

2 Theoretische Grundlagen

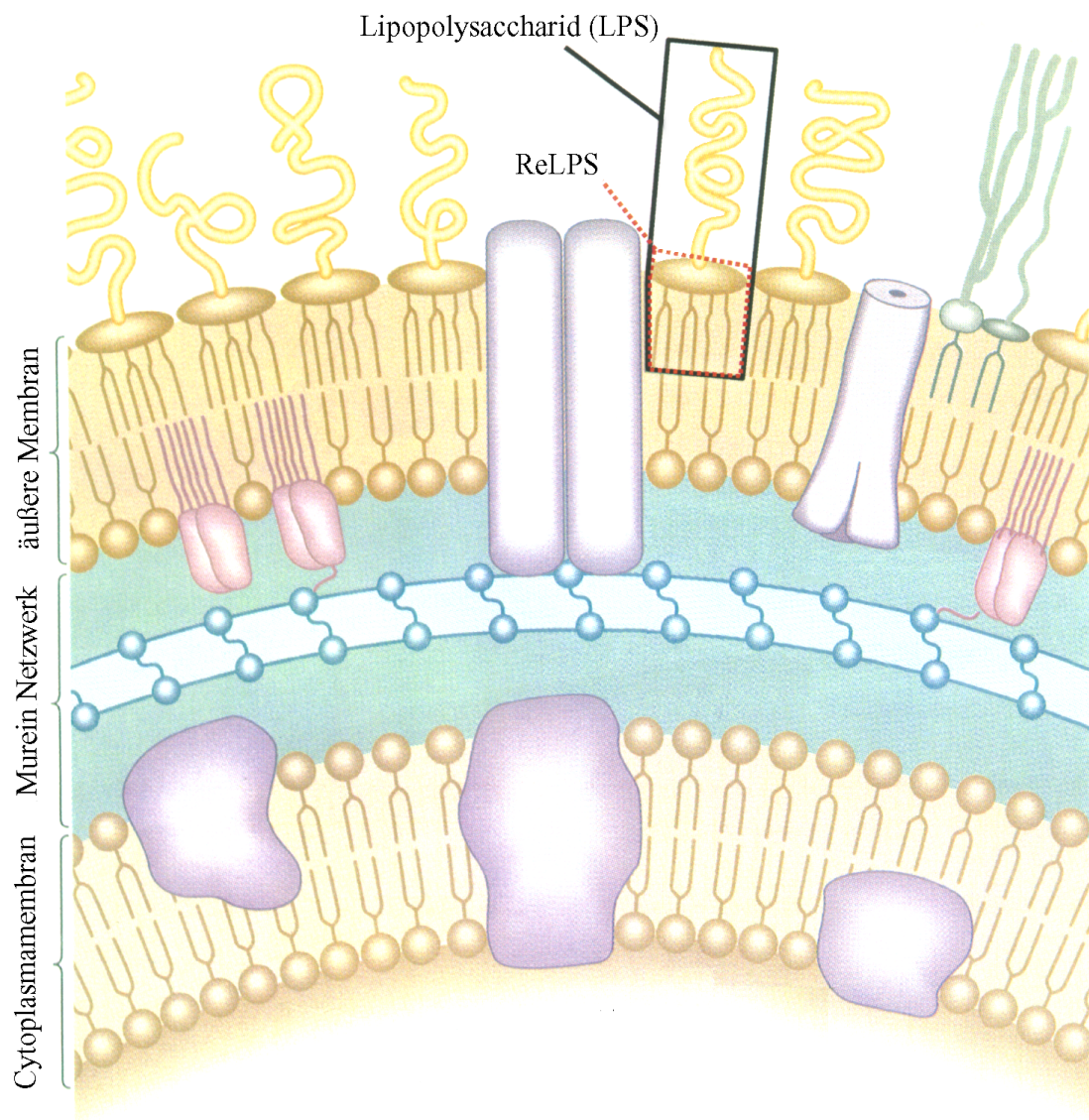
Zunächst wird der Aufbau der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien im allgemeinen und von Lipopolysacchariden im speziellen vorgestellt. Anschließend werden kurz die theoretischen Grundlagen der verwendeten Methoden sowie systemspezifische Parameter eingeführt.

2.1 Aufbau gramnegativer Bakterien

Bakterien stellen eine sehr heterogene Gruppe von Mikroorganismen dar. Trotz ihrer Größe (0,2 - 2 µm) können diese Mikroben noch im Lichtmikroskop, wenn auch sehr kontrastarm, direkt abgebildet werden. Aufbauend auf die systematischen Arbeiten zur Zellfärbung von Paul Ehrlich entwickelte C. Gram 1884 eine Methode zum selektiven Anfärben von Bakterien [26]. Die nach ihm benannte gram-Färbung differenziert zwischen grampositiven Bakterien, die im Mikroskop blauviolett erscheinen und gramnegativen Bakterien, die rot gefärbt dargestellt werden. Diese unterschiedliche Färbung der Bakterien kann direkt auf den unterschiedlichen Aufbau der Zellwand dieser Bakterien zurückgeführt werden.

Während die Zellhülle gram-positive Bakterien nur von einer Cytoplasmamembran und daran anschließend von einer dicken nahezu strukturlosen Mureinschicht umgeben sind, besitzen gramnegative Keime eine trilamellare Struktur, bestehend aus einer Cytoplasmamembran, einer dünnen Mureinschicht und einer weiteren Membran, die das Bakterium nach außen hin abschließt (s. Abbildung 2). Diese zusätzliche äußere Membran weist eine Vielzahl von Besonderheiten auf und zeigt eine deutlich von der Cytoplasmamembran abweichende Zusammensetzung [27, 28]. Der Aufbau der äußeren Membran ist asymmetrisch. Auf der Innenseite finden sich analog zur Cytoplasmamembran verschiedene Phospholipide und Proteine, während das äußere Blatt aus Lipopolysacchariden (LPS) und Proteinen zusammengesetzt ist. Lipopolysaccharide kommen ausschließlich im äußeren Blatt gramnegativer Bakterien vor und sind mit bis zu 19% an der Trockenmasse dieser Membran beteiligt [27, 28].

Kapitel 2 Theoretische Grundlagen



Escherichia Coli

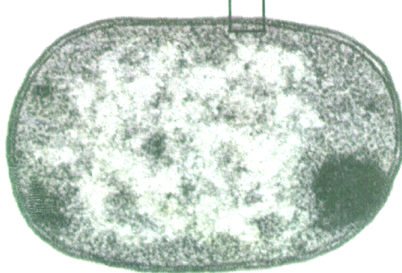


Abbildung 2 Schematischer Aufbau der Zellhülle gramnegativer Bakterien [Abbildung modifiziert aus 29]. Das äußere Blatt der äußeren Membran ist, abgesehen von Proteinen, aus Lipopolysacchariden (LPS) aufgebaut. Es folgt dann ein Murein-Netzwerk, das allerdings erheblich dünner ausfällt als bei grampositiven Bakterien. Zum Innenraum schließt sich die Cytoplasmamembran an.

2.1 Aufbau gramnegativer Bakterien

Nach dem Erscheinungsbild der Bakterienkulturen im Mikroskop teilt man die Lipopolysaccharide in zwei Gruppen ein. Bei Wildtypen handelt es sich überwiegend um die sogenannte S-Form, bei der die Kernregion und die O-spezifische Seitenkette vollständig ausgebildet ist [30, 31] (s. Abbildung 3). Defektmutanten sind hingegen nicht in der Lage bei der LPS-Biosynthese bestimmte Zuckerverknüpfungen durchzuführen, so daß die O-spezifische Seitenkette und Teile der Kernregion bei diesen als R-Form bezeichnete Mutanten fehlen. Die kleinste in der Natur vorkommende LPS-Einheit ist das ReLPS, das aus dem Lipid A und 1-3 **KDO**-Zuckern aufgebaut ist [29, 32].

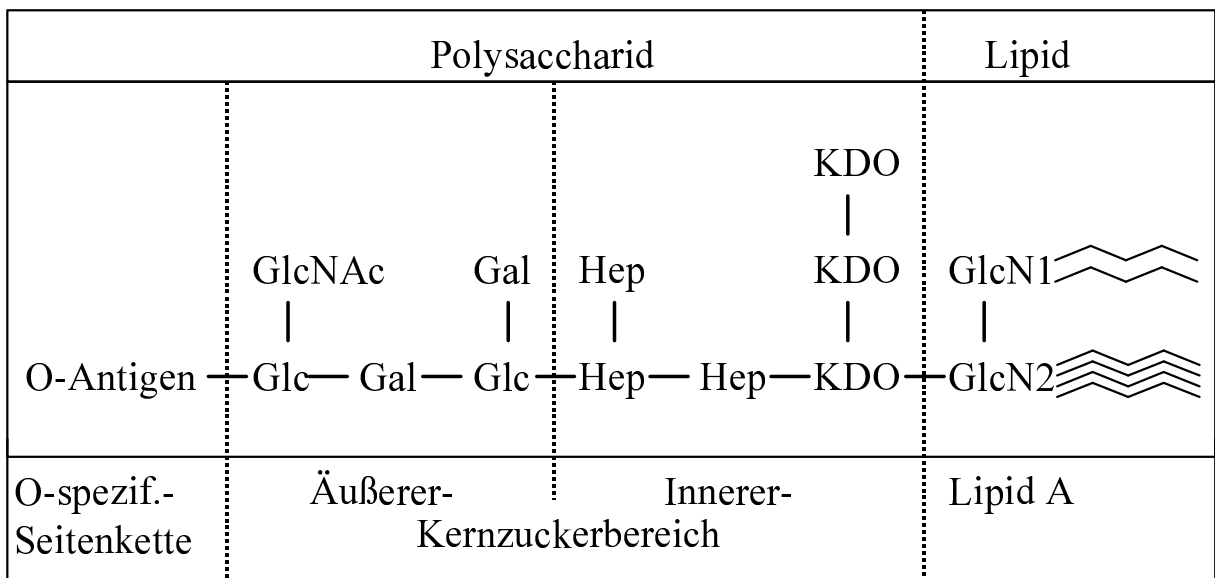


Abbildung 3 Schematischer Aufbau der Lipopolysaccharide. Dargestellt ist die generalisierte Struktur von *Salmonella*-LPS. Die O-spezifische Seitenkette ist hoch variabel und kann zur Typisierung von verschiedenen Stämmen (z.B. der über 1000 *Salmonella*-Subtypen) eingesetzt werden.

