

3 Material und Methoden

Dieses Kapitel ist in zwei Abschnitte unterteilt: Im ersten Abschnitt werden die verwendeten Materialien, d.h. die Computer-Hardware und -Software sowie die LPS-Modellstrukturen beschrieben. Der zweite Abschnitt beschäftigt sich mit der Durchführung und Auswertung der MD-Simulationen.

3.1 Computer-Hardware

Die Rechnungen wurden auf den Computern des CHEMNET am Fachbereich Chemie der FU Berlin und der ZEDAT (Zentraleinrichtung für Datenverarbeitung der FU Berlin) durchgeführt. Neben Rechnern von Silicon Graphics (SGI, Grasbrunn) unter dem Betriebssystem IRIX (SGI) wurden auch zwei Intel-Pentium Pro[®]-basierte PC-Systeme der Firma PEKO-Soft (Stadtroda) unter LINUX verwendet. Für die graphische Aufbereitung der Daten wurden PC unter Windows 95[®] (Microsoft) eingesetzt. Eine detaillierte Übersicht über die verwendeten Rechnerarchitekturen gibt Tabelle 3-1.

Tabelle 3-1: Art und Ausstattung der verwendeten Computertypen. Bei den Prozessorbezeichnungen handelt es sich um eingetragene Warenzeichen (®) der Firmen SGI/MIPS bzw. INTEL.

Typ	Anbieter	Prozessor-Typ	Prozessor-Anzahl	Takt / MHz	Speicher / MByte
Indigo	SGI	R4000 [®]	1	100	96
Indigo	SGI	R4400 [®]	1	150	80
Indy	SGI	R4600 [®]	1	100	64
Indy	SGI	R5000 [®]	1	150	64
Power Challenge XL	SGI	R8000 [®]	8	75	1024
Origin 2000	SGI	R10000 [®]	14	195	3072
Octane	SGI	R10000 [®]	2	175	128
PC (IBM-kompatibel)	PEKO-Soft	Pentium Pro [®]	1-2	200	128-192

3.2 Computer-Software

3.2.1 Fremde Software

Die Arbeit wurde unter Verwendung des Software-Paketes Quanta 4.1.1[®] von MSI (Waltham, MA, USA) durchgeführt. Für die MD-Simulationen wurde das Programm CHARMM (Brooks et al., 1984) in den kommerziellen Versionen 22 bzw. 23.1 von MSI und in der akademischen

Version 24 von Karplus (Harvard-Universität, Cambridge, MA, USA) jeweils mit dem CHARMM 22-Kraftfeld (MSI) verwendet. Bei umfangreichen Vergleichsrechnungen wurden keine Unterschiede zwischen den mit verschiedenen Programmversionen erzeugten MD-Trajektorien beobachtet.

Molekülgraphiken wurden mit SCHAKAL 88 und SCHAKAL 92 (Keller, 1989, 1995; Tellgmann, 1994), RASMOL 2.6 (Sayle & Milner-White, 1995) und WebLabViewer 2.01[©] (MSI) angefertigt.

Für die Zeichnungen wurden die Programme Corel Draw 3.0[©] (Corel Corp., Ottawa, Kanada) und Xact 5.0[©] (SciLab, Hamburg) verwendet.

3.2.2 Selbstentwickelte Software

Zur Auswertung der MD-Trajektorien wurden verschiedene Programme in FORTRAN 77 geschrieben und sowohl auf den SGI-Rechnern mit dem f77-Compiler (IRIX) als auch auf den PC (g77, LINUX) kompiliert und verwendet. Die Funktionsweise der Programme ist in Kapitel 3.6 (Auswertungsverfahren) näher erläutert.

