

## 2 Grundlagen

*Dieses Kapitel ist in zwei Abschnitte gegliedert: Der erste Teil enthält Informationen zur Herkunft, Struktur und Wirkung der bakteriellen Lipopolysaccharide. Im zweiten Teil werden die Grundlagen des Verfahrens der Molekulardynamik-Simulation erläutert.*

### **2.1 Gram-negative Bakterien und ihre Lipopolysaccharide (LPS)**

Die ersten Berichte über die Beobachtung von Bakterien gehen auf A. van Leeuwenhoek zurück, der 1683 mit dem Lichtmikroskop Mikroorganismen im Zahnbelag untersuchte. Mit der Züchtung des Milzbranderreger 1876 durch R. Koch begann die Epoche der medizinischen Bakteriologie. Nachdem zunächst hitzelabile Giftstoffe entdeckt worden waren, die von Bakterien nach außen abgegeben werden und die man deshalb als Exotoxine bezeichnet, stellten R. Pfeiffer und E. Centanni 1892 unabhängig voneinander fest, daß hitzestabile bakterielle Extrakte bei Versuchstieren Fieber und Schockzustände hervorrufen (Pfeiffer, 1892). Pfeiffer bezeichnete seine Entdeckung als Endotoxin, da er vermutete, daß sich das giftige Produkt innerhalb der Bakterienzelle befand, während Centanni bei der Namensgebung auf den pyrogenen (Fieber-auslösenden) Effekt Bezug nahm und von Pirotaxinen sprach. Wie heute bekannt ist, handelt es sich bei beiden Substanzen um das bakterielle Lipopolysaccharid Gram-negativer Bakterien. Die Bezeichnung Lipopolysaccharid geht auf die Arbeiten von M.J. Shear zurück, der 1943 ein tumorzerstörendes und toxisches Material aus Gram-negativen Bakterien analysierte und zwei Hauptkomponenten, Lipid und Polysaccharid, isolieren konnte.

Das 'Endotoxische Prinzip' des LPS liegt in der Lipid A-Komponente, wie O. Westphal und O. Lüderitz in den 50er Jahren dieses Jahrhunderts nachweisen konnten, nachdem sie in der Lage waren, in größeren Mengen reines LPS ohne Proteinkontaminationen herzustellen.

Gleichzeitig begann die Untersuchung von mutierten Bakterien, die Defekte in den Genen der LPS-Synthese aufwiesen, so daß die Synthese des Polysaccharid-Anteils des LPS gestört war. Solche Mutanten haben gegenüber dem Wildtyp eine veränderte Morphologie und produzieren ein strukturell homogeneres LPS, wodurch die Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehungen erheblich erleichtert wurde.

1985 wurde schließlich durch die Synthese des Lipid A von *E. coli* (Imoto et al., 1985b) bewiesen, daß die bis dahin von Rietschel und anderen gewonnenen Erkenntnisse zur Struktur dieser LPS-Komponente richtig waren (Rietschel et al., 1994).

Seitdem ist eine Vielzahl von LPS-Strukturen bestimmt und publiziert worden (eine Übersicht gibt Wilkinson, 1996), darunter auch solche mit geringer Endotoxizität bzw. mit antagonistischen Eigenschaften (Holst, 1995). Die Geschichte der Endotoxin-Forschung kann bei Westphal (1993) nachgelesen werden.

### 2.1.1 *Escherichia* und *Chlamydia*: Zwei Gattungen Gram-negativer Bakterien

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene LPS-Strukturen untersucht, die für eine Bakterien-Gattung (*Chlamydia*) bzw. für bestimmte Mutanten (Re, Rc) einer Bakterien-Spezies (*E. coli*) typisch sind.

Zur Orientierung wird im folgenden kurz die taxonomische Einordnung dieser Gram-negativen Bakterien vorgestellt, wie sie das Standardwerk *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* vornimmt. Die Taxonomie stellt ein hierarchisches System zur Beschreibung und Ordnung der Lebewesen dar. In absteigender Hierarchiefolge unterscheidet man folgende Kategorien: Reich, Division, Klasse, Ordnung, Familie, Gattung (Genus) und Art (Spezies). Zusätzlich gibt es noch eine Einteilung von Bakterien-Arten bzw. -Stämmen in Varietäten (Typen). Erfolgt diese Einteilung aufgrund antigener Eigenschaften spricht man von Serotypen (Serovaren), wird nach chemischer Zusammensetzung differenziert, handelt es sich um Chemotypen (Chemovare) (Staley & Krieg, 1984; Brandis & Schaal, 1988).

Die Bakterien gehören zum Reich der Prokaryonten. Die Division der Gracilicutes (Gram-negativen Bakterien) beinhaltet die Klasse der Scotobakterien, d.h. der Bakterien, die keine Photosynthese betreiben (Murray, 1984a, 1984b). Angehörige dieser Klasse sind unter anderem die Familien Enterobacteriaceae und Chlamydiaceae. Zur Familie der Enterobakterien gehört die Gattung *Escherichia*, deren bekanntester Vertreter die Spezies *Escherichia coli* ist. Die Familie der Chlamydiaceae besteht aus nur einer Gattung, *Chlamydia*, zu der die Spezies *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* und *C. psittaci* gehören (Moulder, 1984).

#### 2.1.1.1 *Escherichia coli*

Die Gattung *Escherichia* gehört zu den freilebenden, fakultativ anaeroben stäbchenförmigen Bakterien (Brandis & Schaal, 1988). Der Name der Gattung nimmt Bezug auf den Wiener Kinderarzt Theodor Escherich (1857-1911). *E. coli* gilt als 'Haustier' der Biochemie und Molekularbiologie, kürzlich wurde die komplette Gen-Sequenz von *E. coli* K-12 veröffentlicht (Blattner et al., 1997). Die Abmessungen der Bakterien liegen zwischen 1,1  $\times$  2,0  $\mu\text{m}^2$  und

1,5 - 6,0  $\mu\text{m}^2$ . Die Spezies *E. coli* kommt ubiquitär in Boden, Wasser und Stuhl vor; ihr Auftreten im Wasser wird als Kriterium für die Verschmutzung durch Fäkalien verwendet. Sie ist ein wichtiger Bestandteil der physiologischen Darmflora des Menschen, kann aber auch als Krankheitserreger auftreten. Aufgrund der serologischen Eigenschaften von O-Antigen, Kapsel (K) und H-Antigen (Flagellen) können mehrere hundert verschiedene Serotypen identifiziert werden; alleine für das O-Antigen sind mehr als 170 verschiedene Varianten bekannt (Ørskov, 1984).

In einer klinischen Bakteriämie-Studie wurde *E. coli* bei 50% der Infektionen, an denen Gram-negative Bakterien beteiligt waren, identifiziert (Hynninen et al., 1995); Enterobakterien werden für mehr als die Hälfte aller nosokomialen, d.h. im Krankenhaus erworbenen Infektionen verantwortlich gemacht. Als Quelle der Bakteriämie werden unter anderem der Übertritt von Bakterien aus dem Darm in den Blutstrom (Bahrami et al., 1995, Buttenschoen et al., 1996) sowie chirurgische Eingriffe, künstliche Beatmung und Verletzungen diskutiert (Vincent, 1996). Die LPS-Konzentration in den Faeces beträgt bei gesunden Personen etwa 1 mg/g (van Saene et al., 1996).

