

# Untersuchungen zur Wechselwirkung von Polymyxin B mit bakteriellen Lipopolysacchariden

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
des Fachbereiches Chemie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Diplom-Chemiker

**Peer-Joachim Koch**

aus Berlin

Berlin 1998



*Meinen Eltern gewidmet.*

*Lassen Sie uns nie vergessen, daß die Chemotherapie uns von den Schrecken der Infektionskrankheiten befreit hat, daß es nicht übertrieben ist zu sagen, daß Salvarsan, Sulfonamide und Penicillin mehr Menschenleben gerettet haben, als es allen Granaten und Bomben zweier Weltkriege gelungen ist, Menschen zu töten.*

*Otto Warburg  
(1883-1970)*



Diese Arbeit wurde am Institut für Kristallographie des Fachbereichs Chemie der Freien Universität Berlin unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Hans Bradaczek angefertigt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. H. Bradaczek  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. H. Labischinski  
Tag der Disputation: 23. November 1998



## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	11
1.1 Bedeutung von Infektionserkrankungen.....	11
1.2 Zielsetzung dieser Arbeit.....	12
<b>2 Theoretische Grundlagen</b> .....	15
2.1 Aufbau gramnegativer Bakterien.....	15
2.2 Polymyxin B (PmB).....	18
2.3 Polymorphes Phasenverhalten von Lipiden.....	20
2.4 Röntgenbeugung an multilamellaren Schichtsystemen.....	23
2.5 Monofilmmuntersuchungen.....	25
2.5.1 Bestimmung der Phasenzustände von Lipiden.....	25
2.5.2 Wechselwirkungsstudien an Monofilmen.....	28
2.6 Biophysikalische Methoden.....	30
2.6.1 Kalorimetrische Messungen.....	30
2.6.1.1 Differentielle Messung der Wärmetönung (DSC).....	29
2.6.1.2 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC).....	30
2.6.2 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von eingefrorenen Lipidaggregaten.....	32
2.6.3 Lichtstreuung an Lipidvesikeln.....	32
2.7 Molekül-Dynamik (MD) Simulation.....	33
2.7.1 CharmM Kraftfeld.....	34
2.7.2 Randbedingungen der verschiedenen Simulationen.....	35
2.7.3 Verlauf einer MD-Simulation.....	39
2.7.4 Auswertung von MD-Trajektorien.....	39
2.7.4.1 Ordnungsparameter von Fettsäureketten.....	39
2.7.4.2 Zeitlicher Verlauf der Abstandsverteilung eines Atoms.....	41
<b>3 Substanzen und Durchführung der Experimente</b> .....	43
3.1 Chemikalien.....	43
3.1.1 ReLPS.....	43
3.1.1.1 <i>Salmonella minnesota</i> ReLPS Re595.....	43
3.1.1.2 <i>Salmonella minnesota</i> ReLPS HL57.....	45
3.1.1.3 <i>Escherichia coli</i> ReLPS D31m4 .....	45
3.1.2 Polymyxin B.....	45
3.1.3 Polymyxin B-Nonapeptid (PmBN).....	45
3.1.4 Lösungsmittel.....	46

## Kapitel 1 Einleitung

3.2 Durchführung der Experimente.....	46
3.2.1 Pulverdiffraktometer.....	46
3.2.1.1 Probenpräparation für die Pulverdiffraktometrie.....	47
3.2.1.2 Behandlung von Röntgenproben.....	48
3.2.2 Filmwaage.....	48
3.2.2.1 Isothermen-Messungen.....	50
3.2.2.2 Messungen zur Einlagerung aus der Subphase (Isobaren-Messungen).....	51
3.2.3 DSC-Messungen.....	52
3.2.4 ITC-Messungen.....	53
3.2.5 Cryo-Elektronenmikroskopie.....	54
3.2.6 Dynamische Lichtstreuung.....	54
3.2.7 Molekül-Dynamik Simulation von LPS Membranen.....	55
3.2.7.1 Generierung der Membranen.....	55
3.2.7.2 Randbedingungen der MD-Simulation.....	55
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>57</b>
4.1 Röntgenuntersuchungen.....	57
4.1.1 Beugungsbild reiner ReLPS-Multischichtpräparate von <i>Salmonella minnesota</i> .....	57
4.1.2 Polymyxin B / ReLPS-Mischsysteme.....	59
4.1.3 Polymyxin B-Nonapeptid / ReLPS-Mischsysteme.....	62
4.2 Monofilmuntersuchungen an ReLPS.....	64
4.2.1 Charakteristika von <i>Salmonella minnesota</i> ReLPS.....	64
4.2.2 Charakteristika von ReLPS-Monofilmen von <i>Escherichia coli</i> .....	67
4.2.3 Wechselwirkung von PmB(N) mit ReLPS-Monofilmen.....	68
4.2.4 Wechselwirkung von PmB mit Stearylamin / ReLPS - Mischfilmen.....	69
4.2.5 Bestimmung der Flächenbelegung von Polymyxin B in ReLPS-Monofilmen.....	71
4.3 Kalorimetrische Untersuchungen.....	73
4.3.1 DSC-Messungen.....	73
4.3.2 Isotherme Differenztitrations-Kalorimetrie (ITC) von ReLPS.....	76
4.4 Cryo-Elektronenmikroskopie an ReLPS-Aggregaten.....	77
4.5 Lichtstreuung an ReLPS / Polymyxin B-Mischungen.....	81
4.6 Ergebnisse der Molekül-Dynamik Simulation.....	82
4.6.1 Packungsgeometrie.....	82
4.6.2 MD-Simulation von ReLPS-Monoschichten unterschiedlicher Packungsdichte.....	84
4.6.3 MD-Simulation einer hydratisierten ReLPS-Monoschicht.....	89
4.6.4 MD-Simulation an großen ReLPS-Monoschichten.....	91