3.3 Lipopolysaccharid-Strukturen

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Strukturen rauher LPS (R-LPS) untersucht. Die Kernzuckerbereiche der drei LPS unterscheiden sich in ihrer Größe und ihrer Zusammensetzung, während bei allen drei Strukturen ein identischer Lipid A-Bereich verwendet wurde. Beim ReLPS von *E. coli* bildet ein Kdo-Dimer den Core, beim Genus-spezifischen Core von *Chlamydia* ist es ein Kdo-Trisaccharid. Das RcLPS von *E. coli* J5 trägt von den drei LPS das größte Oligosaccharid mit insgesamt sieben Saccharid-Einheiten, wobei neben Kdo noch weitere Zucker auftreten. Die Details der Strukturen werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

3.3.1 Die gemeinsame Lipid A-Struktur

Um den Einfluß des Kernzuckerbereichs auf das Verhalten der LPS während der Simulationen klarer herauszuarbeiten, wurden die drei charakteristischen Core-Varianten mit einem einheitlichen Lipid A kombiniert. Dadurch konnte in allen drei Fällen die gleiche Packungsgeometrie im Fettsäurebereich angewendet werden. Dies hat zwei Vorteile: Zum einen mußte auf diese Weise die aufwendige Analyse möglicher Packungsanordnungen nur einmal durchgeführt werden. Zum anderen lassen sich Unterschiede im dynamischen Verhalten der drei LPS-Struk-

turen bei Verwendung eines einheitlichen Lipid A-Grundkörpers eindeutig auf die strukturellen Variationen des Core-Bereichs zurückführen, d.h. der Einfluß der Anwesenheit einzelner Zucker auf die Exponierung von Oberflächen-Epitopen kann bestimmt werden.

Als Vorlage für die Modellierung des Lipid A wurde die chemische Struktur des Hexaacyl-Lipid A von *E. coli* F515 verwendet.

Eine Reihe von experimentellen Befunden rechtfertigt diese Wahl: Die gleiche Lipid A-Struktur wurde sowohl bei *E. coli* ReLPS (Zähringer et al., 1985) als auch beim RcLPS von *E. coli* J5 (Holst et al., 1993a) nachgewiesen. Darüberhinaus wurde von Nano und Caldwell (1985) gezeigt, daß die Bildung von Hybrid-Molekülen aus dem Lipid A von *E. coli* und dem *Chlamydia*-Oligosaccharid möglich ist, wenn Gene für die Synthese des Kernzuckerbereiches mit dem Genus-spezifischen *Chlamydia*-LPS-Epitop in *E. coli* exprimiert werden. Später wurden Hybrid-LPS-Strukturen mit dem Genus-spezifischen *Chlamydia*-Epitop auch in *E. coli* F515 erzeugt und untersucht (Holst et al., 1993b). Zusätzlich wurde gezeigt, daß eine Verwandtschaft zwischen den antigenen Strukturen des Lipid A von *Chlamydia* und Enterobakterien besteht, da die normalerweise (in vollständigem LPS) kryptischen, d.h. verdeckten Lipid A-Epitope von *Chlamydia* und enterobakteriellem LPS Kreuzreaktionen hervorrufen können, wenn sie durch Hydrolyse freigelegt werden (Brade et al., 1985).

Die Struktur des Lipid A von *E. coli* F515 läßt sich folgendermaßen beschreiben: An einem β -D-Glucosaminyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucosamin-Dimer sind an der 1-Position des reduzierenden (GlcN-1) und an der 4'-Position des nichtreduzierenden Glucosamins (GlcN-2) jeweils Phosphatgruppen befestigt. An die Positionen 2 und 2' bzw. 3 und 3' des Diglucosamin-Backbones sind vier (R)-3-Hydroxytetradekansäureketten über Amid- bzw. Esterbindungen gebunden. Die Hydroxylgruppen der in 2' und 3'-Position gebundenen Fettsäureketten sind mit einer Dodekan- bzw. einer Tetradekansäurekette verestert. Der spezifische Kernzuckerbereich (Core) ist bei den drei untersuchten LPS-Strukturen jeweils über eine α -(2 \rightarrow 6)-glykosidische Bindung mit GlcN-2 des Lipid A verbunden (Imoto et al., 1985b, Zähringer et al., 1985). Die gemeinsame Lipid A-Struktur ist in Abbildung 3.1 als Bestandteil der kompletten LPS-Strukturen dargestellt.