Neben der Sepsis verursacht *E. coli* vor allem bei Kleinkindern eine sehr ansteckende akute Darmentzündung (Coli-Enteritis).

#### **2.1.1.2 Chlamydia**

Chlamydien sind von ihrer Morphologie her den kokkoiden (kugelförmigen) Bakterien zuzuordnen. Sie sind sehr klein (0,2-1,5  $\mu\text{m}$  Durchmesser) und besitzen ein kleines Genom von nur ca.  $5 \cdot 10^8$  Dalton (Da) Masse (Moulder, 1984). Den verschiedenen *Chlamydia*-Arten ist ein Genus-spezifisches Epitop gemein. Es besteht aus einem LPS vom R-Typ mit einem charakteristischen Kernzuckerbereich aus Kdo (Caldwell & Hitchcock, 1984; Brade et al., 1987b); allerdings wurde kürzlich auch über das Auftreten eines LPS vom S-Typ berichtet (Lukáčová et al., 1994). Chlamydien sind obligat intrazelluläre Mikroorganismen (Parasiten) mit einer sehr weiten Verbreitung im gesamten Tierreich. Fast alle Vogelarten und viele Säugetierarten werden von *C. psittaci* befallen; der Mensch ist der bevorzugte Wirtsorganismus für *C. trachomatis*. Bei Arbeitern auf Geflügelfarmen wird auch die Infektion mit *C. psittaci* beobachtet (Schachter & Caldwell, 1980).

Die Infektion mit Chlamydien führt nach Anlagerung an Epithelzellen oder Makrophagen zur Aufnahme durch Phagozytose. Dieser Prozess wird von den Bakterien unterstützt. Durch die Oberflächenantigene der Bakterien wird die Verschmelzung von Phagosom und Lysosomen verzögert, so daß sich die Chlamydien im Phagosom vermehren können. Es kommt zur Umwandlung der zunächst gebildeten Elementarkörper (EB, Durchmesser ca. 350 nm) in die größeren Retikularkörper (RB, 800-1000 nm, Schachter & Caldwell, 1980). Schließlich werden 10 bis 1000 neue infektiöse Partikel in Form von Elementarkörpern freigesetzt, die weitere Zellen befallen können. In welchen Membranen (EB, RB, Plasmamembran) der infizierten Zellen sich das charakteristische LPS der Chlamydien mit Anti-LPS-Antikörpern elektronenmikroskopisch nachweisen läßt, ist umstritten (Karimi et al., 1989; Baumann et al., 1992; Salinas et al., 1994).

Beim Menschen ruft die Infektion mit *C. psittaci* Lungenentzündungen und systemische toxische Reaktionen hervor. *C. trachomatis* (Serovar A bis C) ist in Entwicklungsländern die Hauptursache einer vermeidbaren Erblindung. Ungefähr 500 Millionen Menschen sind infiziert und sechs bis sieben Millionen von ihnen erblinden in der Folge der Chlamydien-Infektion. Zusätzlich befällt *C. trachomatis* (Serovar D bis K) sowohl den männlichen als auch den weiblichen Genitaltrakt und gehört dort neben den Gonokokken zu den häufigsten pathogenen Bakterien (Schachter & Caldwell, 1980).

*C. pneumoniae* verursacht Erkrankungen der Atemwege (Brade et al., 1995). Darüber hinaus mehrten sich in den letzten Jahren die Hinweise auf eine ursächliche Beteiligung von *C. pneumoniae* bei der Entstehung der 'Volkskrankheit' Arteriosklerose, die zu Durchblutungsstörungen, Schlaganfall und Herzinfarkt führen kann (Patel et al., 1995; Ramirez et al., 1996; Wimmer et al., 1996; Mlot, 1996; Stille & Just-Nübling, 1997). Früher diskutierte Ursachen wie Nikotinkonsum, hoher Cholesterinspiegel und Bluthochdruck sind danach nur noch Kofaktoren einer primär durch die Infektion mit *C. pneumoniae* verursachten Krankheit (Stille & Just-Nübling, 1997).

Infektionen mit Chlamydien können mit vielen Breitspektrum-Antibiotika behandelt werden, Tetrazykline sind besonders effektiv.

### 2.1.2 Die medizinische Bedeutung des LPS

Die Wirkung der Lipopolysaccharide auf den Körper ist zweischneidig: LPS kann sowohl positiv als auch negativ wirken (Doran, 1992). Einerseits wurde bereits Anfang der vierziger Jahre von Coley beobachtet, daß durch die Behandlung mit abgetöteten Gram-negativen Bakterien eine Rückbildung von Tumoren induziert werden kann (Rietschel & Brade, 1993). Andererseits sind die Lipopolysaccharide für mehr als 50% der Sepsis-Fälle verantwortlich, wobei diese mit einer Mortalitätsrate von 20% bis 60% behaftet sind (CDC, 1990; Ziegler et al., 1991).

Beide Effekte beruhen auf der Stimulation des Immunsystems durch LPS. Bei Meningokokken-Infektionen ziehen Plasma-LPS-Konzentrationen von mehr als 0,7 ng/ml die Entwicklung des septischen Schocks nach sich; 100%ige Mortalität wurde bei LPS-Konzentrationen von mehr als 15 ng/ml beobachtet. Bei einigen Patienten wurden LPS-Konzentrationen von bis zu 300 ng/ml gemessen (Brandtzaeg et al., 1995). Demgegenüber liegt der Endotoxin-Spiegel gesunder Kontrollpersonen bei 0,001 ng/ml (Kelly et al., 1997) bzw. 0,01 EU/ml (Endotoxin-Einheiten).

Überaktivierung des Immunsystems führt zu den Symptomen der Sepsis bis hin zum septischen Schock mit Tod durch Versagen mehrere Organe (MOF; Vincent, 1996). Sowohl humorale als auch zelluläre Reaktionen werden durch LPS stimuliert (Doran, 1992; Zanetti et al., 1997). Zu den aktivierten humoralen Komponenten gehört das Komplementsystem (klassischer und alternativer Weg), die Gerinnungskaskade und das Kallikrein-Bradykinin-System (Doran, 1992; Martich et al., 1993).

Die zellulären Reaktionen betreffen vor allem Monozyten, Endothelialzellen und Granulozyten (Polymorphonuclear cells, PMN). Monozyten und aktivierte PMN werden durch einen LPS/LBP-Komplex stimuliert, der an den Rezeptor CD14 bindet. LBP ist das sogenannte Lipopolysaccharid-bindende Protein (Tobias et al., 1989); CD14 ist ein Rezeptor, der in membranständiger (mCD14) und löslicher Form (sCD14) an der Aktivierung des Immunsystems beteiligt ist (Schütt & Schumann, 1993). Daneben ist vermutlich ein weiterer, bisher nicht identifizierter Rezeptor an der Zellaktivierung beteiligt. Die heutigen Modellvorstellungen zu diesen Vorgängen sind in Abbildung 2.1 dargestellt; die LPS-bindenden Proteine werden in Abschnitt 2.2 eingehender besprochen.