## 1 Einleitung

<b>5 Diskussion</b> .....	103
5.1 Diskussion der Röntgenuntersuchungen.....	103
5.1.1 Einfluß von Polymyxin B (PmBN) auf ReLPS.....	103
5.2 Diskussion der Monofilmmuntersuchungen.....	106
5.2.1 Unterschiede der Isothermen von <i>S. minnesota</i> und <i>E. coli</i> ReLPS.....	107
5.2.2 Einfluß von Alkali- und Erdalkaliionen auf den Isothermenverlauf.....	108
5.2.3 Wechselwirkung von ReLPS-Monofilmen mit PmB(N).....	110
5.2.4 Beeinflussung der Penetration durch Variation der Ladung des Monofilms.....	114
5.3 Diskussion der kalorimetrischen Untersuchungsergebnisse.....	116
5.4 Beeinflussung von ReLPS-Aggregaten durch PmB.....	121
5.5 Diskussion der MD-Simulationen.....	122
5.5.1 Reine ReLPS Monoschichten.....	123
5.5.2 Einfluß von Wasser auf die Simulation von ReLPS-Monoschichten.....	125
5.5.3 Einfluß von Polymyxin B auf ReLPS-Aggregate.....	127
5.6 Wechselwirkungsmodell zur Interaktion von Polymyxin B mit Lipopolysacchariden.....	130
<b>6 Zusammenfassung</b> .....	137
<b>7 Anhang</b> .....	139
7.1 Literaturverzeichnis.....	139
7.2 Liste der eigenen Publikationen.....	150
7.2.1 Publikationen im Rahmen des Promotionsthemas.....	150
7.2.2 Weitere Publikationen.....	151
7.3 Tabellarischer Lebenslauf.....	154
7.4 Kurzfassungen der Ergebnisse.....	155
7.4.1 Deutsche Kurzzusammenfassung.....	155
7.4.2 Englische Kurzzusammenfassung.....	156
7.5 Danksagung.....	157

## ***Kurzfassung der Ergebnisse***

### **Deutsche Kurzzusammenfassung**

Die äußere Zellmembran ist eines der wichtigsten Schutzsysteme gramnegativer Bakterien. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wechselwirkung des Antibiotikums Polymyxin B (PmB) mit Lipopolysacchariden (LPS), dem häufigsten Lipidbestandteil der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien, mit Röntgenmessungen, Monofilmmessungen, mit kalorimetrischen Untersuchungen, dynamischen Lichtstreuungsexperimenten, Elektronenmikroskopie und Moleküldynamik-Simulationen untersucht.

Röntgenmessungen an ReLPS/PmB-Mischproben zeigen eine Abnahme des Doppelschichtabstands mit zunehmendem Polymyxinanteil. Monofilmmessungen deuten auf ein molares Verhältnis von  $n$  [PmB] /  $n$  [ReLPS] = 4 / 5 hin, was zu einer Ladungsneutralisation der Lipidschicht führt. In kalorimetrischen Messungen wurde mit steigendem Polymyxinanteil eine deutliche Abnahme der Phasenübergangsenthalpie von der  $L_{\beta}$ - in die  $L_{\alpha}$ -Phase festgestellt. Eine Veränderung der Aggregationsform von kleinen unilamelaren Aggregaten zu wesentlich größeren multilamelaren Vesikeln ist in elektronenmikroskopischen Aufnahmen festgestellt worden. Die Reduzierung der Schichtdicke und die Abnahme des Ordnungsgrads im Fettsäurebereich konnte in MD-Simulationen gezeigt werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wird ein zweistufiger Mechanismus für die Wechselwirkung von PmB mit LPS-Membranen angenommen. Zunächst kommt es aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen zu einer schwachen Bindung des positiv geladenen PmB an der negativ geladenen Lipidmembran, ohne dass es zu einem Einbau des PmB kommt. Die hohe entgegengesetzte Ladung beider Moleküle führt im zweiten Schritt zu einem vollständigen Einbau des lipophilen Teils des Polymyxins, mit der Folge, dass der Ordnungsgrad des Fettsäurebereichs reduziert und die Oberflächenladung der Membran neutralisiert wird. Diese beiden Effekte führen wahrscheinlich dazu, dass die äußere Membran ihre funktionalen Barrieren verliert.