Das molekulare Modell des Lipid A wurde aus dem von Kastowsky et al. (1991) publizierten ReLPS-Modell (Konformer C in Abbildung 8 bei Kastowsky et al.) durch Entfernung des Kdo-

Kernzuckerbereiches erzeugt. In einer vorangegangenen Untersuchung (Obst et al., 1997) waren die sechs Konformationsmodelle von Kastowsky et al. als hydratisierte Monomere mit MD-Methoden untersucht worden. Dabei hatte sich herausgestellt, daß das Konformer C die Eigenschaften der sechs ursprünglich entwickelten ReLPS-Strukturmodelle am besten repräsentiert.

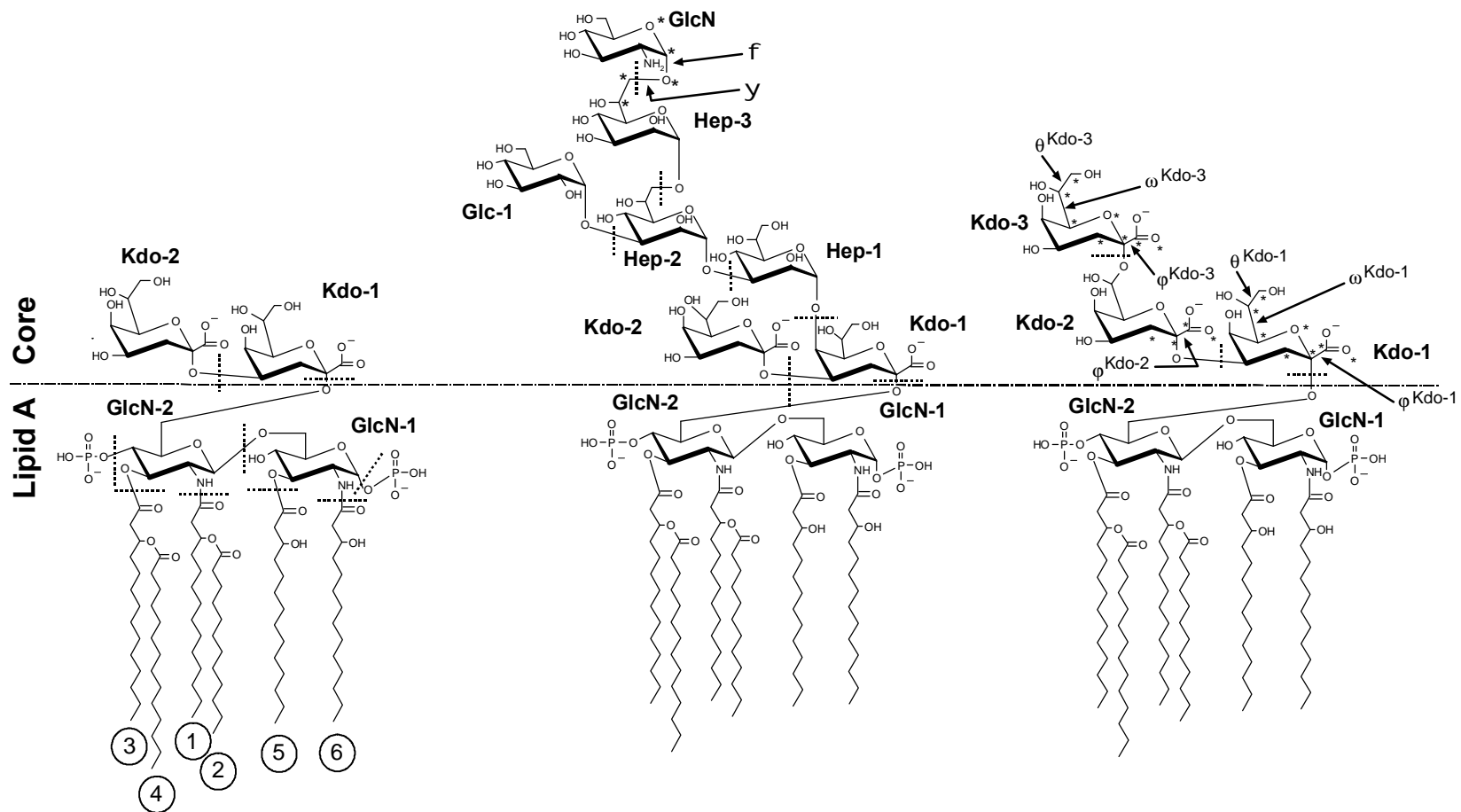


Abbildung 3.1: Die chemischen Strukturen der verwendeten Modelle von *E. coli* F515 ReLPS (links), *E. coli* J5-LPS (Mitte) und *Chlamydia*-LPS (rechts). In allen drei Fällen wurde die gleiche Lipid A-Konformation verwendet. An Torsionsanalysen beteiligte Atome sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die in dieser Arbeit verwendete Definition der Torsionswinkel ϕ , ψ , ω und θ ist durch Pfeile und Sterne gekennzeichnet. Die einzelnen Gruppen, die bei der Berechnung der Oberflächenwerte zusammengefasst wurden, sind durch unterbrochene Linien, die die Bindungen kreuzen, voneinander getrennt. Die Abgrenzung des GlcN-Backbones des Lipid A ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nur bei *E. coli* ReLPS eingetragen, sie gilt bei *E. coli* J5 und *Chlamydia* entsprechend. Die