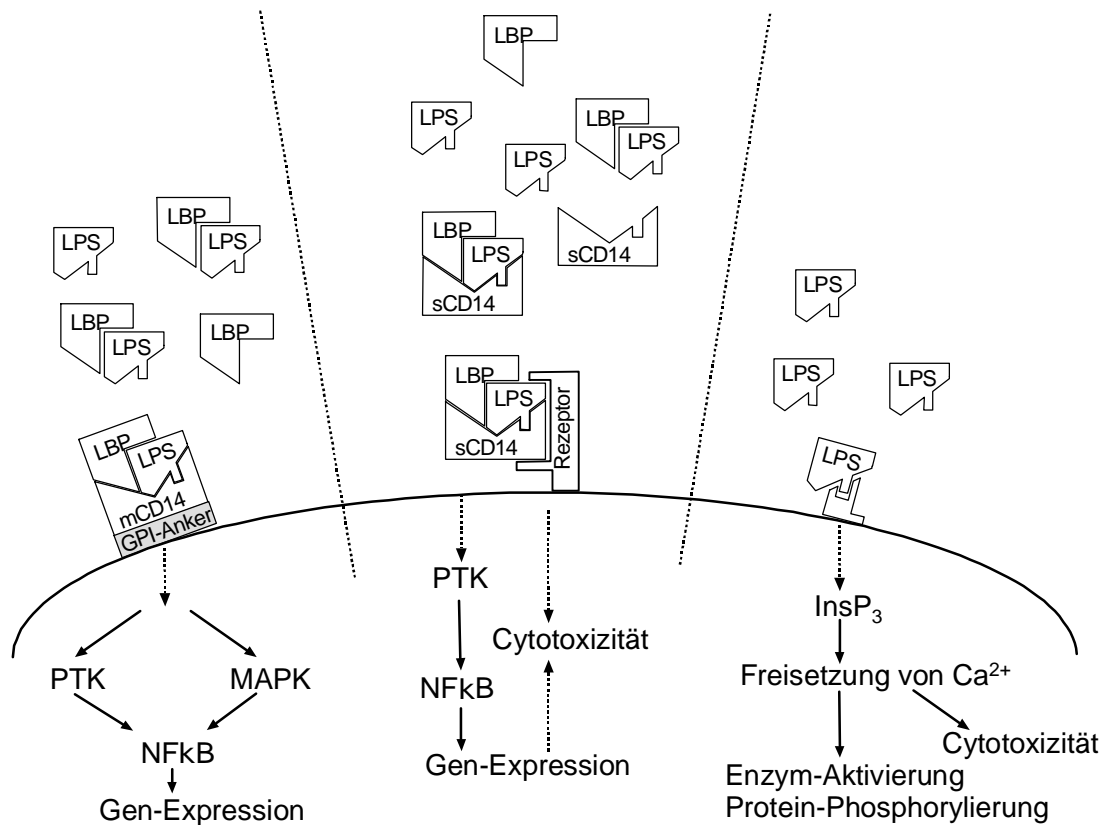


Abbildung 2.1: Drei Modellvorstellungen zur Aktivierung von Zellen durch LPS. Links: Zellen, die membrangebundenes CD14 tragen, werden durch LPS/LBP-Komplexe aktiviert. Mitte: Einige Zellen, die selbst kein CD14 produzieren, können LPS/LBP/sCD14-Komplexe erkennen und werden dadurch zur Gen-Expression angeregt. Rechts: In einigen Zellen wird bei hohen LPS-Konzentrationen unabhängig von CD14 und LBP eine durch Calcium vermittelte Signaltransduktionskaskade in Gang gesetzt. Gestrichelte Pfeile deuten noch nicht vollständig aufgeklärte Reaktionswege an. Abkürzungen: GPI: Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol; PTK: Protein-Tyrosin-Kinase; MAPK: Mitogen-aktiviert Protein-Kinase; NFκB: Kernfaktor (nuclear factor) κB; InsP<sub>3</sub>: myo-Inositol-1,4,5-trisphosphat. Veränderte Abbildung nach Mayeux, 1997.

Die Aktivierung von Monozyten durch LPS führt zur Produktion und Ausschüttung von entzündungsfördernden Botenstoffen (vor allem TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6), die wiederum andere Zellen aktivieren. Daneben werden auch Stickstoffmonoxid (NO), Metaboliten der Arachidonsäure und der Plättchen-aktivierende Faktor (PAF) freigesetzt, die zur weiteren Stimulierung des Immunsystems beitragen (Dinarello, 1996; Zanetti et al., 1997, Mayeux, 1997).

Zusammengenommen bewirken die Mediatoren eine Senkung des Blutdrucks durch Erweiterung der Gefäße, Blutgerinnsel, Fieber und Gefäßschäden, die schließlich bis zum Tod führen können (Freudenberg et al., 1993; Zanetti et al., 1997). In Abbildung 2.2 sind diese Beziehungen schematisch aufgeführt.

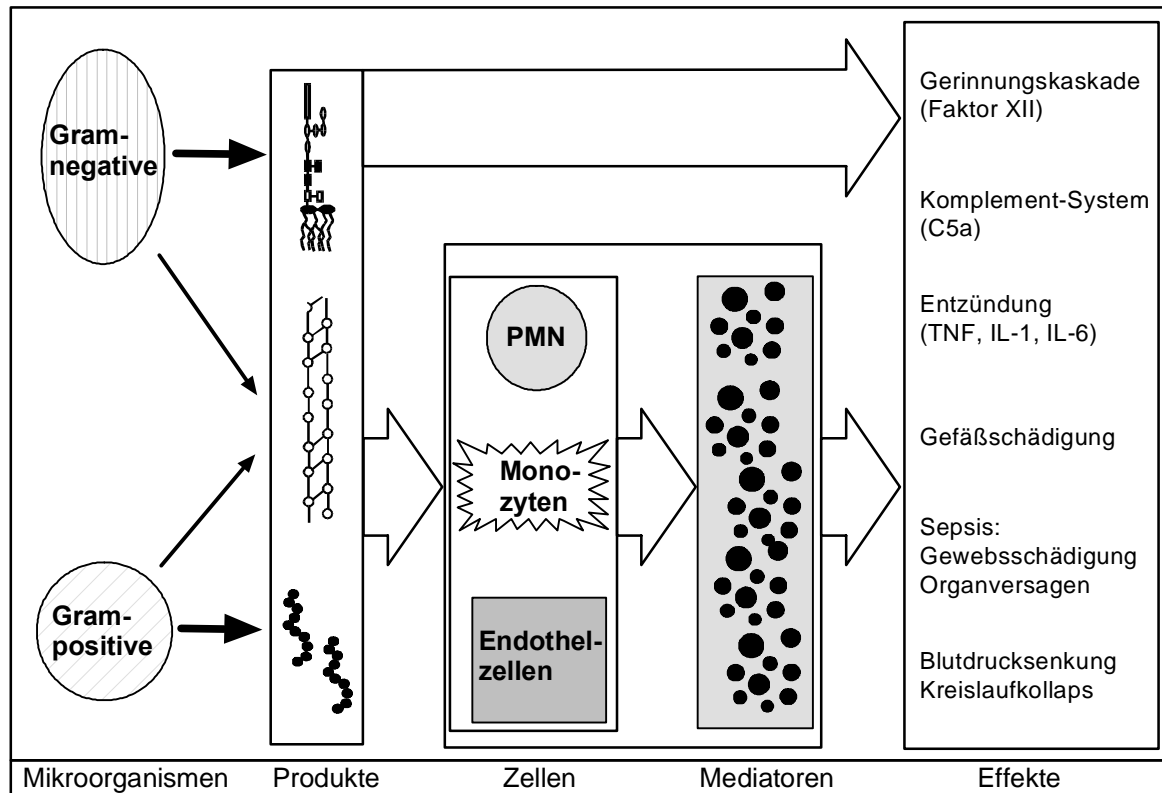


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Beziehungen zwischen Bakterien, ihren Produkten und den resultierenden pathologischen Effekten (modifizierte Darstellung nach Zanetti et al., 1997). Zu den aktivierenden bakteriellen Produkten gehören LPS, Peptidoglykan und Polypeptid-Exotoxine.