Lipopolysaccharide lassen sich schematisch in drei unterschiedliche Regionen einteilen, die sich auch im biologischen Verhalten widerspiegeln [27, 28, 29, 33]. Den Grundbaustein stellt das Lipid A dar, mit dem das LPS in der Membran verankert wird. Daran schließt sich die sogenannte Kernregion an, die 10 Zuckereinheiten umfaßt. Sie kann in eine *Innere*- und eine *Äußere*-Kernregion eingeteilt werden [27]. Die Innere-Kernregion ist aus 2-Keto-3-desoxy-D-manno-octonsäuren (**KDO**) und Heptosen (**Hep**) aufgebaut [27, 29]. Diese Zucker werden nur in gramnegativen Bakterien angetroffen. Die sich daran anschließende Äußere-Kernregion ist aus häufig vorkommenden Zuckern (Glukose, Galaktose, Glukosamin)

Kapitel 2 Theoretische Grundlagen

aufgebaut, die eine etwas höhere Variabilität aufweisen, als die Innere-Kernregion [27]. Aufgrund der besonderen Verknüpfungen ist es den meisten Zuckerhydrolasen nicht möglich, diese Zucker zu spalten. An dieses Grundgerüst ist die sogenannte O-spezifische Seitenkette, auch als O-Antigen bezeichnet, kovalent gebunden.

Die aus Lipopolysacchariden aufgebaute äußere Membran gramnegativer Bakterien agiert als ein bemerkenswert gut funktionierendes Abwehrsystem, sowohl gegen aggressive Substanzen wie Gallensäuren und digestive Enzyme [28, 34] als auch gegen eine Vielzahl von Antibiotika [35]. Lediglich sehr kleine hydrophile Moleküle sind in der Lage durch die wassergefüllten Kanäle der Porine in das Bakterium einzudringen [28, 34].

Durch den Aufbau und die Lage der äußeren Membran stellt diese den ersten und einen der effektivsten Abwehrmechanismen von gramnegativen Bakterien dar. Die Wirksamkeit vieler Antibiotika wird durch die Effizienz dieser Permeationsbarriere erheblich reduziert. Substanzen, die nicht klein genug sind, um durch die Wasserkanäle von Porenproteinen in das Innere der Bakterien zu gelangen, werden kaum von gramnegativen Bakterien resorbiert.

2.2 Polymyxin B (PmB)

Die ersten Berichte über die Wirksamkeit von Polymyxinen gegen gramnegative Bakterien stammen aus dem Jahr 1947 [36, 37]. Die Substanzklasse der Polymyxine ist überaus wirksam gegen gramnegative Krankheitserreger (bakterizid), kommt aber bedingt durch die hohe Toxizität nur in wenigen Fällen zum Einsatz [35].

Die Aufklärung der Peptidsequenz gelang Vogler durch systematische Synthese verschiedener zyklischer Strukturen und konnte letztendlich durch Totalsynthese verifiziert werden [38, 39, 40]. Die Kristallstruktur dieser Verbindung ist bisher nicht bekannt, allerdings liegen übereinstimmende Strukturvorschläge für PmB, abgeleitet aus theoretischen Modellierungstudien und NMR-Experimenten, vor [24, 41].

2.2 Polymyxin B (PmB)

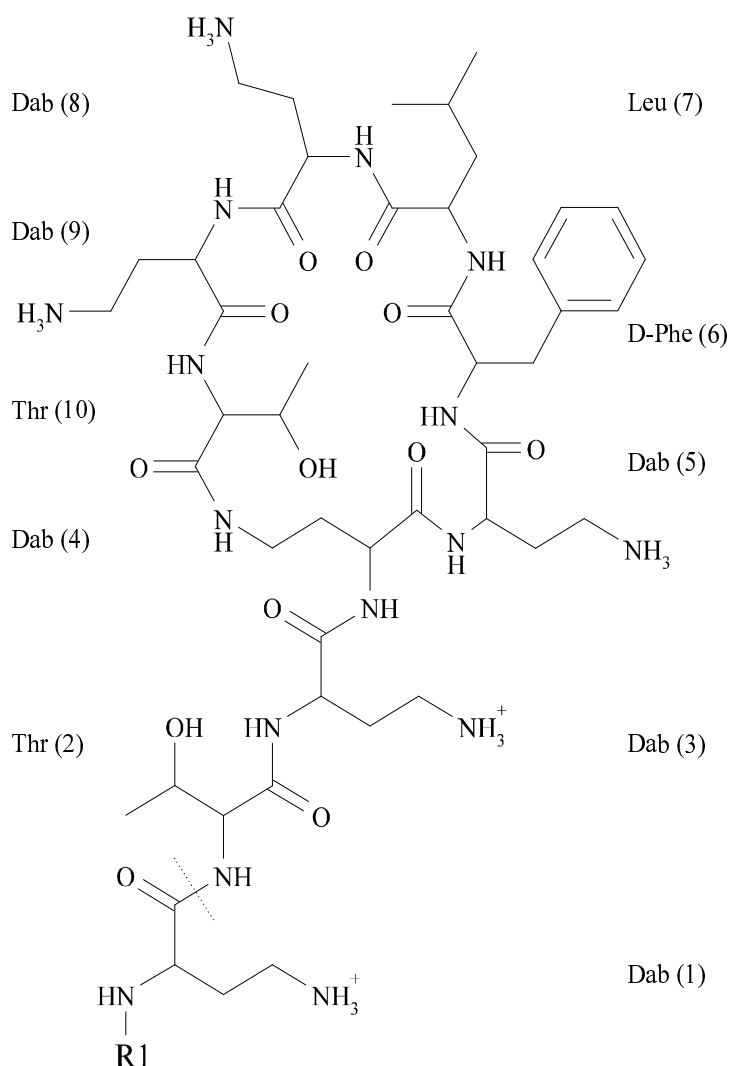


Abbildung 4 Strukturformel von Polymyxin B (PmB). Die gestrichelte Linie markiert die Spaltungsstelle zum Polymyxin B-Nonapeptid (PmBN) durch das Enzym Ficin [12]. R1 steht für einen Fettsäurerest, der leicht variieren kann. Im Falle des Polymyxin B findet man hauptsächlich R1 = 6-Methyloxooctanoyl (PmB₁) oder R1 = 6-Methyl-oxoheptanoyl (PmB₂). Thr = Threonin, Dab = Diaminobuttersäure, Phe = Phenylalanin, Leu = Leucin

In Abbildung 4 ist die Strukturformel von Polymyxin B dargestellt. Die verschiedenen natürlichen Derivate der Polymyxinfamilie unterscheiden sich durch Variationen des Fettsäurerestes (R1), sowie durch unterschiedlicher Substitution der Aminosäuren 3, 6 und 7. Auffällig ist das Vorkommen der selten anzutreffenden α -, ω -Diaminobuttersäure (Dab) und die stereochemische Orientierung der Aminosäure 6 (D-Phenylalanin). Besondere Bedeutung

kommt der Unterteilung des Moleküls in einen strukturbestimmenden zyklischen Teil, der den überwiegenden Teil der Ladung trägt, und in einen linearen Teil, der mit einer aliphatischen Fettsäure abschließt, zu.

2.3 *Polymorphes Phasenverhalten von Lipiden*

Alle bekannten Lipide zeigen unabhängig von ihrer Herkunft, synthetisiert oder aus biologischen Quellen isoliert, ein sehr ausgeprägtes polymorphes Aggregationsverhalten. Während das Phasenverhalten einfacher Phospholipide schon sehr eingehend studiert worden ist [42, 43], liegen bisher verhältnismäßig wenig Daten für Lipopolysaccharide vor [44, 45, 46, 47, 48]. Neben der im Vergleich zu Phospholipiden sehr komplexen und variablen Struktur der Lipopolysaccharide spielt sicherlich die aufwendige und sehr komplizierte Isolierung größerer Mengen einer einzelnen Komponente dabei eine entscheidende Rolle [32, 49, 50].

Lipide bilden spontan in wässrigen Medien oberhalb einer Grenzkonzentration, der sogenannten *kritischen Micellenbildungskonzentration* (**c**ritical **m**icelle **c**oncentration : CMC), Aggregate. Die gebildeten uni- oder multilamellaren Vesikel sind fluide und deformierbar. Durch Variation der Temperatur, des pH-Wertes oder durch die Veränderung der Ionenkonzentration läßt sich die Aggregationsform erheblich beeinflussen.

Die einfache Betrachtung der molekularen Gestalt des jeweiligen Amphiphils hat sich als überaus hilfreiches Modell zur Erklärung des polymorphen Verhaltens erwiesen [51]. Anhand eines dimensionslosen Formparameters S (s. Abbildung 5) ist eine Abschätzung der wahrscheinlichen Aggregationsform des jeweiligen Moleküls möglich. Man analysiert dabei das Verhältnis der Querschnittsfläche der hydrophilen Kopfgruppe zur Querschnittsfläche des hydrophoben Lipidankers. Sind beide Querschnittsflächen ungefähr gleich groß, d.h. $S \approx 1$ so bilden sich bevorzugt lamellare Strukturen aus. Ist hingegen die Querschnittsfläche der Kopfgruppe *größer* als die des Lipidankers ($S < 1$) bilden sich bevorzugt röhrenartige oder kugelförmige Aggregate. Ist die Querschnittsfläche der Kopfgruppe kleiner als die des Lipidankers ($S > 1$), so daß eine quasi kegelförmige Molekülgestalt vorliegt, kann es zur Ausbildung **invertierter** Strukturen kommen, z.B. der hexagonalen Phase H_{II} oder aber zur Bildung von micellaren Aggregaten.