strich-punktuierte Linie grenzt Lipid A und Core voneinander ab. Die Numerierung der Fettsäuren ist nur beim *E. coli* ReLPS gezeigt, bei den anderen Strukturen gilt sie entsprechend. Bei den Rechnungen wurden alle Atome (einschließlich der Wasserstoffatome) explizit berücksichtigt.

3.3.2 ReLPS von *E. coli* F515

Die chemische Struktur des Lipid A und des ReLPS von *E. coli* F515 wurde 1985 aufgeklärt und zusätzlich durch Totalsynthese bewiesen (Imoto et al., 1985a, 1985b; Zähringer et al., 1985). Sie ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Der Kernzuckerbereich beim ReLPS von *E. coli* F515 besteht lediglich aus dem Dimer α -Kdo-(2 \rightarrow 4)- α -Kdo und stellt damit die kleinste Core-Struktur dar, die bei lebensfähigen *E. coli*-Bakterien gefunden wird (Raetz et al., 1991). Kdo (2-Keto-3-deoxyoktansäure) wird nach systematischer Nomenklatur auch als 3-Deoxy-*D*-manno-2-oktulosonsäure (dOclA) bezeichnet.

Da es sich in hoher Reinheit isolieren läßt und strukturell genau charakterisiert ist, wird das ReLPS von *E. coli* in vielen experimentellen Studien zur Wirkung bakterieller LPS eingesetzt, so daß eine Vielzahl an Daten für dieses LPS existiert.

Die Konformation des kompletten ReLPS von *E. coli* F515 wurde aus der Publikation von Kastowsky et al. (1991) übernommen (s. Kapitel 3.3.1). In Abbildung 3.2 ist die Startkonformation als Kalottenmodell dargestellt.