In der Therapie steht neben der Behandlung der bakteriellen Infektion durch Antibiotika die Eindämmung der Entzündungsreaktion im Vordergrund. Dabei gibt es zwei Strategien, die beide bislang nicht zu einem durchschlagenden Erfolg geführt haben (Zanetti et al., 1997): Die eine richtet sich gegen die pro-inflammatorischen Zytokine (Zabel & Schade, 1993; Heumann & Glauser, 1996), die andere gegen die Lipopolysaccharide als Auslöser der übersteigerten Immunantwort (Pollack & Ohl, 1996).

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit der zweite Ansatz von besonderem Interesse ist, sollen die bisherigen Versuche im folgenden kurz beschrieben werden. Der Einsatz von polyklonalen Seren und monoklonalen Antikörpern gegen LPS bzw. LPS-Teilstrukturen wird u.a. durch die hohe Spezifität der Antigen-Erkennung behindert, die das Spektrum attackierbarer Bakterien einschränkt (Rietschel et al., 1996; Zanetti et al., 1997). Eine andere Strategie beruht auf der Verwendung von natürlichen (z.B. Lipid A von *R. sphaeroides*; Golenbock et al., 1991) oder synthetischen LPS-Antagonisten (E5531; Christ et al., 1995), die mit dem toxischen LPS um

die Bindungsstellen in Konkurrenz treten. Schließlich stellen die LPS-bindenden Proteine BPI, LBP und CD14 einen Ansatzpunkt für die Anti-Endotoxin-Therapie dar (Pollack & Ohl, 1996).

Die hier durchgeführte Arbeit soll einen Beitrag für die Anti-Endotoxin-Therapie leisten, indem sie die gezielte Entwicklung neuer Anti-LPS-Wirkstoffe durch Modelle der dreidimensionalen Struktur des LPS unterstützt.

### 2.1.3 Die Struktur der Lipopolysaccharide

Wie in Abbildung 2.3 gezeigt und eingangs schon kurz erwähnt, besteht das Lipopolysaccharid der Gram-negativen Bakterien aus drei kovalent verknüpften Einheiten: Lipid A, Kernzuckerbereich (Core) und O-Antigen. Die strukturelle Variabilität der LPS-Regionen nimmt vom Lipid A über den Core bis hin zum O-Antigen zu (Wilkinson, 1996).

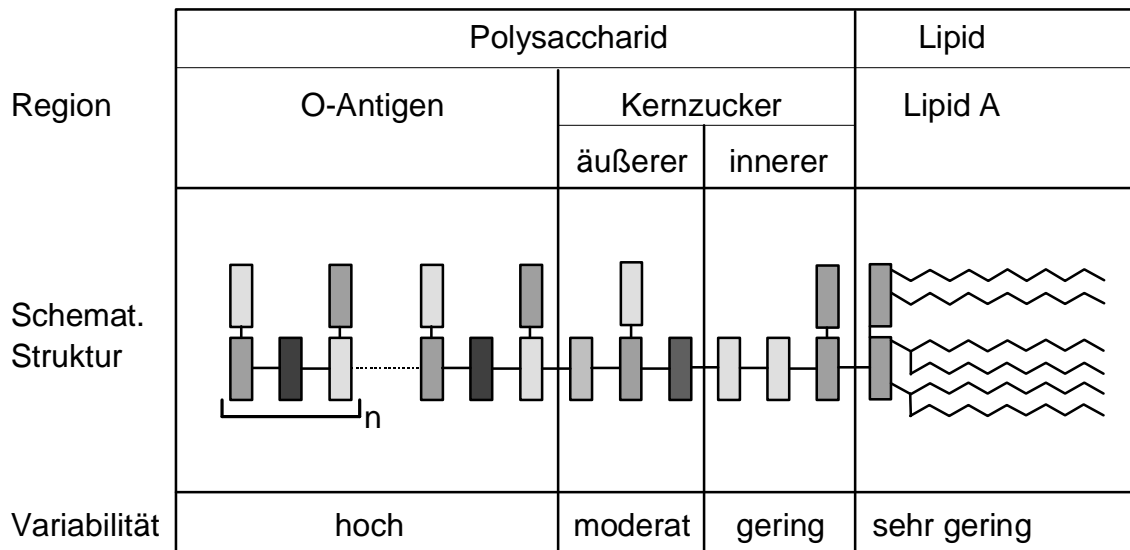


Abbildung 2.3: Schematischer Aufbau eines enterobakteriellen Lipopolysaccharids. Die Rechtecke deuten die Zuckereinheiten an. Das O-Antigen enthält  $n$  Oligosaccharid-Wiederholeinheiten (modifizierte Darstellung nach Kastowsky et al., 1992). Die strukturelle Variabilität der einzelnen Einheiten ist unterhalb des Schemas angegeben.

Das O-Antigen (O-spezifische Kette) bestimmt die serologische Spezifität des LPS bzw. der Bakterien. Es besteht aus bis zu 50 Wiederholeinheiten eines Oligosaccharids, welches aus maximal acht Zuckerresten zusammengesetzt ist. Der Aufbau des Oligosaccharids ist für einen Bakterienstamm charakteristisch und stellt die Grundlage für die Serotypisierung z.B. von *Salmonella* nach dem Kauffmann-White-Schema dar (Brade et al., 1988; Westphal, 1993;



Holst et al., 1996). Die strukturelle Variabilität des O-Antigens ist aufgrund der Vielzahl der Kombinationsmöglichkeiten der einzelnen Bausteine sehr hoch. Aufgrund von Mutationen kann die Expression des O-Antigens unterdrückt sein, die Morphologie der Bakterienkultur ändert sich dann von glatt (smooth) zu rauh (rough). Das zugehörige LPS wird entsprechend als S-LPS oder R-LPS bezeichnet, wobei je nach Ausprägung des Kernzuckerbereiches z.B. bei *Salmonella typhimurium* oder *E. coli* K-12 zwischen Ra- (maximaler Core), Rb-, Rc-, Rd- und Re-LPS (minimaler Core) unterschieden wird. Allerdings produzieren auch einige Wildtypstämme (ohne Mutation) rauhes LPS, z.B. *Bordetella pertussis* und *Neisseria gonorrhoeae* (Rietschel et al., 1993; Wilkinson, 1996).