2.3 Polymorphes Phasenverhalten von Lipiden

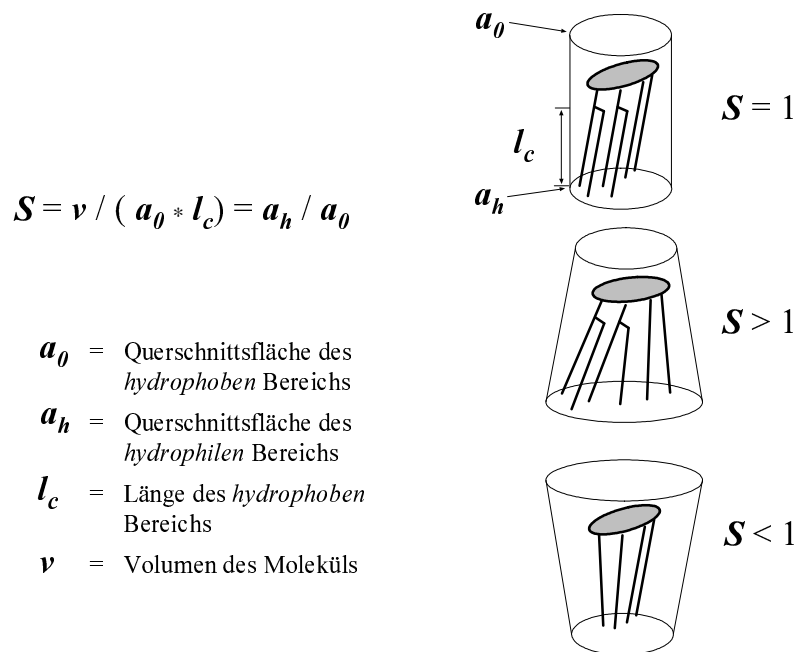


Abbildung 5 Bestimmung des Formfaktors S nach Israelachvili et al. [51]. Anhand des Verhältnisses der Querschnittsflächen des hydrophilen und des hydrophoben Bereiches eines Moleküls kann abgeschätzt werden, welche Aggregationsform für das Molekül wahrscheinlich anzutreffen ist. Während die Querschnittsfläche im hydrophilen Teil des Moleküls in der Regel keinen Veränderungen unterliegt, kann der hydrophobe Teil durch Temperaturerhöhung seine Querschnittsfläche vergrößern, so daß eine Temperaturabhängigkeit der Aggregationsform zu beobachten ist.

Die in Abbildung 5 gezeigten verschiedenen Aggregationsformen der Lipide werden als Mesophasen bezeichnet und sind entsprechend einer von Luzatti eingeführten Nomenklatur benannt [52]. Mit abnehmender Temperatur gehen die ursprünglich fluiden und beweglichen Lipide in eine geordnetere Phase über. Diesen Vorgang bezeichnet man als Hauptphasenübergang. Die in der L_α -Phase noch aufgeschmolzenen Alkylketten der Lipide erstarren und es bildet sich eine geordnete, sehr rigide Lipidmembran, die sehr häufig in Form einer lamellaren Struktur, z.B. einer L_β - oder $L_{\beta'}$ -Phase, vorliegt.

Für Lipopolysaccharide treten in Abhängigkeit von der Temperatur, dem Salz- und Wassergehalt unterschiedliche Aggregationsformen auf. Sehr häufig liegen lamellare Strukturen vor, allerdings wurden unter anderen Bedingungen auch hexagonale Phasen beschrieben [22, 32, 48].

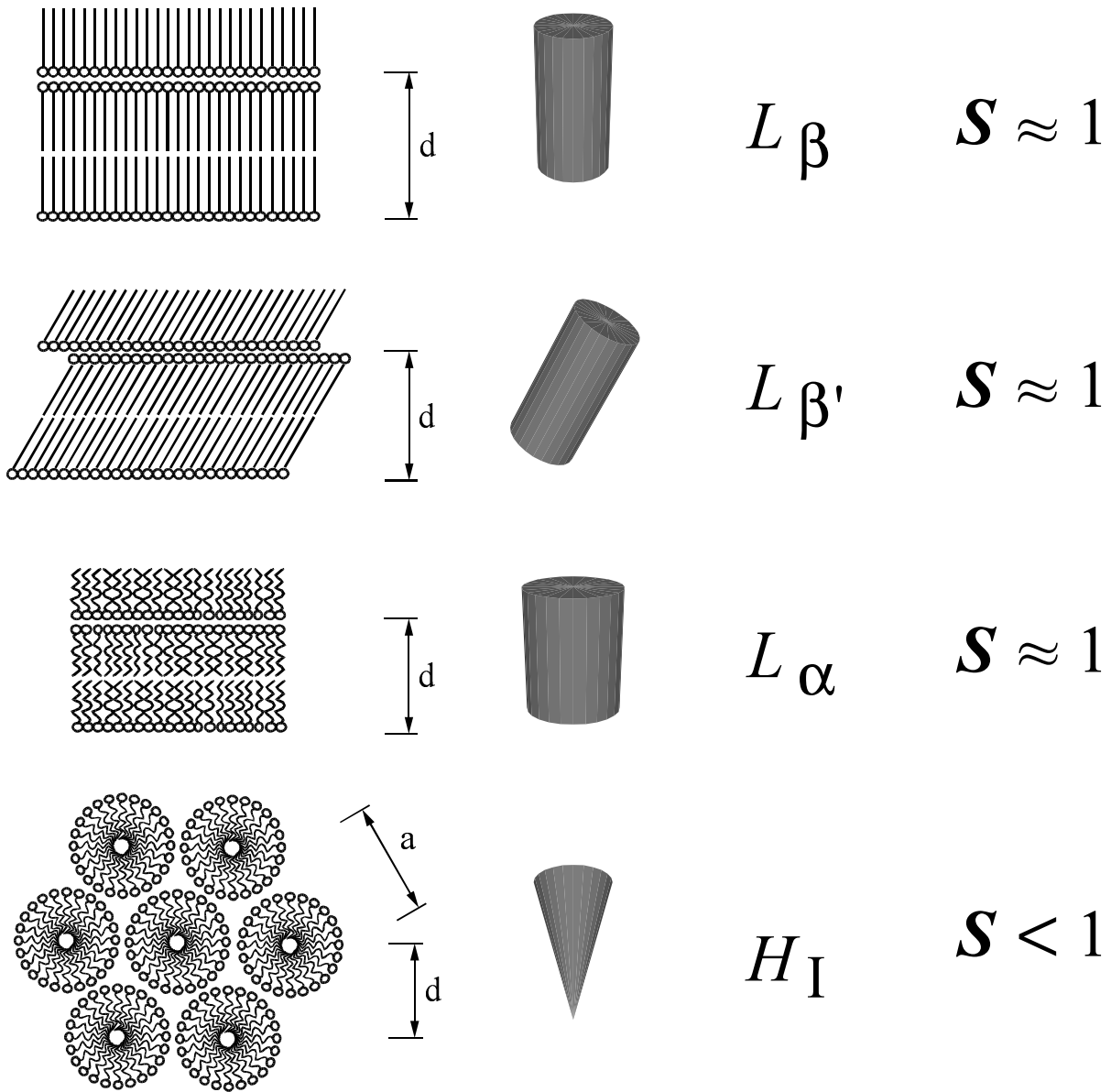


Abbildung 6 Schematische Darstellung unterschiedlicher Aggregationsformen von Lipiden. Die Ausbildung der jeweiligen Phase ist anhand der vereinfachten Darstellung der geometrischen Form der Lipide (s. Abbildung 5) angedeutet.

2.4 Röntgenbeugung an multilamellaren Schichtsystemen

Im folgenden sollen lediglich die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Begriffe und Abkürzungen eingeführt werden. Eine detaillierte Darstellung findet sich in der Fachliteratur [53, 54, 55, 56, 57].

Die Beugung von Röntgenstrahlen an geordneter Materie beruht grundlegend auf der elastischen Streuung des Röntgenstrahls an den Elektronen der Atome der zu untersuchenden Struktur [53, 54].

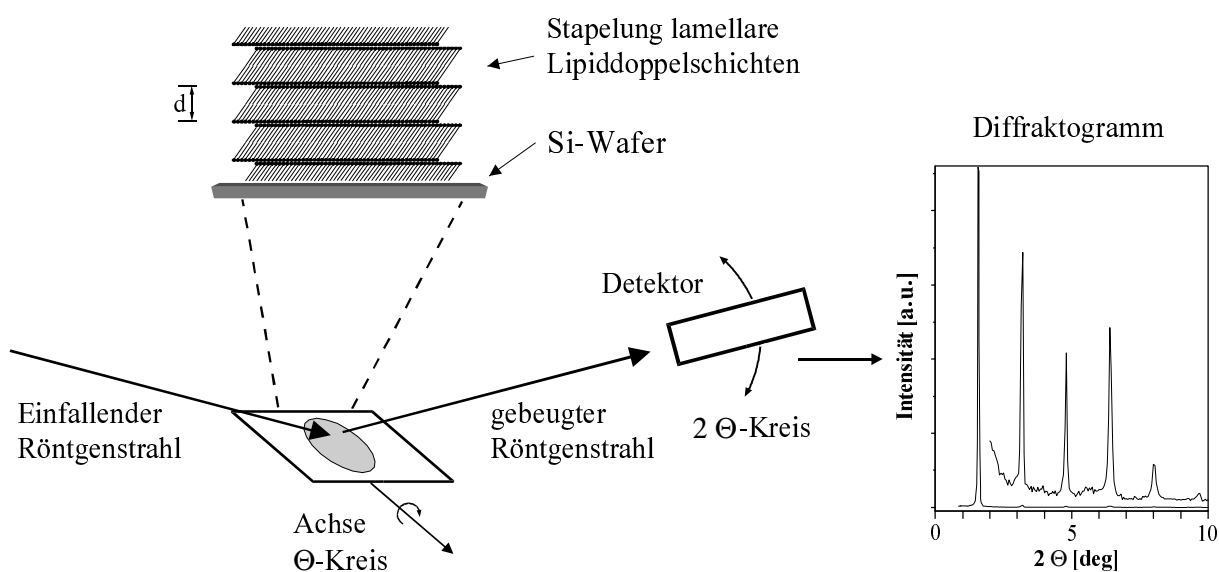


Abbildung 7 Schematische Darstellung der Röntgenbeugung an multilamellaren Schichtsystemen.

Liegt der Struktur ein periodischer Aufbau zugrunde, kann der sich periodisch wiederholende Abstand der Struktur nach der Bragg'schen Gleichung berechnet werden:

$$d = n * \lambda / 2 * \sin \Theta$$

λ ist die verwendete Wellenlänge, Θ der Winkel des einfallenden Röntgenstrahls und d der kürzeste Abstand des Schichtsystems. Je nach dem Wert von n spricht man von Reflexionen der Ordnung n .