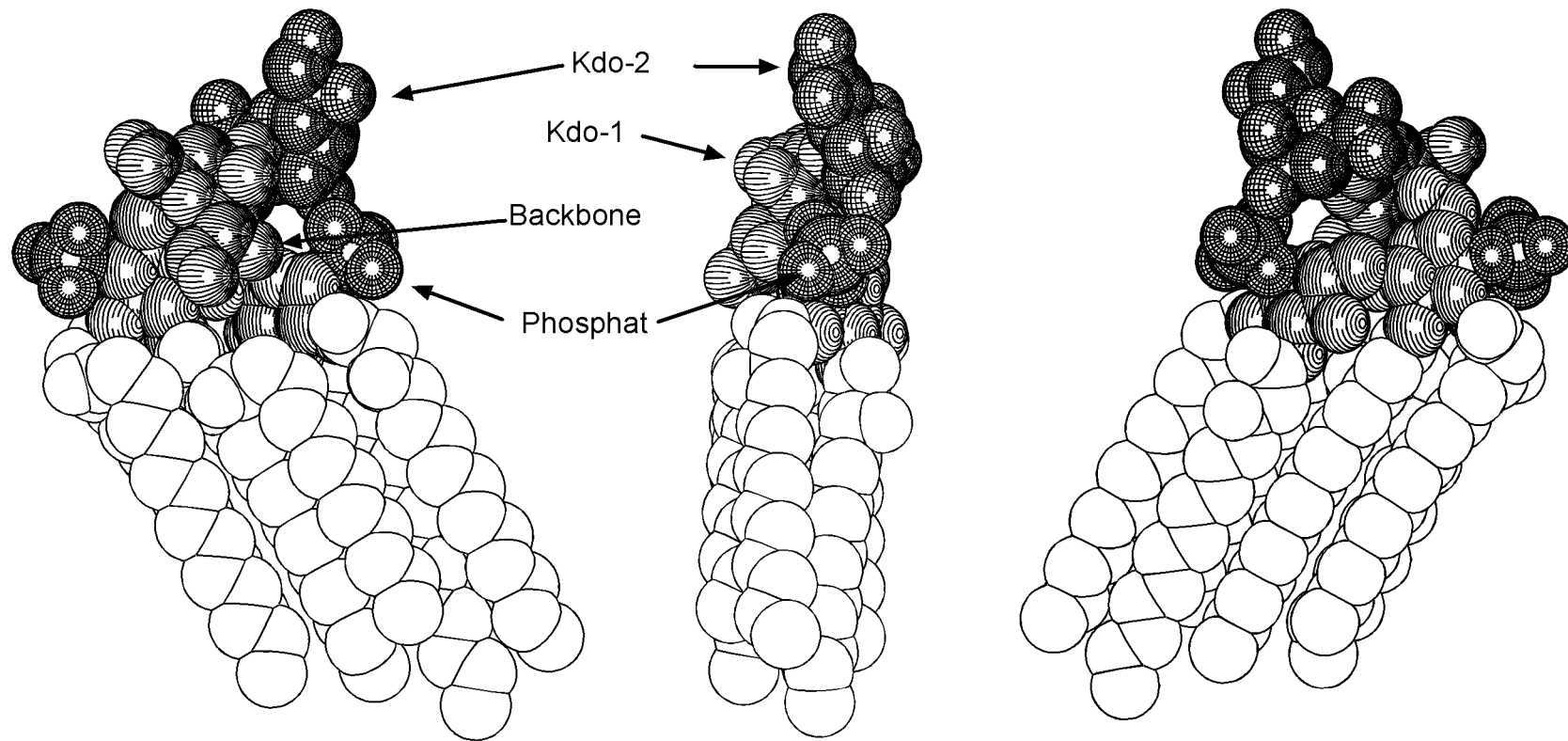


Abbildung 3.2: Die Startstruktur des *E. coli* ReLPS in drei Ansichten (jeweils 90° gegeneinander rotiert). Es sind aus Gründen der Übersichtlichkeit keine Wasserstoffatome abgebildet. Die einzelnen Bereiche des LPS sind durch unterschiedliche Muster kenntlich gemacht.