Die sich an das O-Antigen anschließende Kernzuckerregion kann in inneren und äußeren Kern unterteilt werden. Der Kernzuckerbereich ist strukturell weniger variabel als das O-Antigen, wobei die Variabilität von innen nach außen zunimmt. Für bestimmte Gruppen von Bakterien werden ähnliche oder identische Kernregionen gefunden, z.B. für Wildtypen von *Salmonella*. Der äußere Kern enthält häufig ubiquitäre Zucker wie Glucose, Galactose, Glucosamin und Galactosamin. Der innere Kern ist dagegen aus den seltenen Zuckern *L*-Glycero-*D*-manno-Heptose (Hep) und 2-Keto-3-desoxy-octonsäure (Kdo) aufgebaut. Kdo ist eine charakteristische und obligatorische LPS-Komponente mit hohem diagnostischen Wert, da sie nahezu ausschließlich im LPS auftritt (Rietschel et al., 1993). Die minimale LPS-Struktur, die bei lebensfähigen Mutanten Gram-negativer Bakterien gefunden wird, besteht aus einem Kdo-Rest, der an Lipid A gebunden ist (Helander et al., 1988).

Das Lipid A stellt das endotoxische Prinzip des LPS dar, da es die meisten der LPS-typischen pathophysiologischen Effekte auslösen kann (Rietschel et al., 1994). Die Struktur des Lipid A ist hoch konserviert. Charakteristische Bestandteile dieses Amphiphils sind das Grundgerüst (Backbone), bestehend aus einem  $\beta(1\rightarrow6)$ -verknüpften Glucosamin-Disaccharid, und die daran gebundenen Fettsäuren. Über Ester- bzw. Amidbindungen sind bis zu vier mittel- bis langkettige 3-Hydroxy-Fettsäuren ( $C_{10}$  -  $C_{22}$ ) direkt an das Backbone gebunden. Die Fettsäureketten können an den Hydroxylgruppen mit weiteren Ketten acyliert sein. Ein bis zwei Phosphatgruppen sind in 1- und 4'-Position mit dem Diglucosaminbackbone verknüpft. Die Anknüpfung der Polysaccharidkomponente erfolgt über die 6'-Hydroxygruppe des Lipid A-Backbones.

Die besondere Bedeutung der Strukturdetails des Lipid A wird dadurch deutlich, daß einige Bakterien wie *R. capsulatus* oder *R. sphaeroides* nicht-toxisches bzw. antagonistisch wirken-

des LPS produzieren, welches sich in der Lipid A-Komponente lediglich durch eine veränderte Struktur des Fettsäurebereiches von dem hochtoxischen Lipid A von *E. coli* unterscheidet (Golenbock et al., 1991; Zähringer et al., 1994; Holst, 1995 ). Die Unterschiede betreffen die Zahl, Länge und Struktur (Anzahl der Doppelbindungen) der Fettsäureketten.

Die Biosynthesewege, die bei *E. coli* zur Bildung des LPS führen, wurden von Raetz aufgeklärt (Raetz, 1990).

#### **2.1.4 Die LPS-bindenden Proteine**

Um das Verständnis der nachfolgenden Diskussionen zur Erkennung von LPS-Epitopen durch LPS-bindende Proteine zu erleichtern, soll im folgenden ein kurzer Überblick über die bekannten LPS-bindenden Proteine und ihre Funktion gegeben werden.

Neben den Antikörpern gegen LPS sind besonders die humanen LPS-bindenden Proteine BPI, LBP und CD14 von Interesse. Eine Übersicht über die LPS-bindenden Proteine geben z.B. Rietschel et al. (1996).

##### **2.1.4.1 Antikörper gegen LPS**

Antikörper (AK) gegen LPS treten ubiquitär im humanen Serum auf (s. z.B. Mattsby-Baltzer & Alving, 1984) und können gegen Epitope aus allen drei verschiedenen Regionen des LPS gerichtet sein. Das besondere Interesse an der Entwicklung einer Anti-Endotoxin-Therapie auf der Basis von Anti-LPS-Antikörpern ist durch folgende Vorteile begründet (Rietschel et al., 1996):

- hohe Halbwertszeit der AK im Blut
- geringe Immunogenität bei Verwendung humaner oder humanisierter AK
- Aktivierung des Komplementsystems möglich
- Wechselwirkung mit F<sub>c</sub>-Rezeptoren für AK möglich
- Produktion hochspezifischer und gut charakterisierter monoklonaler AK möglich.

Wiederholt wurden Antikörper gegen Lipid A untersucht, da die hohe Konservierung der Lipid A-Struktur eine große Kreuzreaktivität mit LPS verschiedener Bakterienspezies erwarten läßt. In ausführlichen Studien erkannten die AK ausschließlich Epitope im hydrophilen Backbone des Lipid A (Kuhn et al., 1992) bzw. ReLPS, nicht aber komplettes R- oder S-LPS

(Kuhn, 1993). In den meisten Experimenten binden Anti-Lipid A-Antikörper LPS nur unter besonders günstigen Bedingungen (Kuhn et al., 1993; Rietschel et al., 1996). Mehrere klinische Studien mit zwei verschiedenen monoklonalen Anti-Lipid A-AK haben keine eindeutigen Schutzeffekte der AK nachweisen können (Bates & Lee, 1994; Weil, 1994), so daß die amerikanische Gesundheitsbehörde die Zulassung wieder zurückgezogen hat.

Auch bei Studien mit AK gegen die Kernzuckerregion (Core) sind die Resultate widersprüchlich. Anfänglich beobachtete Kreuzreaktivitäten haben sich in weiteren Versuchen häufig nicht bestätigt (Rietschel et al., 1996). Zur Zeit werden verschiedene kreuzreaktive Antikörper untersucht (Di Padova et al., 1993; Di Padova et al., 1994; Lugowski et al., 1996a, 1996b), die sowohl rauhe als auch glatte LPS-Formen binden.

Die Wirkung von Antikörpern gegen das O-Antigen des glatten LPS ist durch ihre hohe Spezifität auf homologe LPS-Strukturen begrenzt. Angesichts der hohen Variabilität des O-Antigens (s. Abschnitt 2.1.2) sind sie aber nur von begrenztem klinischen Nutzen (Rietschel et al., 1996). Einen Überblick über Antikörper gegen LPS gibt Poxton (1995).

#### **2.1.4.2 Das bakterizide/permeabilitätserhöhende Protein (BPI)**

Das bakterizide/permeabilitätserhöhende Protein (BPI, Gray et al., 1989) hat eine molekulare Masse von 55 bis 60 kDa und wird in azurophilen Granulozyten gebildet. Es besteht eine 45%ige Sequenzhomologie zum Lipopolysaccharid-bindenden Protein (LBP) sowie eine Verwandtschaft beider Proteine zu zwei humanen Lipidtransport-Proteinen. Die Bindung von Lipid A, rauhem und glattem LPS wird bei beiden Molekülen jeweils über das 25 kDa-N-terminale Fragment vermittelt (Elsbach & Weiss, 1993). BPI behindert die Vermehrung von Bakterien und wirkt durch die hohe LPS-Affinität auf viele Gram-negative Bakterien toxisch. Die Serum-Konzentration beträgt maximal 100 ng/ml (Wilde et al., 1994).