Für Lipide in einer lamellaren Phase entspricht die Stapelung der Doppelschichten übereinander einer geordneten periodischen Anordnung. Diese Struktur ist nur entlang der Stapelrichtung periodisch aufgebaut (s. Abbildung 7). Mit d wird der Abstand zwischen den

Kapitel 2 Theoretische Grundlagen

Schichtebenen in der Stapelrichtung bezeichnet [56, 59]. Eine solche Phase liefert im Beugungsbild eine charakteristische Reflexserie aus äquidistanten Reflexen, die einem ganzzahligen Vielfachen des Beugungswinkels 2Θ entsprechen. Der Abstand d gibt die Dicke der Doppelschicht, bestehend aus der Lipidkomponente, Kationen und vorhandenen Wassermolekülen wieder [52] und wird als lamellare Periodizität bezeichnet [57].

Liegt mehr als eine Lipidphase in einer Lipidprobe vor, so ist dies auch im Röntgenbeugungsbild anhand von verschiedenen Reflexserien zu erkennen [53]. Jede Phase liefert eine eigene Serie mit der jeweiligen Periodizität der Phase. Für ein homogenes Lipidsystem setzt dies die Koexistenz verschiedener Phasen voraus, was nur selten beobachtet wird [43]. In Mischungen von Lipiden sind dagegen häufiger verschiedene Phasen gleichzeitig anzutreffen. Dabei sind sowohl separierte Phasen der reinen Lipide als auch Mischphasen der Lipide möglich [58]. Jede einzelne Lipidphase liefert dann eine eigene Reflexserie, die separat auszuwerten ist.

Neben dem d -Wert liefert das Beugungsbild weitere grundlegende Daten. Die Intensität der Reflexe des Beugungsbildes ist mit der Elektronendichte der molekularen Struktur der untersuchten Substanz verbunden [53]. Die parallel zur Membrannormalen projizierte Elektronendichte bestimmt die relative Intensität der einzelnen Reflexe im Beugungsbild. Änderungen in der Struktur des Schichtsystems, z.B. durch eine veränderte Orientierung der Moleküle oder durch Aufnahme oder Abgabe von Wasser und Kationen, führt zu einer Veränderung der relativen Reflexintensitäten [22,53].

Der Ordnungsgrad der gebildeten Aggregate und die Größe des kohärent streuenden Bereichs beeinflusst sowohl die Form, als auch die Halbwertsbreite der Röntgenreflexe [59]. Sind nur wenige Lipidschichten in einem lamellaren Aggregat aufeinander gestapelt, d.h. bilden nur wenige sich wiederholende Einheiten die periodische Struktur, ist die Größe des kohärent streuenden Bereichs klein. Im Beugungsbild weisen dann die Reflexe eine große Halbwertsbreite auf.

Eine kleine Halbwertsbreite und scharfe Reflexe mißt man bei großen kohärent streuenden Bereichen, die aus sehr vielen aufeinander gestapelten Lipidschichten gebildet werden.

2.5 Monofilmmuntersuchungen

2.5 Monofilmmuntersuchungen

Lipide sind aufgrund ihres amphiphilen Charakters grenzflächenaktive Substanzen [60]. Während der hydrophile Teil des Moleküls bestrebt ist, sich in einem hydrophilen Medium zu lösen, versucht der hydrophobe Teil des Moleküls eben dieses zu vermeiden. Ein klassisches Beispiel stellt die Stearinsäure dar. Nach Aufgeben einiger Tropfen einer Stearinsäurelösung auf eine Wasseroberfläche bleiben die Stearinsäuremoleküle nach dem Verdunsten des Lösungsmittels an der Grenzfläche zurück. Dabei ragt die hydrophile Carboxylat-Gruppe in die wässrige Subphase, während der hydrophobe Alkylrest aus der Wasseroberfläche herausweist. Solch eine monomolekulare Schicht auf einer Subphase wird als Langmuirfilm bezeichnet [61]. Diese Monofilme stellen ein hervorragendes System zur Untersuchung der Phaseneigenschaften von Lipiden dar [61, 62], ermöglichen aber auch das Studium von Wechselwirkungen verschiedener Substanzen mit Modellmembranen [62, 63, 64].

2.5.1 Bestimmung der Phasenzustände von Lipiden

Die Lipide in einem Monofilm können unterschiedliche Phasenzustände (gasförmig, flüssig oder fest) einnehmen. Da die Moleküle an die Grenzfläche zwischen Luft und einer Subphase gebunden sind, können sich nur in zwei Dimensionen verschiedene Phasenzustände ausbilden. Die Messung des Oberflächendrucks als Funktion der Fläche pro Molekül erlaubt es, die verschiedenen Phasenzustände eines Lipids experimentell zu bestimmen [62, 65]. Erfolgt die Messung bei konstanter Temperatur, dann erhält man eine *Isotherme*, die in der Regel einen charakteristischen Verlauf für das jeweilige Lipid unter den gegebenen Bedingungen aufweist [61]. Durch Variation der Temperatur, Veränderung der Ionenstärke oder des pH-Wertes wird der Verlauf der Isotherme eines Lipids im allgemeinen massiv beeinflusst [61, 62].

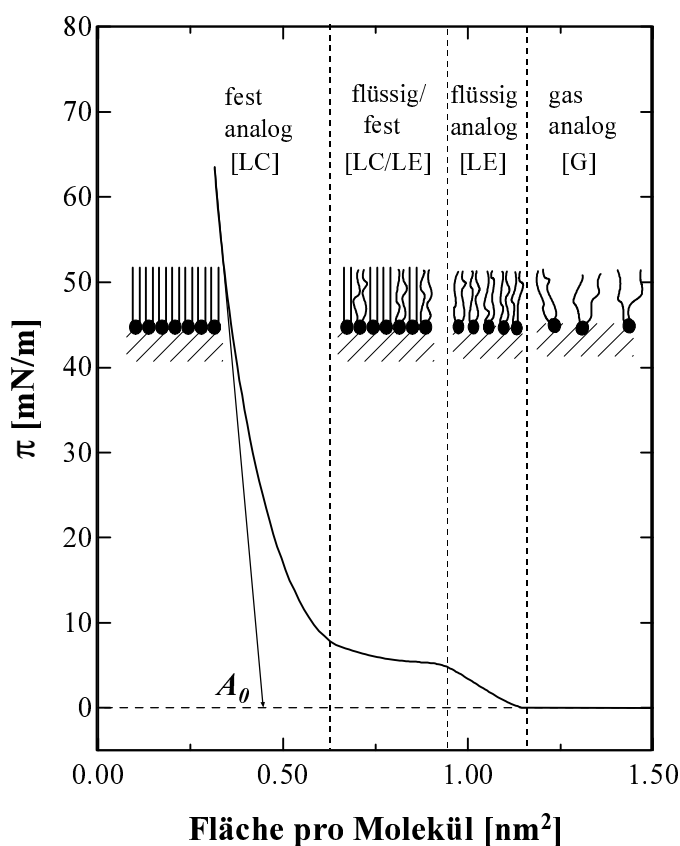


Abbildung 8 Schematische Darstellung der verschiedenen Phasenzustände bei der Kompression eines Amphiphils auf einer wässrigen Subphase am Beispiel der Isotherme von DPPG.

Bei großen Flächenwerten pro Molekül ist kein Oberflächendruck meßbar. Die Moleküle des Lipides bewegen sich auf der Wasseroberfläche völlig unabhängig voneinander. Diesen Zustand bezeichnet man als Gasphase (**G**) des Monofilms [65]. Wird die dem Monofilm zur Verfügung stehende Fläche reduziert, dann kommt es zu einer Annäherung der Lipidmoleküle, die durch einen Anstieg des Oberflächendrucks gekennzeichnet ist. Die Moleküle weisen in dieser flüssigen Phase (**LE**) weder eine einheitliche Konformation noch eine geordnete Packung auf. Wird die Fläche des Monofilms noch weiter reduziert, dann findet ein Übergang von der fluiden in die feste Phase (**LC**) statt. Dieser Übergang kann kontinuierlich erfolgen, wobei der Oberflächendruck mit abnehmender Fläche des Monofilms ansteigt, oder es kommt zu einem Phasenübergang 1. Ordnung, der sich zunächst durch einen konstanten Druck bei abnehmender Fläche auszeichnet, um dann in der festen Phase einen sehr steilen Anstieg des Oberflächendrucks zu zeigen. Während des Phasenübergangs kommt es zu einer Veränderung sowohl der Konformation als auch der Packung der Lipidmoleküle.

2.5 Monofilmmuntersuchungen

In der festen Phase liegen die Lipidmoleküle im Monofilm immobilisiert und in einer einheitlichen Konformation dichtgepackt vor. Es kommt zur Ausbildung einer eindimensionalen, quasi-kristallinen Packung.

Eine weitere Kompression des Monofilms führt zu einem Zusammenbruch des Monofilms. Der korrespondierende Oberflächendruck wird als Kollapsdruck bezeichnet. Einzelne Moleküle treten aus dem Monofilm und werden in die Subphase gedrückt, oder es kommt zu einer Überlagerung des lamellaren Monofilms, so daß ein Teil des Monofilms auf der Subphase erhalten bleibt, während ein anderer Teil des Monofilms *über* oder *unter* die vorhandene Schicht gedrückt wird, so daß multilamellare Schichtsysteme entstehen können.

Während die oben beschriebenen flächenabhängigen Phasenübergänge völlig reversibel ablaufen, ist ein Monofilm nach Überschreiten des Kollaspunktes meist irreversibel zerstört.

Eine weitere charakteristische Größe bei Monofilmmexperimenten ist die Flächenbelegung eines einzelnen Moleküls. Man unterscheidet dabei die Flächenbelegung eines Lipids als Funktion des lateralen Drucks, d.h. $A(\pi)$ [nm²] und den extrapolierten Flächenwert A_0 [nm²] des Moleküls. Der A_0 -Wert eines Lipids wird durch Anlegen einer Tangente im Bereich der festen Phase (LC) einer Isotherme ermittelt (s. Abbildung 8.). Dieser Wert ist keine konkrete physikalische Größe. Sie stellt lediglich ein Maß für die Flächenbelegung eines Lipids dar, das in einer stark komprimierten Packung vorliegt, extrapoliert auf einen lateralen Druck von 0 mN/m. Dennoch hat sich diese Größe im Vergleich und der Charakterisierung unterschiedlicher Substanzen sehr bewährt.