3.3.3 RcLPS der J5-Mutante von *E. coli* O111:B4

1965 wurde eine Mutante von *E. coli* O111:B4 beschrieben, die nicht in der Lage war, Galaktose zu erzeugen, sie aber aus dem Nähr-Medium aufnehmen konnte (Elbein & Heath, 1965). Wurden die Bakterien in Abwesenheit von Galaktose aufgezogen, produzierten sie ein unvollständiges LPS vom Rc-Typ (ohne O-Antigen). Bei Zugabe von Galaktose wurde komplettes LPS, inklusive O-Antigen, erzeugt. Später wurde eine Doppelmutante entdeckt, die auch extern angebotene Galaktose nicht verarbeiten kann und deshalb stets unvollständiges Rc-LPS produziert (Ziegler et al., 1973). Beide Mutanten werden als *E. coli* J5 bezeichnet und weltweit in Laboratorien verwendet (Appelmeik et al., 1993). Diese Situation führt dazu, daß es Unterschiede in der Antigen-Struktur des LPS von *E. coli* J5-Stämmen unterschiedlicher Herkunft gibt (Evans et al., 1992; Appelmeik et al., 1993). In dieser Arbeit wird den Molekülmodellen die von Müller-Loennies et al. (1994) publizierte chemische RcLPS-Struktur zugrundegelegt, wobei auf die N-Acetylierung des terminalen GlcN-Restes verzichtet wurde, da diese nicht *in vivo* auftritt, sondern ein Präparationsartefakt darstellt (M. Kastowsky, pers. Mitteilung). In den Rechnungen wurde deshalb als GlcN und nicht GlcNAc eingesetzt.

J5-LPS wurde mehrfach bei der Herstellung von Antiseren zum Schutz vor Gram-negativer Sepsis eingesetzt, wobei der Erfolg in verschiedenen Studien unterschiedlich war. In einigen Untersuchungen konnte ein schützender Effekt eines J5-Antiserums (Ziegler et al., 1982) bzw. des monoklonalen Antikörpers HA-1A (Ziegler et al., 1991) nachgewiesen werden, während in anderen Studien mit diesen Ansätzen kein Erfolg erzielt wurde (J5 Study group, 1992) bzw. der Schutz auf J5-LPS beschränkt blieb und keine signifikante Kreuzreaktivität beobachtet wurde (Baumgartner et al., 1991). Daneben gibt es ein Reihe von Studien, die sich mit der Spezifität bzw. Kreuzreaktivität von Antiseren und Antikörpern gegen J5-LPS beschäftigen (Schwartz et al., 1989; Bogard et al., 1993, Fujihara et al., 1993a, 1993b; Krieger et al., 1993). Ein weiterer Ansatz besteht in der Immunisierung mit J5-LPS zum Schutz vor Gram-negativer Sepsis (Bhattacharjee et al., 1996).

Die chemische Struktur des Lipid A (Holst et al., 1993a) und des Kernzuckerbereiches (Müller-Loennies et al., 1994) von *E. coli* J5-LPS sind bekannt. Die Struktur des J5-Lipid A ist identisch mit der bereits beschriebenen Struktur (Kapitel 3.3.1) des Lipid A von *E. coli* F515.

Der charakteristische Kernzuckerbereich des J5-LPS besteht aus α -D-GlcN-(1 \rightarrow 7)-L- α -D-Hep-(1 \rightarrow 7)-[α -D-Glc-(1 \rightarrow 3)-]-L- α -D-Hep-(1 \rightarrow 3)-L- α -D-Hep-(1 \rightarrow 5)-[α -Kdo-(2 \rightarrow 4)-]- α -Kdo, wobei L-D-Hep für L-Glycero-D-*manno*-Heptose und Glc für Glucose steht.

Das *E. coli* J5-Molekülmodell wurde aus der Lipid A-Struktur von Kastowsky et al. (Kapitel 3.3.1) und einem Modell des J5-spezifischen Oligosaccharid-Cores aufgebaut. Zu diesem Zweck wurde zunächst das Molekülmodell des Kernzuckerbereiches von *E. coli* J5 durch Entfernung der entsprechenden Zuckerresiduen aus einem Modell von Kastowsky (1993b) generiert. Der terminale Glucosamin-Rest des J5-LPS wurde an das bestehende Modell angefügt. Die energetisch günstigste Konformation für die Anknüpfung wurde durch eine systematische Torsionswinkelanalyse der GlcN-(1 \rightarrow 7)-Hep-3-Bindung ermittelt. Das Energieminimum liegt bei 170° / 60° und ist in Abbildung 3.3 durch einen Stern gekennzeichnet. Für die weiteren Rechnungen wurde diese optimierte Struktur als Ausgangspunkt gewählt. Sie ist in Abbildung 3.4 als Kalottenmodell dargestellt.