*In vitro* behindert BPI eine Reihe von biologischen Wirkungen des LPS, insbesondere die Aufnahme von LPS durch Monozyten und Neutrophile und die Stimulierung von Zellen zur Ausschüttung von Zytokinen und Mediatoren (Marra et al., 1992). Die Eignung von rekombinantem BPI (rBPI) bzw. einem Teilstück davon (rBPI-23) als Therapeutika der Gram-negativen Sepsis wurde in mehreren Versuchen untersucht. Allerdings stellte sich heraus, daß eine frühzeitige Verabreichung erforderlich ist und die pharmakokinetischen Eigenschaften nicht optimal sind (Pollack & Ohl, 1996).

Unter dem Aspekt des Drug-Design ist BPI besonders interessant, da 1997 die Kristallstruktur eines Komplexes aus BPI und zwei Phospholipiden veröffentlicht wurde (Beamer et al., 1997).

#### **2.1.4.3 Das Lipopolysaccharid-bindende Protein (LBP)**

Das Lipopolysaccharid-bindende Protein (LBP) ist ein glykosyliertes Protein mit einer molekularen Masse von 58 bis 60 kDa (Tobias et al., 1989; Schumann et al., 1990). Es wird konstitutiv exprimiert (1 bis 10 mg/ml in humanem Serum), aber seine Konzentration im Plasma steigt in der Akut-Phase-Reaktion deutlich an (Troelstra et al., 1997). LBP ist ein Lipidtransport-Protein und zeigt 24% bis 45% Sequenzhomologie mit dem Phospholipidtransfer-Protein PLTP, dem Cholesterolestertransport-Protein CETP und BPI (Schumann et al., 1994; Hailman et al., 1996). LBP besitzt eine hohe Affinität für LPS und transferiert LPS aus Aggregaten sowohl zu CD14 als auch zu HDL-Partikeln (Yu et al., 1996; Yu & Wright, 1997; Tobias et al., 1997). Letzteres bewirkt die Neutralisierung des LPS, während die Bindung an membranständige (mCD14) oder freie (sCD14) CD14-Moleküle zur Aktivierung von Zellen und damit zur Vermittlung der toxischen Eigenschaften des LPS führt (Pollack & Ohl, 1996).

#### **2.1.4.4 CD14**

CD14 ist ein 50 bis 55 kDa schweres Glykoprotein, welches von Monozyten, Makrophagen und PMN in membrangebundener (mCD14) und löslicher Form (sCD14) gebildet wird (Wright et al., 1990; Schütt & Schumann, 1993). mCD14 ist über einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-(GPI)-Anker an die Zell-Membran gebunden (Simmons et al., 1989), während sCD14 (ohne GPI-Anker) in einer Konzentration von 2 bis 6 mg/ml im Serum gesunder Personen zirkuliert (Bufler et al., 1995; Troelstra et al., 1997). Bei akuten Infektionen steigt die Serumkonzentration auf das Drei- bis Vierfache (Landman et al., 1996). Nach Bildung von LPS/LBP-Komplexen bindet CD14 mit hoher Affinität die Lipid A-Komponente des LPS. Der GPI-Anker des mCD14 erlaubt keine direkte Signaltransduktion, daher wird spekuliert, daß an der Aktivierung der Zellen weitere, bisher nicht identifizierte Komponenten beteiligt sind (Vita et al., 1997). Zellen, die selbst kein mCD14 exprimieren (z.B. Endothelzellen), können durch LPS/sCD14-Komplexe aktiviert werden (Pollack & Ohl, 1996; Vita et al., 1997).

#### **2.1.4.5 CAP18**

Das kationische Protein CAP18 wird von den Granulozyten produziert (Hirata et al., 1994). Es hat eine molekulare Masse von 18 kDa und bindet LPS mit hoher Affinität. Sowohl das intakte CAP18-Molekül als auch Fragmente davon wirken LPS-neutralisierend und behindern die Sti-

mulation der Entzündungsreaktion durch LPS (Larrick et al., 1994). Die NMR-Struktur eines helikalen CAP18-Fragmentes wurde 1995 veröffentlicht (Chen et al., 1995). Sie zeigt eine amphipathische Helix, die auf der einen Seite hydrophob und auf der anderen Seite - durch eine Reihe von geladenen Aminosäuren - hydrophil ist.

#### **2.1.4.6 Polymyxin B**

Polymyxin B (PMB, s. z.B. Storm et al., 1977) und einige davon abgeleitete Peptide (Rustici et al., 1993) besitzen eine hohe Affinität zu LPS. PMB ist ein zyklisches Dekapeptid mit einer extrazyklisch gebundenen Fettsäurekette, wobei im Peptidring eine hohe Zahl positiv geladener Aminosäuren vorliegt. PMB kann mit hydrophoben und hydrophilen Bestandteilen des LPS wechselwirken und stört die Organisation der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien (Storm et al., 1977; Nikaido & Vaara, 1985). Aufgrund seiner zytotoxischen Eigenschaften kann PMB nur beschränkt als Antibiotikum beim Menschen eingesetzt werden. PMB eignet sich wegen seiner hohen Affinität zu LPS als Bindungspartner für die Affinitätschromatographie und wird in der Blutwäsche zur Senkung des Serum-LPS-Spiegels verwendet (Pollack & Ohl, 1996).

#### **2.1.4.7 Limulus Anti-LPS-Faktor**

Der *Limulus* Anti-LPS-Faktor (LALF, Tanaka et al., 1982) aus *Limulus polyphemus* wird aufgrund seiner Eigenschaften auch als Endotoxin-neutralisierendes Protein (ENP, Fletcher et al., 1993) bezeichnet. ENP bindet mit hoher Affinität an LPS und behindert die Aktivierung von Zellen durch LPS (Warren et al., 1992). Die Kristallstruktur von ENP zeigt eine amphipathische Schleife mit ausgeprägten hydrophoben und hydrophilen Bereichen (Hoess et al., 1993). Allerdings nimmt das ENP im Kristall vermutlich eine andere Struktur ein als im LPS-gebundenen Zustand (A. Hoess, pers. Mitteilung).

#### **2.1.4.8 Weitere LPS-bindende Proteine**

Die Bindung von LPS an Lipoproteinpartikel wie VLDL, LDL oder HDL (Very Low Density Lipoprotein, Low Density Lipoprotein, High Density Lipoprotein) wird durch LBP vermittelt und neutralisiert die Wirkung von LPS. Daneben gibt es experimentelle Hinweise auf die Bindung von LPS an Albumin, Hämoglobin, Lactoferrin, Lysozym und Transferrin (Rietschel et al., 1996). Über die Rolle der Alkalischen Phosphatase bei der Detoxifizierung von LPS wird zur Zeit spekuliert (Poelstra et al., 1997).