Monofilme von Mischsystemen, d.h. aus verschiedenen Lipidkomponenten zusammengesetzte Filme, zeigen Unterschiede in den Isothermen im Vergleich zu den reinen Systemen [61, 65]. Während bei einem nicht mischbaren Lipidsystem die gemessene Isotherme sich additiv aus den Isothermen der reinen Komponenten zusammensetzt, kann für ein Mischsystem die Charakteristik einer Isotherme durch die Anwesenheit einer weiteren Lipidkomponente erheblich verändert werden. Im einfachsten Fall induziert die zweite Lipidkomponente eine dichtere oder aber eine aufgelockere Packung des Monofilms und somit einen dementsprechend veränderten Verlauf der Isotherme. Beeinflusst werden auch die Lage der Phasenübergänge und der Kollaspunkt des Mischsystems.

2.5.2 Wechselwirkungsstudien an Monofilmen

Monofilme stellen aufgrund ihres molekularen Aufbaus ein sehr gutes Modellsystem für eine Zellmembran dar. Da die Bedingungen, z.B. die Temperatur und der Ionengehalt der Subphase ebenso bekannt sind wie die Zusammensetzung des Monofilms, ist es möglich, die Wechselwirkung von membranaktiven Substanzen mit Monofilmen zu untersuchen [63, 66, 67, 68]. Dazu wird ein Monofilm definierter Größe bei konstantem Druck in Kontakt mit einer in der Subphase gelösten Substanz gebracht. Die Anzahl der Moleküle (n) des Monofilms ist über das aufgegebene Volumen (V in μl), die Konzentration (c in $\text{g}/\mu\text{l}$) der Lipidlösung, N_A die Avogadrokonstante (mol^{-1}) und die Molmasse (M_{Lipid} in g/mol) des verwendeten Lipids genau bekannt :

$$n = \frac{V * c * N_A}{M_{\text{Lipid}}} .$$

Wird die Fläche eines Monofilms bei konstantem lateralen Druck und konstanter Temperatur als Funktion der Zeit aufgetragen, erhält man eine *Isobare*. Die Wechselwirkung der Lipidmoleküle des Monofilms mit der in der Subphase gelösten Substanz kann die Fläche des Monofilms in drei unterschiedlichen Arten beeinflussen. Kommt es nicht zu einer Wechselwirkung zwischen dem Lipidfilm und der in der Subphase gelösten Substanz, dann bleibt die Fläche des Monofilms konstant. Werden Lipidmoleküle aus dem Monofilm herausgelöst, so wird eine Abnahme der Monofilmfläche gemessen. Kommt es zu einem Einbau der Substanz aus der Subphase in den Monofilm, dann wächst die Fläche des Monofilms.

Ist die Fläche pro Molekül der eingelagerten Substanz bekannt, dann ist es möglich, aus der gemessenen Gesamtfläche die Stöchiometrie der Wechselwirkung zu berechnen. Kommt es zu einer Beeinflussung der Flächenänderung durch Variation des lateralen Drucks oder der Ionenstärke der Subphase, ist es möglich, Rückschlüsse über die Art und die Stärke der Wechselwirkung zu ziehen.

2.5 Monofilmmuntersuchungen

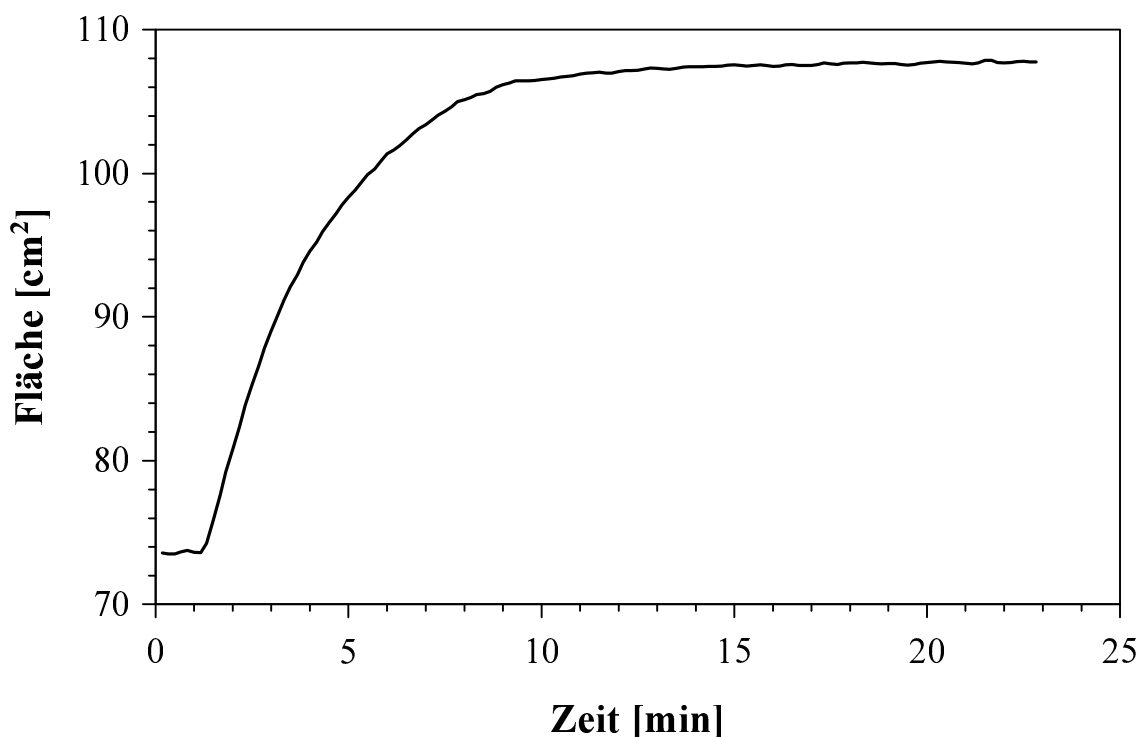


Abbildung 9 Flächenänderung eines ReLPS-Monofilms durch Einlagerung von Polymyxin B ($c = 5 \mu\text{mol/l}$) aus der Subphase ($T = 21^\circ\text{C}$, $\pi = 30 \text{ mN/m}$).

Wird keine Änderung der Monofilmmflächen festgestellt, kann eine Wechselwirkung zwischen der in der Subphase gelösten Substanz und dem Monofilm nicht ausgeschlossen werden. Eine *Anlagerung* an einen Monofilm kann bei einer solchen Messung nicht detektiert werden. Dennoch kann anhand der Ergebnisse zweifelsfrei entschieden werden, ob die untersuchte Substanz in der Lage ist, aktiv in einen Monofilm zu penetrieren.

Eine weitere Möglichkeit die Affinität zwischen einer Monoschicht und Substanzen zu untersuchen besteht darin, einen Monofilm, in dem eine Substanz **A** eingelagert worden ist, in Kontakt mit einer Subphase zu bringen, in der eine zweite Substanz **B** gelöst ist. Ist die Affinität von **B** größer als von **A**, dann verdrängt **B** die Substanz **A** aus dem Monofilm, was zu einer Änderung der Gesamtfläche führen kann. Ist keine Änderung der Monofilmmfläche festzustellen, so ist die Affinität der in der Subphase gelösten Substanz **B** kleiner als von Substanz **A**.

2.6 Biophysikalische Methoden

Neben den bisher beschriebenen Methoden wurden weitere biophysikalische Untersuchungen (*DSC*, *ITC*, *Elektronenmikroskopie*) im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Frank und Dr. Jaeger vom Fritz-Haber Institut in Berlin, sowie Experimente zur dynamischen Lichtstreuung in Zusammenarbeit mit Dipl. chem. J. Schüler, Institut für Kristallographie der FU Berlin, durchgeführt. Die Grundlagen der im Rahmen dieser Kooperationen verwendeten Methoden sind in der Literatur ausführlich beschrieben und werden im folgenden nur kurz dargestellt [55].

2.6.1 Kalorimetrische Messungen

Kalorimetrische Untersuchungen ermöglichen das direkte Messen von physikalischen Größen aufgrund der Wärmetönung einer Reaktion [46,55,69,70]. Dabei spielt es keine Rolle, ob es sich um eine chemische Reaktion oder einen physikalischen Absorptionsprozess handelt. Durch die Weiterentwicklung der zugrunde liegenden Technologie ist man heutzutage in der Lage, Energien im Bereich von $\leq 1,3 \mu\text{J}$ zu messen [71]. Dadurch sind auch Messungen mit sehr kleine Substanzmengen möglich. Zur Analyse der Wechselwirkung von Polymyxin B mit ReLPS wurden zwei unterschiedliche Methoden eingesetzt.

2.6.1.1 Differentielle Messung der Wärmetönung (DSC)

DSC-Messungen werden bei Lipidsystemen angewendet, um die Enthalpie von Phasenübergängen, z.B. des Übergangs von der L_α - in die L_β -Phase eines Lipides, zu bestimmen. Dazu werden zunächst zwei identische Zellen mit jeweils gleichem Volumen befüllt. Die Probenzelle wird mit einer Lipidlösung bekannter Konzentration versehen, während in die Referenzzelle eine identische Lösung ohne Lipid eingefüllt wird. Beide Zellen sind thermisch von der Umgebung isoliert und werden während des gesamten Experimentes kontinuierlich gerührt. Man heizt beide Zellen mit einem frei zu wählenden Temperaturgradienten auf. Kommt es zu einem Temperaturunterschied zwischen der Proben- und der Referenzzelle, dann wird dieser Unterschied durch Aufheizen der Probenzelle ausgeglichen und die dafür notwendige Energie aufgezeichnet. Als Ergebnis erhält man einen Energieverlauf als Funktion der Temperatur. Da das Zellvolumen, die Stoff- und die Energiemenge bekannt sind, kann die molare Phasenumwandlungsenthalpie des Lipides bestimmt werden.

2.6 Biophysikalische Methoden

Durch Veränderung des pH-Wertes, der Ionenkonzentration der Lipidlösung oder Zugabe anderer Substanzen kann der Einfluß dieser Parameter auf den Phasenübergang des Lipides untersucht werden.