Jansson et al. (1989) haben bei semi-empirischen HSEA-Rechnungen (hard sphere exo-anomeric effect) an Core-Oligosacchariden von *E. coli* und *S. minnesota* für eine Hep-(1 \rightarrow 7)-Hep-Verknüpfung das Energieminimum - umgerechnet auf die in der vorliegenden Arbeit verwendete Torsionswinkel-Definition - bei 170°/64° gefunden, was in guter Übereinstimmung mit dem am J5-LPS berechneten Wert steht.

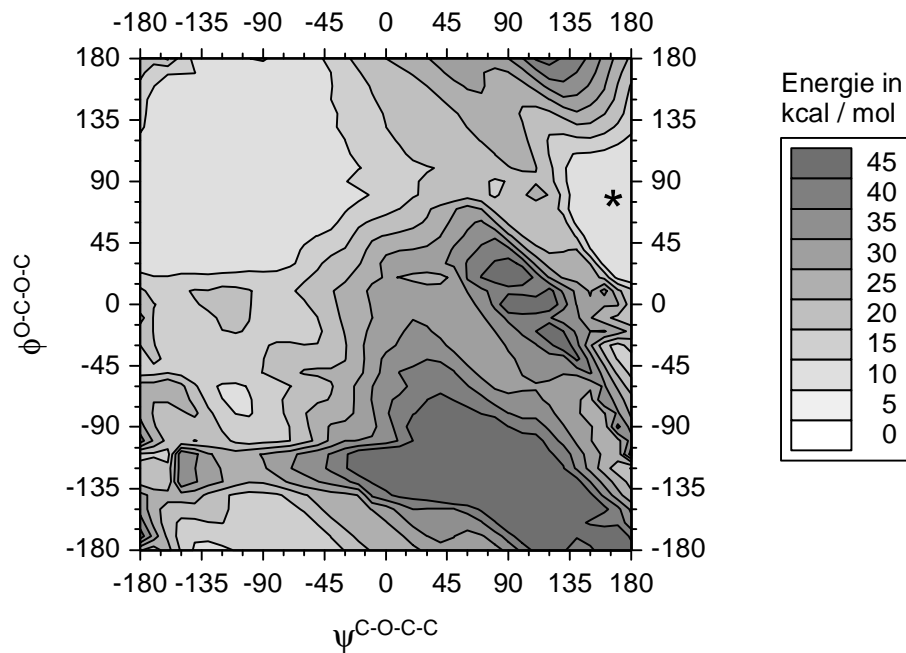


Abbildung 3.3: Energiekonturplot der Bindung zwischen Hep-3 und GlcN. Alle Energiewerte sind in kcal/mol angegeben, alle Winkel in $^{\circ}$. Das Energieminimum bei $170^{\circ}/60^{\circ}$ ist durch einen Stern gekennzeichnet. Die Definition der Torsionswinkel ϕ und ψ ist in Abbildung 3.1 angegeben.

Nach Kombination des Oligosaccharid-Fragmentes mit dem Lipid A-Grundkörper von *E. coli* F515 wurde das resultierende Molekülmodell einer Energieminimierung unterzogen. Zunächst war dabei der Lipid A-Teil fixiert, anschließend wurden alle Atome zur Minimierung freigegeben. Dabei wurde die Konformation des Lipid A nicht signifikant verändert.

