

## 6 Zusammenfassung

Gramnegative Erreger sind Ursache für eine Vielzahl von schweren, häufig tödlich verlaufenden Erkrankungen. Der erfolgreiche Einsatz von Antibiotika wird durch die zusätzlich vorhandene äußere Membran gramnegativer Bakterien erheblich erschwert. Die primäre Aufgabe dieser Membran besteht im Schutz des Bakteriums vor dem Eindringen kleiner Moleküle. Das äußere Blatt der äußeren Membran ist überwiegend aus Lipopolysacchariden, hoch geladenen komplexen Lipiden aufgebaut, die eine höchst wirkungsvolle Permeationsbarriere bildet.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von Polymyxin B auf Lipopolysaccharide mit den unterschiedlichen Methoden analysiert und anhand der Ergebnisse ein Modell für die Wechselwirkung von PmB mit LPS auf molekularer Ebene entwickelt und überprüft. Die Ergebnisse der Experimente lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- 1) In den Röntgenexperimenten führte die Zugabe von PmB zum Aufschmelzen des Fettsäurebereichs von ReLPS, was sich durch eine Abnahme des Doppelschichtabstandes äußert. Es wurden nur Reflexe einer *lamellaren* Struktur gemessen.
- 2) In ReLPS-Monofilmmessungen führt die Einlagerung von PmB zu einer erheblichen Flächenvergrößerung des Monofilms. Die Stöchiometrie der Wechselwirkung PmB / ReLPS beträgt  $\sim 0,8$ . Die Penetration kann nicht durch einen erhöhten lateralen Druck oder die Zugabe von Kationen beeinflusst werden, sondern nur durch Zugabe größerer Mengen einer positiv geladenen Lipidkomponente. Die Stabilität einer ReLPS-Monoschicht wird durch den Einbau von PmB kaum verändert.
- 3) Durch PmB wurde in den kalorimetrischen Experimenten die Enthalpie des Übergangs von ReLPS von der  $L_{\beta}'$ - in die  $L_{\alpha}$ -Phase sehr stark reduziert. Bei Zugabe stöchiometrischer Polymyxinmengen ist nahezu keine Enthalpie mehr festzustellen.
- 4) In den titrationskalorimetrischen Experimenten wurde die Stöchiometrie der Wechselwirkung von PmB mit ReLPS, je nach Typ, zu  $n = 0,6 - 1,0$  bestimmt. Unterhalb der Phasenumwandlung ( $T = 25^{\circ}\text{C}$ ) wird eine endotherme Bindungsenthalpie gemessen, während oberhalb der Phasenumwandlung ( $T = 37^{\circ}\text{C}$ ) immer eine exotherme Bindungsenthalpie ermittelt wurde.

## Kapitel 6 Zusammenfassung

5) Die Zugabe von PmB führt zu starken morphologischen Veränderungen von ReLPS-Vesikeln. In der dynamischen Lichtstreuung wurde eine Zunahme der Teilchengröße von ~ 100 nm auf über 1200 nm gemessen. Elektronenmikroskopische Bilder zeigen für reine ReLPS-Präparate einheitliche, *unilamellare* Aggregationsformen, die durch die Zugabe von PmB in *multilamellare* Aggregate von uneinheitlicher Form übergehen.

Aufgrund der vorliegenden experimentellen Ergebnisse wurde das folgende Modell zur Interaktion von Polymyxin B mit ReLPS entwickelt. Polymyxin B bindet aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen an negativ geladene Lipidmembranen. Aufgrund des amphiphilen Charakters wird PmB vollständig in die Membran integriert, wodurch eine Expansion der Membran hervorgerufen wird. Aufgrund der Größe des hydrophilen Ringsystems im Verhältnis zum kleinen lipophilen Teil des PmB kommt es zu einer Umorientierung im Fettsäurebereich benachbarter Lipidmoleküle, um die Lücke im Fettsäurebereich auszufüllen.

Durch den Einbau des PmB in die äußere Membran gramnegativer Bakterien werden somit zwei wesentliche Abwehrmechanismen dieser Membran der Bakterien massiv gestört. Einerseits wird die hohe Ladungsdichte der Membran durch den Einbau von Polymyxin B reduziert bzw. sogar neutralisiert, während gleichzeitig der Ordnungsgrad im Fettsäurebereich drastisch reduziert wird. Durch diese Modifikationen wird die grundlegende Funktion der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, nämlich die einer Permeationsbarriere, aufgehoben. Dadurch kann eine Vielzahl von Substanzen in das Bakterium eindringen.

In MD-Simulationen an reinen ReLPS-Monoschichten und an Mischsystemen aus ReLPS und Polymyxin konnte die experimentell ermittelte Abnahme des Ordnungsgrads im Fettsäurebereich ebenso reproduziert werden wie die Abnahme der Monoschichtdicke. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit kann davon ausgegangen werden, daß die Wirksamkeit des Polymyxins auf seiner räumlichen Struktur beruht, die für einen Einbau in eine geladene Membran optimiert ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch die Verbindung von verschiedenen experimentellen Methoden auf atomarer Ebene ein Wechselwirkungsmodell entwickelt werden, das einen Zusammenhang zwischen der dreidimensionalen Struktur und der Funktion des Polymyxin B mit ReLPS-Aggregaten herstellt und somit Ansätze zum besseren Verständnis von Membraneigenschaften liefert.