## Englische Kurzzusammenfassung

The outer membrane is one of the main defense systems of gramnegative bacteria. In the present work, the interaction of the antibiotic polymyxin B (PmB) with lipopolysaccharide (LPS), the major lipid component of the outer membrane, was studied using x-ray diffraction, monofilm measurements, calorimetric methods, dynamic light scattering techniques, electron microscopy and molecular dynamic simulation.

X-ray diffraction showed a decrease in bilayer thickness of ReLPS/PmB mixed samples with increasing amount of PmB. Monofilm measurements suggested that at a molar ratio  $n[\text{PmB}]/n[\text{ReLPS}]$  of 4/5 neutralization of the charges in the lipid monolayer appears. In calorimetric studies with increasing amounts of PmB, the enthalpy of the phase transition from  $L_\beta$  to  $L_\alpha$  was significantly reduced. Electron microscopic pictures revealed a change in aggregation form of LPS from small unilamellar to much larger, multilamellar vesicles upon addition of PmB. In the MD-simulations a decrease in the thickness of the lipid layer and an increase in fluidity within the fatty acid portion of LPS was found.

In combination, a two step mechanism for the interaction of PmB with LPS membranes is proposed. In the first step, electrostatic attractions lead to weak binding of the positively charged PmB to the negatively charged lipid without insertion of PmB into the membrane. Both the high density of opposite charges on LPS and on PmB are required to initialize the subsequent interactions. In the second step, the lipophilic part of PmB is completely inserted into the membrane causing a considerable decrease in the state of order of the fatty acids and neutralization of the membrane-surface charges. These latter effects might then be responsible for the known breakdown of the outer membrane barrier function.

## ***Danksagung***

Herrn Prof. Dr. Hans Bradaczek danke ich für die Themenstellung dieser Dissertation, seiner steten Diskussionsbereitschaft, sein nicht nur auf wissenschaftliche Fragestellungen beschränktes persönliches Engagement und die außerordentlich positive Atmosphäre in seiner Arbeitsgruppe.

Meinen Kollegen Dr. Thomas Gutberlet, Dipl. chem. Clemens Kahle, Dr. Manfred Kastowsky, Dr. Stefan Obst und Dr. Andreas Sabisch schulde ich großen Dank für die vielen fachlich sehr fruchtbaren Diskussionen, die technische aber vor allem auch sehr persönliche Unterstützung während meiner Zeit am Institut für Kristallographie in Berlin.

Dr. Joachim Frank möchte ich für die kalorimetrischen Messungen und sein Interesse an der Themenstellung meiner Arbeit danken.

Frau Helga Bombosch danke ich für die immer prompte Erledigung der vielen „Kleinigkeiten“ und der technischen Unterstützung bei der Anfertigung dieses Manuskripts. Einen besonderen Dank möchte ich meiner Frau Martina Koch aussprechen. Ohne Ihre Geduld, Ihre permanent moralische Unterstützung und Ihr Verständnis für mein wissenschaftliches Interesse wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

## *Tabellarischer Lebenslauf*

Name:	Peer-Joachim Koch
Geburtstag, Geburtsort:	17.08.1965 in Berlin
Familienstand:	verheiratet seit 1991, ein Kind
Schulbildung:	
1971-1975	Grundschule in Aurich (Ostf.)
1975-1977	Orientierungsstufe in Aurich
1977-1982	Orientierungsstufe in Aurich
1982-1985	Gymnasium in Cuxhaven - Abitur
Wehrdienst:	1984 gemustert, nachdem Abitur für das Studium beurlaubt, 1988 auf Grund einer Neurodermitis ausgemustert
Berufsausbildung:	
1985-1992	Studium der Chemie an der FU-Berlin, April 88 Vordiplom mit der Note »gut«, Diplom im März 92 ebenfalls mit der Note »gut«.
1993	Beginn der Promotion: »Untersuchungen zur Wechselwirkung von Polymyxin B mit bakteriellen Lipopolysacchariden«
Tätigkeiten:	
1990-92	Als studentische Hilfskraft Programmierung von diversen Programmschnittstellen (FORTRAN, C), Portierung von Software (VMS ↔ UNIX) und Anwendungstests unterschiedlicher UNIX-Systeme (HP, AIX, SGI, DEC)
ab 1992-	Im Rahmen von Werksverträge Portierung verschiedener Software zwischen unterschiedlichen Unixsystemen; Vernetzung der vorhandenen PCs
ab 1993	Freier Mitarbeiter der Firma TRANSWARE GmbH
ab 1994	Gründung der Firma PEKO-Soft zum Vertrieb von Hard- und Software
Nov. 1994 - Okt. 1996	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Rahmen des DFG-Projektes »Modellrechnungen am Lipid A und ReLPS und deren Vergleich mit Röntgenbeugungsexperimenten«
seit 10. Mär. 98	Angestellter am MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen