

5 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel der LPS-Forschung ist es, einen Beitrag zur Entwicklung von Medikamenten für die Behandlung der Gram-negativen Sepsis zu leisten, die beim Menschen noch immer häufig einen tödlichen Verlauf nimmt. Die vorliegende Arbeit liefert ein molekulares Modell der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, anhand dessen Experimente interpretiert und neu entworfen werden können. Gleichzeitig wird dadurch die Möglichkeit eröffnet, theoretische Dockingstudien mit den vorliegenden LPS-Aggregaten durchzuführen, um neue Therapeutika zu entwickeln (Drug Design) oder deren Wirkungsmechanismen zu überprüfen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal Modelle für lamellare Aggregate verschiedener LPS-Strukturen bezüglich der Exposition antigener Oberflächenstrukturen untersucht.

Ausgehend vom Lipid A von *E. coli* wurden die drei verschiedenen Lipopolysaccharide von *E. coli* Re, *E. coli* J5 und *Chlamydia* aufgebaut. Dabei fanden sowohl experimentelle, an Teilstrukturen gewonnene Ergebnisse, als auch bereits publizierte Modellierungstudien Eingang in die Ausgangsstrukturen. Diese wurden zu einer geschlossenen Packung, einem aus vier LPS-Molekülen bestehenden Monolayer, zusammengefügt. Die Stabilität und die Packungsdichte dieser Aggregate wurde durch Vakuum-Simulationen überprüft und optimiert. Um die Simulationsergebnisse untereinander vergleichen zu können, wurde nach Analyse verschiedener möglicher Packungsdichten ein einheitlicher Flächenwert für alle LPS-Monolayer vorgegeben. Den LPS-Molekülen wurde in den nachfolgenden MD-Simulationen, in guter Übereinstimmung mit experimentellen Untersuchungen (Schultz, 1993), eine Fläche von ca. 134 \AA^2 in der Monolayer-Ebene zur Verfügung gestellt. Bei diesem Flächenwert betrug der mittlere Tiltwinkel der Fettsäureketten 25° bis 30° .

Durch die Hinzunahme von Wasser und Kationen wurde das Modell weiter verfeinert und stärker der Realität angenähert. Da die Vergrößerung der Simulationssysteme von vier auf neun bzw. 16 LPS-Moleküle die Ergebnisse nicht wesentlich beeinflusste, wurden die weiteren Rechnungen mit Aggregaten aus vier LPS-Molekülen durchgeführt.

Im Vergleich mit den Vakuum-Simulationen zeigte sich, daß - in guter Übereinstimmung mit der einschlägigen Literatur (Brooks & Karplus, 1989) - die Berücksichtigung der Hydratisierung durch explizite Einbeziehung von Wassermolekülen einen deutlichen Effekt auf die Struk-

tur und die Dynamik der modellierten LPS-Aggregate hatte. Die Bewegungen der LPS-Moleküle wurden durch das Wasser gedämpft. Gleichzeitig wurden veränderte, 'aufgerichtete' Konformationen im Kopfgruppenbereich beobachtet.

Wassermoleküle drangen bis auf Höhe der Phosphatgruppen des GlcN-Backbones in die Monolayer ein. Wie nach MD-Untersuchungen an Phospholipiden erwartet (Chiu et al., 1995), hielten sich im hydrophoben Bereich keine Wassermoleküle auf; der Monolayer blieb impermeabel. In Übereinstimmung mit anderen Studien (s. z.B. Schlenkrich et al., 1990) wurde eine deutliche Anisotropie der Beweglichkeit von Wassermolekülen und eine Reduktion der Diffusion um bis zu 90% in der Nähe des LPS beobachtet.

Die Kationen waren bevorzugt mit den negativ geladenen Phosphat- und Carboxylat-Gruppen des LPS assoziiert und bewirkten - wie auch experimentell beobachtet - eine Rigidifizierung der LPS-Monolayer (Coughlin et al., 1985). Calcium-Ionen waren häufig an intra- und intermolekularen Kationen-Brücken beteiligt, während die Natrium-Ionen im gesamten Kopfgruppenbereich anzutreffen waren.

Der Tiltwinkel der Fettsäureketten wurde durch die Hydratisierung nicht signifikant verändert.

Der bekannt hohe Ordnungsgrad des hydrophoben Bereichs der LPS-Moleküle (Labischinski et al., 1985) wurde durch den Verlauf des NMR-Ordnungsparameters S_{CD} und den geringen Anteil von gauche-Torsionen in den Alkylketten bestätigt.

Zwischen den untersuchten LPS-Varianten ließen sich Unterschiede z.B. im gauche-Anteil der Fettsäuren, d.h. in der Lipid A-Region, beobachten, obwohl alle drei auf identischen Lipid A-Grundkörpern basierten. Die Unterschiede in der Struktur der Kopfgruppenregionen der LPS-Varianten zeigten offensichtlich deutliche Wirkungen bis in den hydrophoben Bereich hinein.

Die Oberflächenexposition einzelner Elemente eines Lipopolysaccharids bei den MD-Simulationen hing von der in der Membranebene zur Verfügung stehenden Fläche, der Einbeziehung von Wasser und der Anwesenheit von Kationen ab. Je weiter die Packung, desto besser waren tiefer in der Membran liegende Epitope zugänglich. Bei expliziter Berücksichtigung von Wassermolekülen wurden größere Oberflächenwerte als im Vakuum gemessen, da dort eine Tendenz zur Minimierung der Oberfläche besteht (van Gunsteren & Berendsen, 1990).

Kationen bewirkten eine Verklammerung der LPS-Kopfgruppen, die eine verringerte Exposition von LPS-Oberflächenstrukturen zur Folge hatte.

Die Größe und Struktur des an das Lipid A gebundenen Core-Oligosaccharids beeinflusste die Exposition von Lipid A-Epitopen deutlich: Je größer das angeknüpfte Saccharid, desto kleiner war die zugängliche Oberfläche des Lipid A, d.h. die Exponierung nahm von *E. coli* ReLPS über *Chlamydia*-LPS hin zum *E. coli* J5-LPS ab.

Die Untersuchung der LPS-Monolayer zeigte, daß aus der Sequenz der Zuckerreste des Oligosaccharidanteils des LPS die Exposition von antigenen Strukturen nicht vorhergesagt werden kann, da vom LPS bevorzugt konformationelle Epitope exponiert werden. Bei *Chlamydia* wurde Kdo-3, der letzte Zucker in der Sequenz, weniger stark exponiert als Kdo-1 und Kdo-2. Bei *E. coli* J5 waren mit Glc und Hep-1 zwei Zucker am besten von der Monolayer-Oberfläche her zugänglich, die in der Reihenfolge der Saccharideinheiten keine terminale Position einnehmen.

Mit Hilfe der modellierten Aggregate konnte die Kreuzreaktivität von verschiedenen bekannten Antikörpern gegen Rc-LPS-Strukturen auf molekularer Ebene erklärt werden. Damit leisten die hier erzeugten Strukturen einen wichtigen Beitrag bei der Interpretation der widersprüchlichen Ergebnisse klinischer Studien, bei denen die Wirkung von Antikörpern bei der Prävention bzw. Therapie der Gram-negativen Sepsis untersucht wurde (Schwartz et al., 1989).

Zusätzlich konnten mit Hilfe der modellierten LPS-Aggregate die in der aktuellen Diskussion befindlichen Modelle der Wechselwirkung zwischen LPS und LPS-bindenden Proteinen wie LBP und CD14 sowie Antikörpern überprüft werden (Mayeux, 1997). Dabei stellte sich heraus, daß eine spezifische Erkennung der Lipid A-Bereiche bei intakten LPS-Aggregaten nicht möglich ist. Folglich setzt die Erkennung von Lipid A-Epitopen entweder das Vorliegen von freiem Lipid A in Membranen, eine Veränderung der Membranstruktur im Sinne der Protrusion einzelner Moleküle oder die Reaktion mit LPS-Monomeren voraus. Auch eine Integration von Proteinen in die Membran könnte die Erkennung von Lipid A-Epitopen ermöglichen.

Für die Zukunft eröffnet die vorliegende Arbeit interessante Perspektiven: Vor kurzem wurde die Kristallstruktur des LPS-bindenden Proteins BPI bestimmt (Beamer et al, 1997), so daß nun mit Hilfe der LPS-Aggregat-Modelle die Wechselwirkung zwischen LPS und diesem Protein auf molekularer Ebene studiert werden kann.

Darüberhinaus stellt die Arbeit die Grundlage für die weitere Verfeinerung des Modells der Membran Gram-negativer Bakterien dar: Im nächsten Schritt kann der LPS-Monolayer zu einem asymmetrischen Bilayer, bestehend aus LPS auf der einen und einfachen Phospholipiden auf der anderen Seite, erweitert werden. Schließlich ist die Einbeziehung von Membran-Proteinen wie z.B. Porinen möglich und erforderlich, um zu einem möglichst realistischen Bild der bakteriellen Membran zu gelangen. Mit solchen Membran-Modellen könnte dann der Wirkungsmechanismus von Antibiotika wie Polymyxin B, die sich in die bakterielle Membran einlagern, untersucht werden.

*Certainly we do not know all the answers,
and often those we answer simply provide
more questions. If nothing else, this report
provides more questions.*

T. J. Beveridge, 1983