2.6.1.2 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Die Titrationskalorimetrie gewinnt in Hinblick auf biologische Fragestellungen zunehmend an Bedeutung [70]. In eine Reaktionszelle bekannten Volumens, die thermisch vollständig von der Umgebung entkoppelt ist, wird entweder eine Lipid- oder aber eine Peptidlösung bekannter Konzentration vorgelegt. Mittels einer Hamiltonspritze werden definierte Mengen der jeweils anderen Substanz in die Reaktionszelle injiziert. Während der gesamten Messung wird die Flüssigkeit in der Reaktionszelle kräftig gerührt, um ein schnelles und vollständiges durchmischen beider Lösungen nach der Injektion zu gewährleisten. Bei jeder Injektion wird die freigesetzte Wärmemenge der Reaktion gemessen, während die Temperatur der Reaktionszelle konstant (isotherm) gehalten wird. Bevor die nächste Injektion erfolgt, wird solange gewartet, bis die Lösung in der Zelle sich äquilibriert hat, d.h. keine Wärmetönung mehr festzustellen ist. Wenn bei mehreren Injektionen keine Wärmefreisetzung gemessen werden kann, gilt die Reaktion als abgeschlossen. Aus den so erhaltenen Titrationskurven können die Bindungskonstante K , die Reaktionsenthalpie ΔH und die Stöchiometrie n des Bindungsprozesses durch einen nichtlinearen Fit der folgenden Formel ermittelt werden,

$$Q_i = n M_t \Delta H_b V \left(\frac{\left(1 + \frac{X_t}{n M_t} + \frac{1}{n K M_t} \right) - \sqrt{\left(1 + \frac{X_t}{n M_t} + \frac{1}{n K M_t} \right)^2 - \frac{4 X_t}{n M_t}}}{2} \right),$$

wobei n die Anzahl an Bindungsstellen, M_t die gesamte ReLPS Menge, V das Zellvolumen, K die Bindungskonstante und ΔH_b die Bindungsenthalpie sind. Anhand dieser Formel kann die vollständige Wärmemenge Q_i durch die bis zu diesem Zeitpunkt verbrauchte Menge der titrierten Substanz X_t näherungsweise berechnet werden. Für die bei der Titration gemessene Differenz der Wärmemenge $\Delta Q_i = Q_i - Q_{i-1}$ gilt:

$$\Delta Q_i = Q_i + \frac{1}{2} \left(\frac{dV_i}{2V} \right) (Q_{i-1} + Q_{i+1}) - Q_{i-1}$$

wobei dV_i das bis zu diesem Zeitpunkt zugegebene Volumen der Titrationslösung ist.

2.6.2 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von eingefrorenen Lipidaggregaten

Die Auflösung eines Mikroskops ist an die Wellenlänge der verwendeten Strahlung gekoppelt und beträgt ca. $\lambda/2$. Durch die Verwendung von Elektronenstrahlen ist man daher in der Lage, eine Auflösung im Bereich atomarer Größenordnungen zu erzielen. Das am Fritz-Haber Institut (Berlin) entwickelte Gerät vom Typ DEECO 250 erreicht eine Auflösung von $< 1\text{-}2$ nm, die nur knapp über einer atomaren Auflösung liegt und es daher ermöglicht, strukturelle Details von Lipidaggregaten zu untersuchen [72].

Da die Beweglichkeit von Molekülen, bzw. von Molekülaggregaten in Lösungen viel zu groß ist, um eine detaillierte Abbildung in einem Elektronenmikroskop zu erhalten, müssen die zu untersuchenden Aggregate fixiert werden. Dazu wird ein Tropfen einer Lipidlösung auf ein spezielles Kupfergrid gegeben, das dann über einen Federmechanismus in flüssiges Propan geschossen wird. Aufgrund der sehr schnellen Abkühlung der Probe ($\ll 2\text{-}5$ ms) werden die Lipidaggregate in dem Zustand eingefroren, den sie nach der Präparation eingenommen haben. Sehr wichtig ist es bei der Präparation eine Kristallisation des als Lösungsmittel eingesetzten Wassers zu vermeiden, da ansonsten die zu untersuchenden Aggregate zerstört werden. Die so erhaltenen Proben werden anschließend im tiefgefrorenen Zustand im Elektronenmikroskop untersucht. Dieses Verfahren wird auch als Cryo-Elektronenmikroskopie (**cryo-electron-microscopy** CEM) bezeichnet.

2.6.3 Lichtstreuung an Lipidvesikeln

Eine Vielzahl von Eigenschaften von Makromolekülen oder Molekülaggregaten kann durch Lichtstreuexperimente an Lösungen der betreffenden Substanzen untersucht werden. Neben Diffusions-Konstanten können unter anderem auch die räumlichen Dimensionen von Makromolekülen bestimmt werden [55].

2.6 Biophysikalische Methoden

Zur Messung wird der Lichtstrahl eines Lasers (Wellenlänge λ , Intensität I_0) auf eine Streuzelle fokussiert. Mit einem Photomultiplier, der um die Probenzelle bewegt werden kann, wird die Streustrahlung I_Θ gemessen. Der beobachtete Effekt beruht auf einer elastischen Lichtstreuung an den Molekülen. Man unterscheidet dabei - bezogen auf die Lichtwellenlänge (λ) Moleküle, wenn sie kleiner als $\lambda / 20$ der verwendeten Wellenlänge sind - von größeren Molekülen, die in etwa eine Größe von $\lambda / 20 \sim 25$ nm aufweisen. Die Änderung in der Streuintensität beschreibt eine Funktion $P(\Theta)$. Sie gibt das Verhältnis der gemessenen Intensität bei einem Winkel Θ und jener Intensität an, die man beobachten würde, wenn das Molekül bezogen auf die Wellenlänge sehr klein wäre:

$$P(\Theta) = \frac{\text{Streuintensität des großen Teilchens}}{\text{Streuintensität ohne Interferenzeffekt}} .$$

Die genaue Herleitung von $P(\Theta)$ ist in der Literatur beschrieben [75], als Ergebnis erhält man:

$$P(\Theta) = \frac{1}{N^2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{\sin mR_{ij}}{mR_{ij}} \quad \text{mit} \quad m = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\Theta}{2} ,$$

wobei N die Anzahl der streuenden Teilchen und R_{ij} der Abstand zweier Streuzentren i und j in einem Molekül sind. Die Winkelabhängigkeit der Streuintensität liefert letztendlich den Gyrationradius der Moleküle, bzw. der untersuchten Aggregate. Allerdings muß bei der Umrechnung der Meßdaten die Form der Teilchen berücksichtigt werden, um einen korrekten Wert für den Gyrationradius zu erhalten.

2.7 Molekül-Dynamik (MD) Simulation

Die computergestützte Molekül-Dynamik Simulation ist in den letzten Jahren zur Beschreibung relativ großer Systeme (bis zu mehreren tausend Atomen) erfolgreich eingesetzt worden [76, 77, 78, 79, 80, 81]. Im folgenden soll keine Einführung in Simulationsrechnungen oder die zugrunde liegenden theoretischen Ansätze erfolgen, sondern lediglich die Parameter und Verfahren kurz skizziert werden, die zum Verständnis der MD-Simulationsrechnungen dieser Arbeit unerlässlich sind. Grundlagen zur MD-Simulation können verschiedenen Publikationen entnommen werden [82, 83, 84]

Kapitel 2 Theoretische Grundlagen

Im Gegensatz zu den quantenchemischen Verfahren, die nach wie vor nur sinnvoll zur Berechnung kleinerer Systeme herangezogen werden können, ist es mit Hilfe der klassischen Mechanik und mit einfachen Potentialfunktionen möglich, interatomare Wechselwirkungen in sehr großen Molekülverbänden zu berechnen, ohne auf atomare Details zu verzichten. Im Rahmen einer Molekül-Dynamik (MD)-Simulation wird eine Trajektorie des untersuchten Molekülverbandes berechnet, in der die Koordinaten aller Atome zu jedem Zeitpunkt der Simulation abgespeichert werden. Dazu werden die Newton'sche Bewegungsgleichungen für alle in der Simulation berücksichtigten Atome numerisch gelöst. Die hierzu verwendeten Algorithmen sollen möglichst einfach aufgebaut sein und gleichzeitig eine gute Energie-stabilität aufweisen. Letzteres wird durch die Größe des verwendeten Zeitintervalls, die typischer Weise im Bereich von 1 fs liegt, gesteuert. Aufgrund praktischer Überlegungen - die Datenmenge wäre ansonsten nicht zu bearbeiten - reduziert man die Ausgabe, je nach Systemgröße und Simulationsdauer, auf jeden 25. bis 100. Zeitschritt (d.h. alle 0,025-0,1 ps).

2.7.1 CharmM Kraftfeld

Das CharmM Kraftfeld wurde von Karplus und Mitarbeitern 1983 entwickelt und kontinuierlich verbessert sowie mit neuen Parametern erweitert [85, 86, 87]. Aufgrund der speziell für Phospholipide entwickelten Potentialparameter und der freien Zugänglichkeit des Programmcodes ist dieses Kraftfeld sehr gut für die Simulation komplexer Lipide geeignet.

Die berechnete Energie (E_{tot}) setzt sich bei CharmM, wie bei den meisten Kraftfeldern, aus zwei Anteilen zusammen, zum einen aus den *intermolekularen* (E_{inter})- und zum anderen aus den *intramolekularen* (E_{intra}) Wechselwirkungen. Während der intermolekulare Teil aus einem Coulomb (E_{EI})- und einem Lennard-Jones-Anteil (E_{NB}) besteht, umfaßt der intramolekulare Anteil alle sterischen und konformationellen Anteile des jeweiligen Moleküls. Für eine detaillierte Darstellung der einzelnen Terme und die Ermittlung der dazugehörigen Kraftfeldparameter sei auf die einschlägige Literatur verwiesen [85, 86, 87].

Ein wichtiger Aspekt bei allen Berechnungen mit einem Kraftfeld spielt die Bestimmung der intermolekularen Wechselwirkungen. Eine Berücksichtigung der Wechselwirkungen zwischen allen Atomen würde schon bei 10000 Atomen die Berechnung von ca. 100 Mio. Wechselwirkungen erfordern. Um dennoch größere Systeme handhaben zu können, macht man sich den Umstand zu nutze, daß die potentielle Energie zwischen zwei

2.7 Molekül-Dynamik (MD) Simulation

Teilchen mit zunehmendem Abstand asymptotisch gegen Null konvergiert. Definiert man einen Radius, von dem an die Wechselwirkungen nicht mehr berücksichtigt werden, so reduziert sich der Rechenaufwand ganz erheblich. Die Wahl dieses sogenannten »Cutoff«-Radius ist nicht pauschal möglich, sondern ist stark vom jeweiligen System und den darin vorkommenden Atomgruppen abhängig [82, 88].

