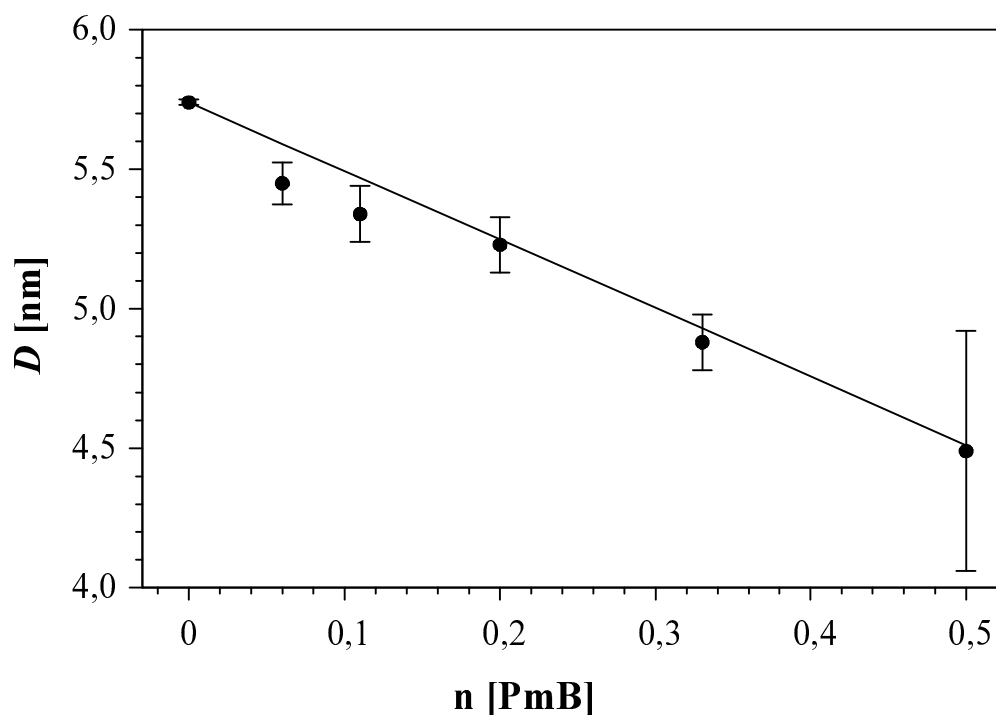


Abbildung 56 Änderung des Doppelschichtabstandes in Abhängigkeit vom Polymyxin B-Anteil. Die durchgezogene Linie wurde aus der Funktion **IV** berechnet. Die Meßpunkte stammen aus den Röntgenbeugungsexperimenten an ReLPS / PmB-Mischsystemen.

In Abbildung 57 ist für ein Multischichtsystem einer angetrockneten LPS-Probe, wie sie für die Röntgenexperimente hergestellt worden ist, das Aufschmelzen des Fettsäurebereichs durch den Einbau von PmB schematisch dargestellt. Im direkten Vergleich zu einem reinen LPS-Multischichtsystem fällt der veränderte Formfaktor des Lipids im Mischsystem besonders auf.

Prinzipiell wäre durch den Einbau größerer Polymyxinmengen eine veränderte Aggregationsform aufgrund der Form des Polymyxins denkbar, z.B. ein Übergang von der lamellaren in eine hexagonale Phase, wenn das Lipid seine zylindrische Gestalt beibehält. Die vorliegenden experimentellen Daten liefern dafür allerdings keinen Hinweis. Die Röntgenmessungen weisen bei allen Systemen ausschließlich Reflexprofile lamellarer Strukturen auf. In den Monofilmmexperimenten ist der Kollapsunkt der Monofilme, d.h. der Punkt, an dem

5.6 Wechselwirkungsmodell zur Interaktion von Polymyxin B mit Lipopolysacchariden

der Monofilm instabil wird, nur unwesentlich erniedrigt worden. Daher ist eine Veränderung der Aggregationsform durch den Einbau von PmB aufgrund der vorliegenden Daten nicht anzunehmen.

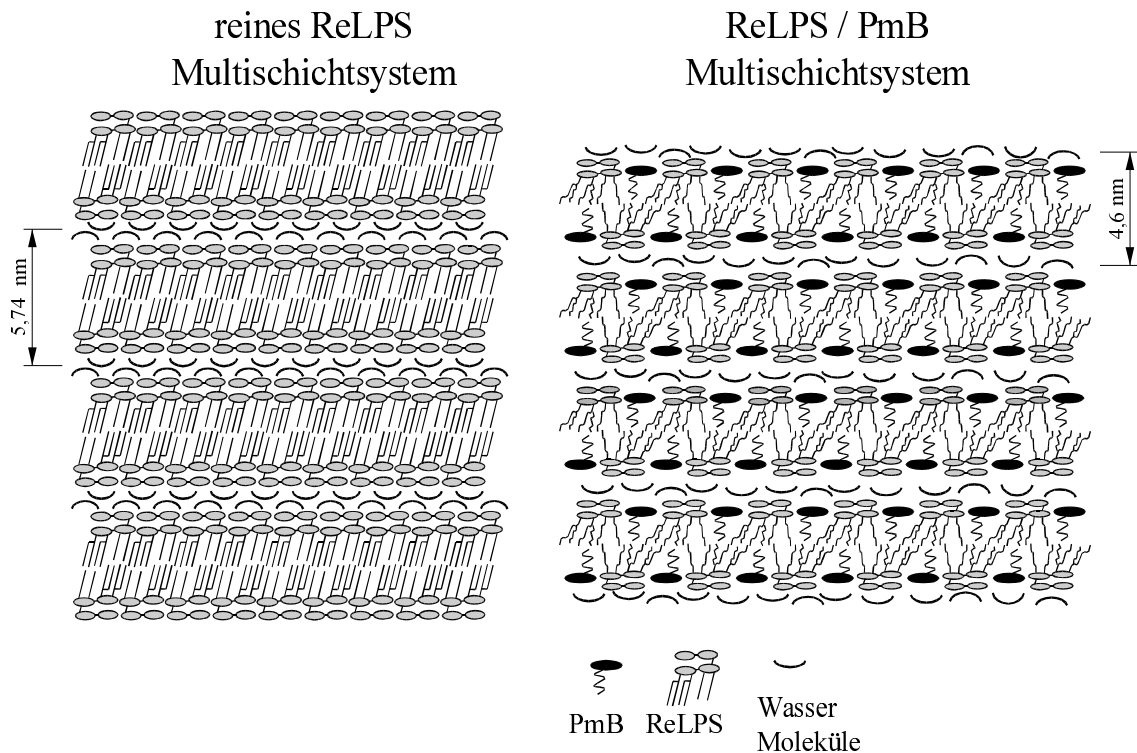


Abbildung 57 Schematische Darstellung der Beeinflussung von LPS-Multischichten durch den Einbau von Polymyxin. Der hoch geordnete Fettsäurebereich wird durch den Einbau von PmB aufgeschmolzen, d.h. es liegt keine geordnete Fettsäurepackung mehr vor.

Die Wechselwirkung einzelner PmB- mit ReLPS-Molekülen konnte mit den zur Verfügung stehenden experimentellen Techniken nicht analysiert werden, da keine monomeren LPS-Moleküle erzeugt und untersucht werden konnten. Die Wechselwirkung von Monomeren [128, 129] scheint aus mehreren Gründen eine untergeordnete Rolle zu spielen. Es ist in vielen Arbeiten gezeigt worden, daß Polymyxin eine große Affinität zu Lipidaggregaten besitzt. Untersuchungen über die Affinität zu monomeren Lipidmolekülen liegen nicht vor. Die Ergebnisse der Röntgendiffraktometrie, der Monofilmmuntersuchungen, der elektronenmikroskopischen Aufnahmen und der dynamischen Lichtstreuung zeigen Modifikationen aber

Kapitel 5 Diskussion

keine Zerstörung der Aggregate, auch bei sehr hohen Polymyxinkonzentrationen nicht. Einige Daten des Polymyxins, z.B. die Flächenbelegung pro Molekül, sind ebenfalls nicht mit einer Wechselwirkung zwischen einem einzelnen PmB- und einem ReLPS-Molekül zu vereinbaren.

Die Amphiphilie des Polymyxins weist auf die Funktion des Moleküls als Membranbaustein hin. Im Gegensatz zum Polymyxin B-Nonapetid, das aufgrund der fehlenden Fettsäurekette ausschließlich hydrophil ist, zeigt das amphiphile PmB eine wesentlich stärkere Beeinflussung der Membraneigenschaften. Eine Reihe von helikalen LPS-bindenden Peptiden haben in Monofilmuntersuchungen ebenfalls zu einer signifikanten Flächenvergrößerung geführt [130]. Allerdings sind weitere Untersuchungen notwendig, um den Grad und den Mechanismus der Beeinflussung von LPS-Membranen durch diese Peptide zu analysieren, so daß ein Vergleich zum gegenwärtigen Zeitpunkt auf Grundlage der vorliegenden Daten nicht möglich ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, daß es sich bei der Bindung von Polymyxin B an Lipopolysaccharidaggregate nicht um eine unspezifische Wechselwirkung zweier geladener Teilchen handelt, sondern um die Bindung eines Moleküls, das darauf spezialisiert ist, die Eigenschaft der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien als Permeationsbarriere gezielt zu modulieren und außer Kraft zu setzen.