## 2.2 Molekulardynamik-Simulationen (MD)

Aus mehreren Gründen hat sich das Verfahren der Molekulardynamik-Simulation (MD) in der Computerchemie zur Untersuchung großer Systeme mit mehreren tausend Atomen durchgesetzt. Im Gegensatz zu quantenchemischen Methoden können auch noch Ensembles mit mehr als 10000 Atomen berechnet werden. Zudem erlaubt die MD die Untersuchung dynamischer Vorgänge und die Berechnung von makroskopischen Meßgrößen, die wiederum den Vergleich zwischen Theorie und Experiment ermöglichen. Gleichzeitig können aber auch Informationen gewonnen werden, die experimentell nicht oder nur schwer zugänglich sind. Eine gute Einführung in die Technik der MD-Simulation gibt das Buch von Allen & Tildesley (1987) sowie die Übersichtsartikel von Karplus & Petsko (1990), van Gunsteren & Berendsen (1990) und van Gunsteren & Mark (1992).

### 2.2.1 Die Integration der Bewegungsgleichung

Bei der MD wird aus den Ortskoordinaten aller Atome zum Zeitpunkt  $t$  ein neuer Koordinatensatz für den Zeitpunkt  $t=t+\Delta t$  berechnet, indem für jedes Atom die darauf wirkenden Kräfte ermittelt werden. Es ergibt sich eine Folge von Koordinatensätzen, die die Bewegung der Atome mit der Zeit beschreibt und als Trajektorie bezeichnet wird. Grundlage der Molekulardynamik-Simulationen ist die von Newton aufgestellte Beziehung

$$F_i = m_i a_i$$

zwischen der Kraft  $F_i$ , der Masse  $m_i$  und der Beschleunigung  $a_i$  eines Teilchens  $i$ . Aus praktischen Gründen wird bei dem in MD-Simulationen häufig verwendeten Leapfrog-Algorithmus zunächst nach

$$F_i = m_i a_i(t) = -\frac{dE}{dr_i}$$

aus der Energiefunktion  $E$  die Beschleunigung  $a_i$  zum Zeitpunkt  $t$  berechnet. Anschließend wird die Geschwindigkeit zum Zeitpunkt  $t+\Delta t/2$  unter Verwendung von

$$v_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = v_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + a_i(t)\Delta t$$

ermittelt.

Schließlich ergeben sich die neuen Ortskoordinaten  $r_i(t + \Delta t)$  zu

$$r_i(t + \Delta t) = r_i(t) + v_i \left( t + \frac{\Delta t}{2} \right).$$

Für die Stabilität und Genauigkeit der Berechnung ist die Wahl von  $\Delta t$  entscheidend. Üblicherweise wird ein Wert von 1 fs ( $10^{-15}$  s) verwendet, damit auch die schnellsten intramolekularen Bewegungen, die Bindungsschwingungen von Wasserstoffatomen, zeitlich hinreichend aufgelöst beschrieben werden.

In der Praxis nimmt eine MD-Simulation folgenden Verlauf: Zunächst wird durch schrittweise Erhöhung der kinetischen Energie der Teilchen die Temperatur des Systems von 0 K (absoluter Nullpunkt der Temperatur) auf die gewünschte Temperatur erhöht (Aufheiz-Phase). Anschließend folgt eine Äquilibrierungs-Phase, in der sich die Temperatur stabilisiert und die kinetische Energie gleichmäßig über das System verteilt wird. Daran schließt sich die Produktions-Phase der MD an, in der die Trajektorie erzeugt wird, die später ausgewertet werden soll.

### 2.2.2 Das Kraftfeld

Die Berechnung der Energie erfolgt im allgemeinen mit Hilfe eines Kraftfeldes. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das CHARMM-Kraftfeld verwendet (Brooks et al., 1983), daher soll im folgenden der dort verwendete Ansatz zur Energieberechnung kurz erläutert werden.

Die Potentialfunktion  $V$  des CHARMM-Kraftfeldes setzt sich aus einem bindenden Teil  $V_{\text{bindend}}$  und einem nichtbindenden Teil  $V_{\text{nichtbindend}}$  zusammen:

$$V = V_{\text{nichtbindend}} + V_{\text{bindend}}.$$

Das intermolekulare Potential  $V_{\text{nichtbindend}}$  beinhaltet zwei Komponenten:

- (1) Die Coulombwechselwirkung zweier Ladungen  $q_i$  und  $q_j$ , die sich im Abstand  $r_{ij}$  voneinander in einem Medium mit der Dielektrizität  $\epsilon\epsilon_0$  befinden, wobei  $\epsilon$  die dimensionslose relative Dielektrizitätskonstante (van Gunsteren & Berendsen, 1990) und  $\epsilon_0$  die elektrische Feldkonstante im Vakuum ( $8,85 \cdot 10^{-12}$  F/m) ist.
- (2) Die van der Waals-Wechselwirkung zwischen den Atomen  $i$  und  $j$ , die mit Hilfe eines Lennard-Jones 6-12-Potentials beschrieben wird (Abbildung 2.4).

Es ergibt sich

$$V_{\text{nichtbindend}} = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_{ij} r} + \left( \frac{A}{r^{12}} - \frac{B}{r^6} \right),$$

wobei die Parameter A und B für die beteiligten Atome charakteristisch sind. Sie werden aus experimentellen und theoretischen Untersuchungen gewonnen.

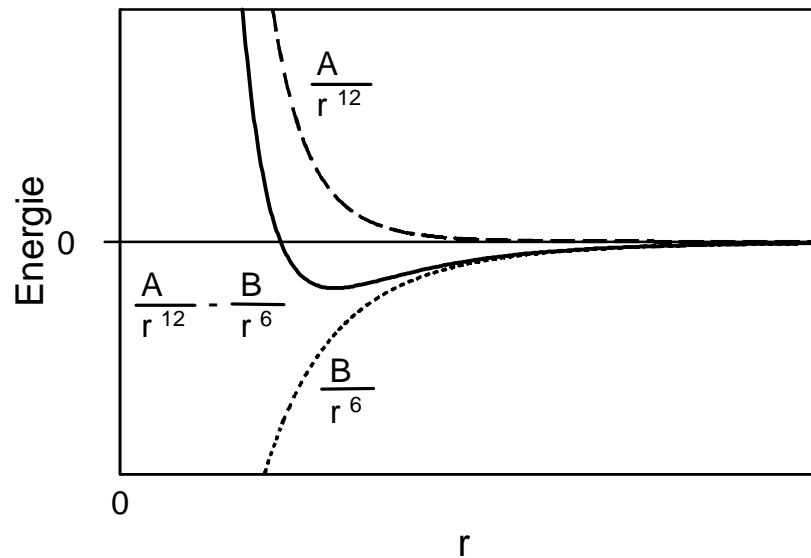


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Verlaufs des Lennard-Jones-Potentials (durchgezogene Linie). Es setzt sich aus einem attraktiven (gepunktete Linie) und einem repulsiven Term (unterbrochene Linie) zusammen.

Das Potential  $V_{\text{bindend}}$  berücksichtigt die Beiträge für Bindungslängen  $V_B$ , Bindungswinkel  $V_\theta$ , Torsionswinkel  $V_\phi$  und ungeeignete Torsionswinkel (improper torsion)  $V_\omega$ , so daß gilt:

$$V_{\text{bindend}} = V_B + V_\theta + V_\phi + V_\omega.$$

In Abbildung 2.5 sind die den Potentialen zugrundeliegenden Definitionen schematisch dargestellt.