Eine weitere Möglichkeit, die Anzahl an Wechselwirkungen und damit den Rechenzeitbedarf zu minimieren, besteht darin, bestimmte Atomgruppen, wie zum Beispiel eine $-\text{CH}_2$ -Gruppe, in der Berechnung der Wechselwirkung wie ein einzelnes Atom zu behandeln. Durch diese als »united atom«-Verfahren bezeichnete Näherung, wird die Anzahl an Wechselwirkungen durch die viel kleinere Anzahl an »united atoms« erheblich reduziert. Im Bereich der Lipide, deren Fettsäureketten für solche Substitutionen eigentlich prädestiniert wären, hat sich diese Vereinfachung allerdings für das CharmM-Kraftfeld nicht bewährt. In Voruntersuchungen an Diphosphatidylthanolamin-Monoschichten hat sich gezeigt, daß der im CharmM gewählte »united atom«-Ansatz im direkten Vergleich zu einer Simulation, die alle Atome explizit berücksichtigt, zu einer dramatisch gesteigerten Beweglichkeit im Fettsäurebereich führt. Daher sind in dieser Arbeit für Simulationsrechnungen immer alle Atome explizit einbezogen worden.

2.7.2 Randbedingungen der verschiedenen Simulationen

Bis auf wenige Ausnahmen, z.B. die Simulation eines einzelnen Moleküls im Vakuum, ist es notwendig, Randbedingungen des Ensembles in der Simulationsrechnung zu berücksichtigen. Da man immer nur eine beschränkte Anzahl von Molekülen bzw. von Atomen in eine Simulationsrechnung einbeziehen kann, stellt das zu untersuchende System einen kleinen Ausschnitt des Gesamtsystems dar. Anstelle einer vollständigen Membran, die aufgrund technischer Limitationen nicht simuliert werden kann, wurde in dieser Arbeit in den Simulationen ein Ausschnitt von $2 * 2$ oder $4 * 4$ ReLPS-Molekülen verwendet. Aus dieser Beschränkung auf wenige Moleküle resultiert unmittelbar das Problem, wie mit den äußeren Bereichen zu verfahren ist, um Randeffekte zu vermeiden, da dieser Membranausschnitt während der Simulationsrechnung in allen drei Raumrichtungen von Vakuum umgeben ist

Kapitel 2 Theoretische Grundlagen

und nicht von gleichartigen Molekülen, wie es beispielsweise in einem Monoschichtexperiment der Fall ist. Ohne zusätzliche Randbedingungen hätte man somit per se ein artifizielles System.

Dieses Problem läßt sich durch die Verwendung von sogenannten *periodischen Randbedingungen* vermeiden. Der zugrunde liegende Ansatz besteht darin, den zu simulierenden Ausschnitt eines Systems bei jedem Rechenschritt mit einem Satz von Kopien der Moleküle zu umgeben. Die Kopien werden jeweils, wie in Abbildung 10 gezeigt, um die Länge einer Achse des Systems verschoben. Damit wird das eigentliche Simulationsensemble in ein quasi randloses Gesamtsystem eingebettet. Um dieses Verfahren erfolgreich einsetzen zu können, muß allerdings sichergestellt werden, daß das untersuchte System so groß gewählt wird, daß es nicht zu gekoppelten Bewegungen innerhalb des Systems kommt. Der einfachste Fall einer gekoppelten Bewegung kann am Beispiel der Simulation einer einzelnen Fettsäure veranschaulicht werden. Bei zweidimensionalen periodischen Randbedingungen ist diese Fettsäure von neun Kopien umgeben. Schwingt die Fettsäurekette zufällig in eine Richtung, dann kommt es nicht zu einer Dämpfung der Bewegung, da die umgebenden Moleküle immer nur Kopien des zentralen Moleküls sind und somit die gleiche Konformation aufweisen.

Eine Dämpfung der Bewegung eines einzelnen Moleküls durch die umgebenden Moleküle findet nur dann statt, wenn die umgebenden Moleküle sich *nicht* synchron bewegen. Die Anzahl an Molekülen, aus der ein System aufgebaut werden muß, um eine unabhängige Bewegung der Einzelmoleküle zu erreichen, läßt sich nur durch Proberechnungen ermitteln.

Ein Nachteil der periodischen Randbedingungen besteht darin, daß die Liste der Wechselwirkungen bei jedem Simulationsschritt, auch die das Simulationsensemble umgebenden Kopien mit einbeziehen muß, so daß die Anzahl der zu berücksichtigenden Wechselwirkungen und damit der Rechenaufwand erheblich ansteigt.

Eine zweite sehr häufig eingesetzte Methode wird als Ergänzung oder auch als Alternative zu den periodischen Randbedingungen eingesetzt. Bei dieser Methode der *fixierten Atome* wird zunächst ein größeres Segment von Molekülen erzeugt. Anstelle eines 3×3 Moleküle umfassenden Membransegmentes, wird ein aus z.B. 5×5 Molekülen bestehendes Ensemble generiert. Von diesem Segment werden jetzt alle am äußeren Rand befindlichen Moleküle (oder auch nur Teile davon) räumlich fixiert, wie in Abbildung 11 dargestellt.

2.7 Molekül-Dynamik (MD) Simulation

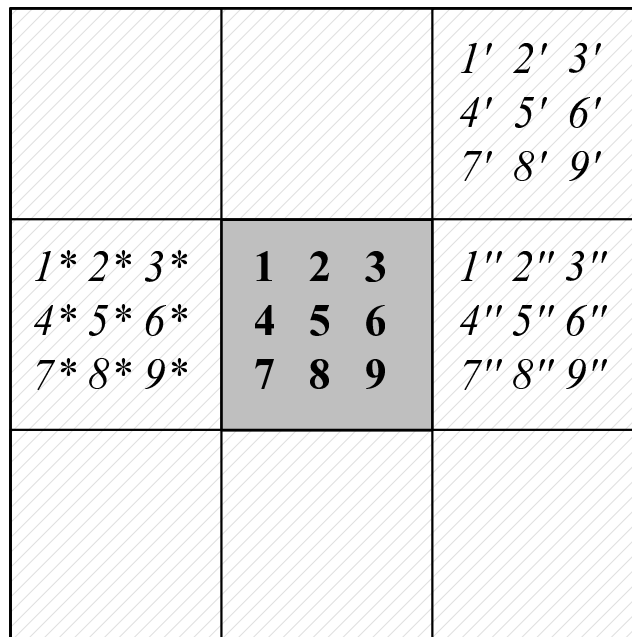


Abbildung 10 Prinzip der periodischen Randbedingungen. Die zentral angeordneten Moleküle 1-9 (grau hinterlegt) sind im gezeigten zweidimensionalen Fall von acht Kopien umgeben. Analog lassen sich auch ein- (aus 2 Kopien) und dreidimensionale (bestehend aus 27 Kopien) periodische Randbedingungen definieren.

Nach umfangreichen Voruntersuchungen wurden für alle Rechnungen in dieser Arbeit zweidimensionale periodische Randbedingungen verwendet, da schon bei sehr kleinen Systemen ($2 * 2$) eine entkoppelte Bewegung der ReLPS-Moleküle zu beobachten ist.

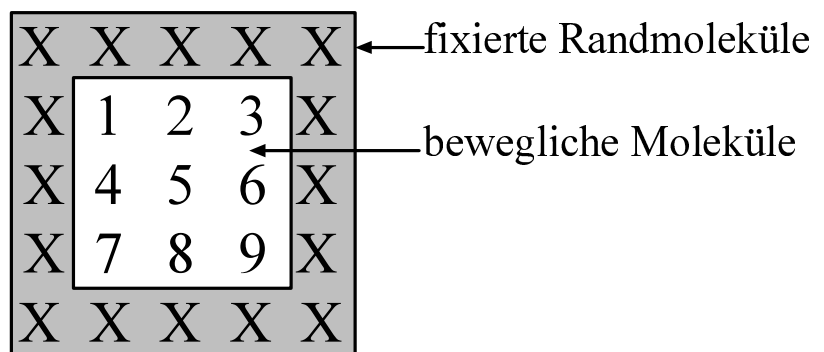


Abbildung 11 Randbedingungen für den Fall der fixierten Atome. Die frei beweglichen Moleküle im Zentrum werden von einem Rand aus fixierten Molekülen umgeben.

Kapitel 2 Theoretische Grundlagen

Wenn Wasser explizit in die Simulation mit einbezogen wird, müssen weitere Randbedingungen definiert werden, um eine Diffusion der Wassermoleküle in das Vakuum zu verhindern. Dazu wird eine Variante der in Abbildung 11 gezeigten Randbedingungen verwendet. Zunächst wird eine Wasserbox mit einer - bezogen auf die Lipidpackung - identischen Grundfläche und einer Höhe von ca. 6 nm generiert. Diese Wasserbox wurde soweit mit der Lipidpackung überlagert, daß alle Zuckermoleküle der LPS-Packung sich mit der Wasserbox überlagerten. Da bei diesem Verfahren der Solvatisierung sich prinzipiell immer Wassermoleküle mit einzelnen Atomen der Lipidmoleküle räumlich überschneiden, werden alle Wassermoleküle, die bei der Überlagerung der Wasserbox mit der Lipidschicht dichter als 0,25 nm an einem Nicht-Wasserstoffatom plaziert worden sind, aus der Wasserbox eliminiert. Anschließend wird eine zusätzliche Wasserschicht hinzugefügt (Dicke $\sim 0,6$ nm), wie in Abbildung 12 dargestellt. Die Position der Atome in dieser zweiten Wasserbox wird während der Simulation fixiert, so daß eine Diffusion der freien Wassermoleküle durch diese Schicht in das Vakuum nicht möglich ist.

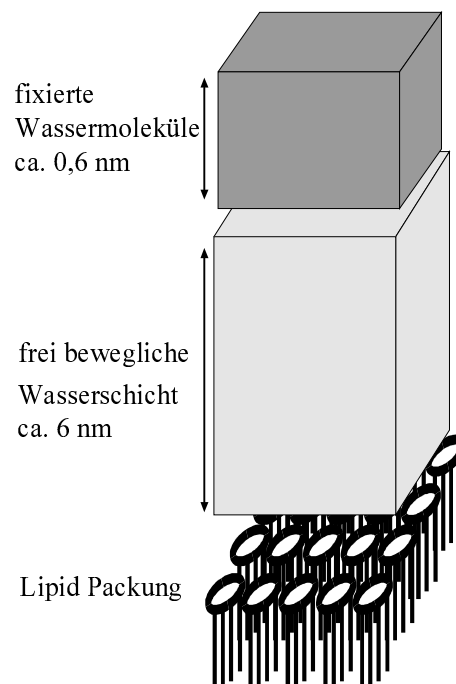


Abbildung 12 Schematischer Aufbau einer hydratisierten Lipidmonoschicht. Eine Schicht aus freiem Wasser ist zwischen der Lipidschicht und einer zweiten Schicht aus Wassermolekülen eingeschlossen.

2.7 Molekül-Dynamik (MD) Simulation

2.7.3 Verlauf einer MD-Simulation

Eine Simulationsrechnung setzt sich in der Regel aus drei Abschnitten zusammen. Zunächst wird das zu untersuchende System in 10-25 ps (1000-2500 Einzelschritte) von 0 K auf die jeweilige Simulationstemperatur aufgeheizt. Es schließt sich eine Äquilibrierungsphase an, in der sich die beim Aufheizen zugeführte Energie gleichmäßig im System verteilen soll (15-30 ps). Erst nach dieser Äquilibrierung beginnt der eigentliche Produktionsprozeß, der die auszuwertenden Trajektorie erzeugt. Die Zeitspanne der Produktionsphase ist von verschiedenen Aspekten abhängig. Der dominierende Faktor ist die Atomanzahl des Systems und die verwendeten Randbedingungen (s. 2.7.2.), da diese beiden Parameter sich direkt auf die Rechenzeit auswirken, die benötigt wird, um nach jedem Zeitschritt die Energie des Systems und die Koordinaten neu zu berechnen.

Die Simulationstemperatur spielt ebenfalls eine sehr wichtige Rolle. Durch erhöhte Simulationstemperaturen wird dem System mehr Energie zugeführt, so daß Systemveränderungen schneller erfolgen als bei niedrigeren Temperaturen. Ebenfalls von Bedeutung für die zu simulierende Zeitspanne ist die jeweilige Fragestellung, die untersucht wird. Während einfache konformationelle Änderungen eines einzelnen Moleküls häufig nur einige Picosekunden benötigen, sind für größere Veränderungen, z.B. das Entfalten eines Proteins oder Diffusionsstudien Simulationszeiträume von einigen hundert Picosekunden zu veranschlagen.

2.7.4 Auswertung von MD-Trajektorien

In den vorangegangenen Kapiteln wurden die Grundlagen und der Ablauf einer Molekül-Dynamik-Simulation kurz skizziert. Anhand der Trajektorie können viele Parameter berechnet werden. Zwei Parametern haben sich als besonders aussagekräftig im Bezug auf die Fragestellung dieser Arbeit erwiesen.

2.7.4.1 Ordnungsparameter von Fettsäureketten

Zum einen handelt es sich dabei um den Ordnungsparameter S und den Tiltwinkel der Fettsäureketten der einzelnen Moleküle. In Abbildung 13 ist anhand eines Ausschnitts einer Fettsäurekette dargestellt, wie beide Parameter ermittelt werden. Der Ordnungsparameter S beschreibt die mittlere Orientierung einer *einzelnen* CH₂-Gruppe bezogen auf die Membran-

Kapitel 2 Theoretische Grundlagen

normale [89, 90, 91]. Zur Bestimmung des Wertes am Kohlenstoffatom i der Fettsäurekette wird der Winkel zwischen der Membrannormalen und dem Normalenvektor der aus den drei Atomen der CH_2 -Gruppe gebildeten Ebene ermittelt:

$$S_i = 0,5 * \langle 3 * \cos^2\Theta_i - 1 \rangle .$$

Die eckigen Klammern stehen für eine zeitliche Mittelung des Ordnungsparameters. Der Ordnungsparameter kann experimentell durch NMR-, IR- und ESR-Messungen ermittelt werden, wobei sich allerdings je nach Methode die gemessenen Werte zum Teil erheblich unterscheiden [55]. In der Literatur wird häufig eine andere Darstellung des Ordnungsparameters gewählt,

$$S_{CD,i} = -0,5 * S_i .$$

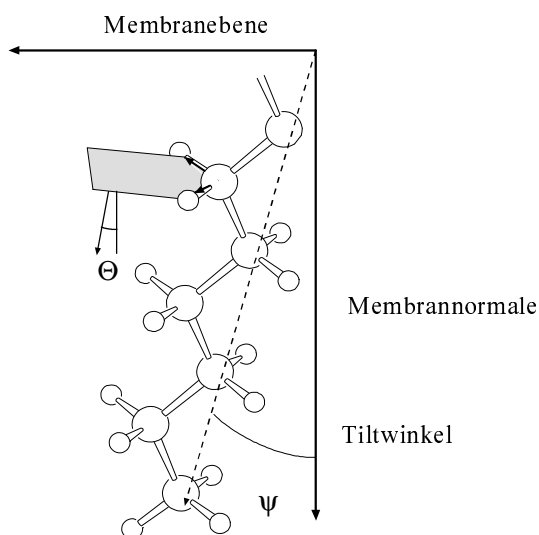


Abbildung 13 Schematische Darstellung zur Ermittlung des Ordnungsparameters S und des Tiltwinkels an einem Ausschnitt einer Fettsäurekette.

Bei $S_{CD} = 0$ ist das System völlig ungeordnet, während bei $S_{CD} = -0,5$ eine all-trans Konformation der Fettsäurekette parallel zur Membrannormalen vorliegt.

Der Tiltwinkel liefert im Gegensatz zum Ordnungsparameter eine allgemeine Aussage zur Lage einer Fettsäurekette in einer Membran. Der Tiltwinkel wurde anhand des Winkels zwischen der Membrannormalen und einem Vektor gebildet, der aus dem ersten und dem letzten Atom einer Fettsäurekette ermittelt wurde.

2.7 Molekül-Dynamik (MD) Simulation

2.7.4.2 Zeitlicher Verlauf der Abstandsverteilung eines Atoms

Um die Beweglichkeit der Lipidmoleküle in einer Membran zu analysieren, wurden Konturplots der Abstandsverteilung eines einzelnen Atoms ausgewertet. Der häufig verwendete RMS-Wert (**r**oot **m**ean square displacement) liefert nur eine allgemeine Aussage über die Größe der Veränderung einer Atomposition. Zur Beurteilung von Veränderungen in einem periodisch aufgebauten System ist diese Größe nicht sehr aussagekräftig, da ein Vergleich des RMS-Wertes von identischen Atomen an verschiedenen Molekülen keine Aussagen über die Beweglichkeit oder die Stabilität eines Systems während der Simulation liefert.

Nach der Generierung einer Monoschicht aus einem einzigen Molekültyp besteht ein durch die Packungsvektoren definierter Abstand zwischen identischen Atomen der Moleküle einer Packung. Werden periodische Randbedingungen verwendet, gilt dieser Zusammenhang ebenso für die einzelnen Kopien. Betrachtet man statt der mittleren Abweichung eines einzelnen Atoms von seiner Ursprungslage die Veränderung der Abstände eines Atoms zu allen identischen Atomen anderer Moleküle, wie in Abbildung 14 schematisch skizziert, so erhält man eine Reihe von Abständen. Zu Beginn der Simulation sind die Abstände zu äquivalenten Nachbarn für jedes Atom identische. Während der Simulation führt jede Bewegung eines Atoms zu einer Veränderung der Abstände zu allen anderen Atomen. Dieser Effekt wird dadurch verstärkt, daß sich alle Atome in der Regel völlig unabhängig voneinander bewegen. Dadurch verändert sich der beobachtete Abstand wesentlich stärker, das System reagiert demnach wesentlich sensibler auf Veränderungen der Atompositionen, als es bei der Betrachtung des RMS-Wert der Fall ist.

Kapitel 2 Theoretische Grundlagen

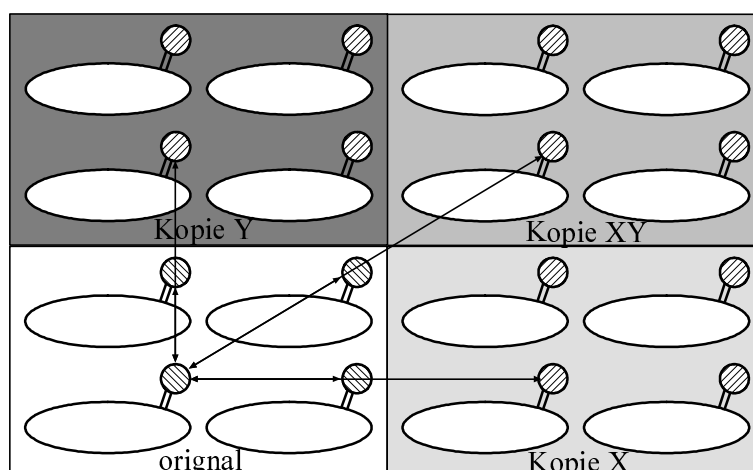


Abbildung 14 Berechnung der Abstandsverteilung in einer Monoschicht. Der schraffierte Kreis symbolisiert ein beliebiges Atom des Moleküls, aus dem die Packung aufgebaut worden ist. In der Zeichnung sind nur einige Abstände zu identischen Atomen anderer Moleküle exemplarisch eingezeichnet.

Trägt man die Anzahl aller beobachteten Abstände als Funktion der Zeit auf, so erhält man bei sehr kleinen Bewegungen der Atome ein Diagramm mit einigen schmalen Bändern, die charakteristischen Abständen der Molekülpackung entsprechen. Je stärker die Bewegung der einzelnen Atome ist, desto breiter werden die Bänder im Konturplot. Rückschlüsse über Veränderungen der Packungen sind aufgrund der Lage und dem Verlauf von einzelnen Bänder während der Simulation möglich. Aus Symmetriegründen dürfen bei der Auswertung von zweidimensionalen Systemen nur drei der acht Kopien berücksichtigt werden, da ansonsten bestimmte Abstände überproportional häufig vertreten sind.

Man erhält aus der Auftragung der Abstandsverteilung als Funktion der Zeit nicht nur eine Aussage über die relative Beweglichkeit eines einzelnen Atoms, wie beim RMS-Wert, sondern auch über die relative Lage dieses Atoms - und damit des Moleküls - zu den entsprechenden Atomen (Molekülen) der anderen Lipide einer Packung. Dadurch können in vielen Fällen sehr schnell positionelle Veränderungen einzelner Moleküle, aber auch der gesamten Packungsanordnung analysiert werden.