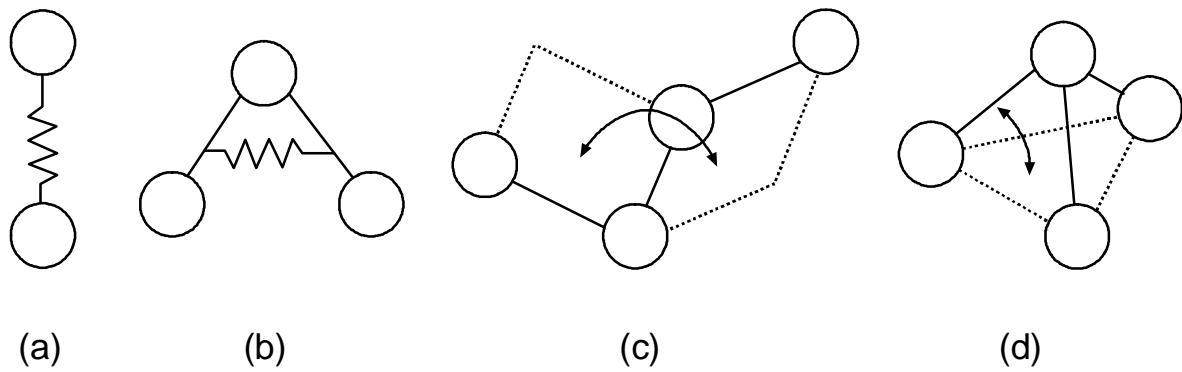


Abbildung 2.5: Definition der Potentialfunktionen bindender Wechselwirkungen. (a) Bindungslängen; (b) Bindungswinkel; (c) Torsionswinkel; (d) ungeeignete Torsionswinkel (*improper torsions*). Durchgezogene Linien symbolisieren Bindungen, unterbrochene Linien deuten Ebenen an (modifizierte Abbildung nach Schlenkrich, 1993).

Die bindenden Wechselwirkungen  $V_B$ ,  $V_\theta$  und  $V_\omega$  werden durch harmonische Potentiale der allgemeinen Form

$$V = \sum_{\text{Paare}} \frac{1}{2} K (P - P_0)^2$$

beschrieben. Dabei ist  $K$  die Kraftkonstante,  $P$  der jeweilige Parameter (z.B. die Bindungslänge) und  $P_0$  der Gleichgewichtswert von  $P$ .

Das Torsions- oder Diederwinkelpotential hat die Form

$$V_f = \sum_{\text{Diederwinkel}} \frac{1}{2} K_f [1 + \cos(n\phi - d)],$$

wobei  $K_\phi$  die Kraftkonstante,  $n$  die Periodizität und  $\delta$  der Gleichgewichtswinkel ist.

Die einzelnen charakteristischen Kraftfeldparameter werden aus spektroskopischen Untersuchungen und Kristallstrukturdaten sowie durch theoretische quantenchemische Rechnungen bestimmt (Brooks et al., 1983). Dabei sind alle Parameter inklusive der atomaren Partialladungen aufeinander abgestimmt, so daß ein in sich schlüssiges Kraftfeld entsteht. Es ist daher in der Regel nicht sinnvoll, einzelne Teile des Kraftfeldes ohne Abstimmung mit den restlichen Parametern zu verändern, z.B. aufwendigere Verfahren zur Ladungsberechnung zu verwenden.

### 2.2.3 Abbruchradien

Ein generelles Problem der Computerchemie ist die begrenzte Rechenkapazität. Da bei jedem Integrationsschritt sehr viele paarweise Wechselwirkungen berechnet werden müssen, steigt die Zahl der Rechenoperationen quadratisch mit der Systemgröße, d.h. der Atomanzahl an. Andererseits klingt die Wechselwirkungsenergie zwischen zwei Teilchen mit zunehmender Entfernung ab. Daher kann ein Abbruchradius  $R_{\text{cut}}$  definiert werden, jenseits dessen die Wechselwirkung zwischen zwei Teilchen  $i$  und  $j$  nicht mehr berücksichtigt wird:

$$V_{\text{nichtbindend}}(r_{ij}) = \begin{cases} V_{\text{nichtbindend}}(r_{ij}) & : r_{ij} \leq r_{\text{cut}} \\ 0 & : r_{ij} > r_{\text{cut}} \end{cases}.$$

Um Unstetigkeiten an der Abbruchstelle zu vermeiden, wird die Potentialfunktion mit einem sogenannten Shift-Term multipliziert (Brooks et al., 1983).

$$V_{\text{shift}}(r_{ij}) = V_{\text{nichtbindend}}(r_{ij}) \left( 1 - \left( \frac{r_{ij}}{r_{\text{cut}}} \right)^2 + \left( \frac{r_{ij}}{2r_{\text{cut}}} \right)^4 \right)$$

Die Frage nach dem geeigneten Abbruchradius wird in der Literatur kontrovers diskutiert (s. z.B. Tasaki et al., 1993; Saito, 1994). Üblicherweise werden bei MD-Simulationen von biologischen Systemen Abbruchradien zwischen 8 und 12 Å verwendet. Allerdings berichteten Alper et al. (1993a), daß ein Abbruchradius von 30 Å besser geeignet sei, die Eigenschaften des Wassers oberhalb einer Phospholipid-Membran korrekt zu berechnen. In der vorliegenden Arbeit wurde in Übereinstimmung mit vielen publizierten MD-Simulationen ein Abbruchradius von 12 Å gewählt. Dieser Wert stellt einen Kompromiß zwischen Rechenzeit auf der einen und maximaler Repräsentation elektrostatischer Wechselwirkungen auf der anderen Seite dar. Zudem besteht bei der Verwendung von periodischen Randbedingungen auch eine Beziehung zwischen der Größe des simulierten Systems und den Abbruchradien: Der Abbruchradius darf nicht größer als die halbe Kantenlänge des simulierten Systems sein, um Artefakte zu vermeiden, die sonst durch mögliche Wechselwirkungen von Teilchen mit ihren Bild-Teilchen entstehen würden (Allen & Tildesley, 1987)

#### 2.2.4 Periodische Randbedingungen

Die Beschränkung des simulierten Systems auf eine endliche Größe bewirkt, daß an den Rändern des Systems Oberflächen entstehen, die nicht den realen Gegebenheiten entsprechen. Dies wird durch die Verwendung periodischer Randbedingungen vermieden, indem die Simulationszelle - wie die Einheitszelle in einem Kristall - durch Translationen mit ihren Abbildern (images) umgeben wird. Verläßt ein Teilchen die Simulationszelle, so tritt gleichzeitig sein Abbild auf der gegenüberliegenden Seite wieder in die Zelle ein. Periodische Randbedingungen können in ein, zwei oder drei Dimensionen angewendet werden, in der vorliegenden Arbeit wurden in der Membranebene zweidimensionale periodische Randbedingungen verwendet.

Die Analogie zum Kristall deutet zugleich das Problem an, mit welchem die Verwendung fester periodischer Randbedingungen verbunden ist: Das System hat nicht die Möglichkeit, seine Ausdehnung zu verändern, d.h. zu kontrahieren oder expandieren. Auf der anderen Seite kann bei der Simulation von Membranen den Molekülen auf diese Weise - in Abstimmung mit experimentellen Ergebnissen - eine definierte Querschnittsfläche in der Membranebene zugewiesen werden.