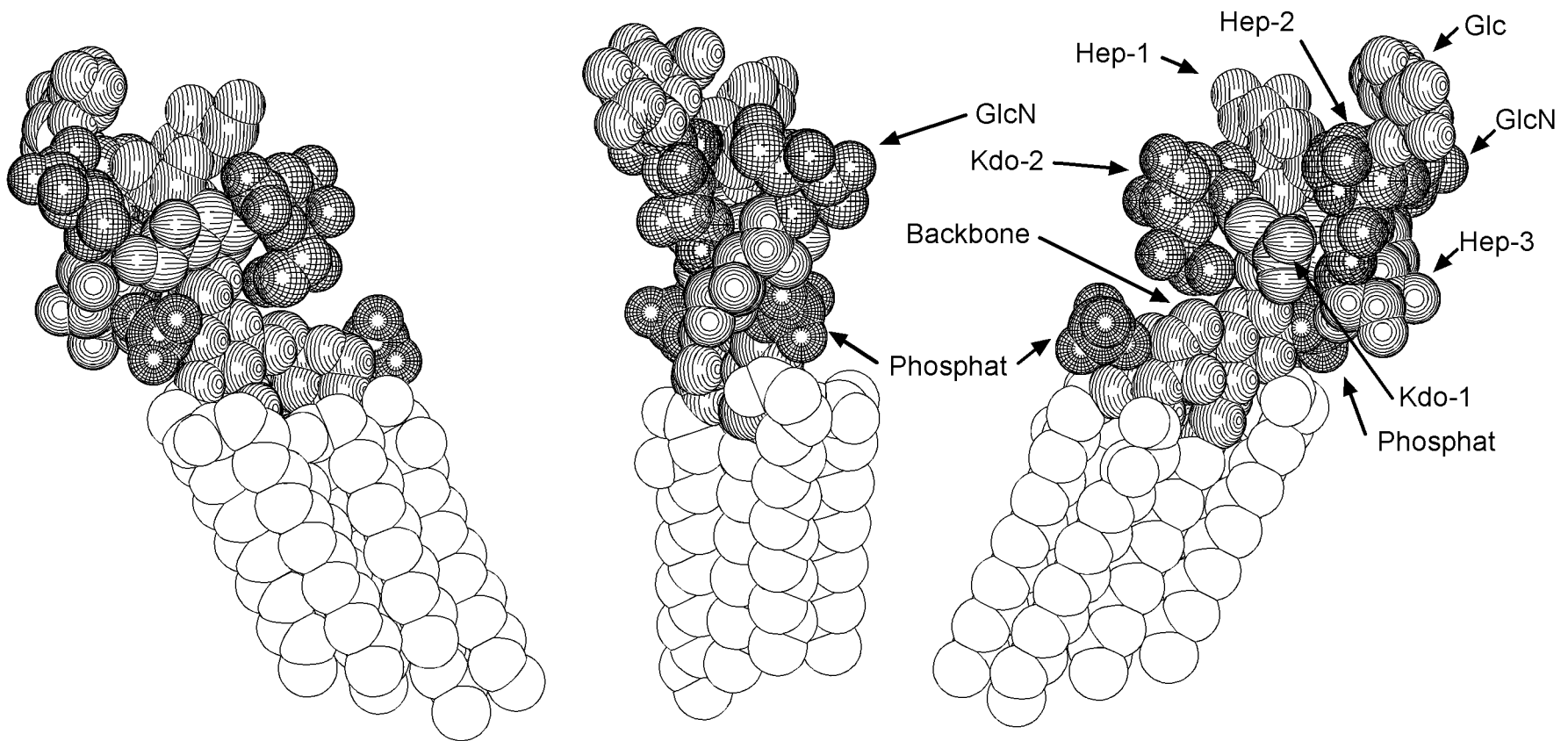


Abbildung 3.4: Die Startstruktur des LPS von *E. coli* J5 in drei Ansichten (jeweils 90° gegeneinander rotiert). Es sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die Schweratome abgebildet. Die einzelnen Bereiche des LPS sind durch unterschiedliche Muster kenntlich gemacht.

3.3.4 Chlamydia-LPS

Das *Chlamydia*-LPS-Modell wurde - in Analogie zu den anderen untersuchten LPS-Strukturen - unter Verwendung des Lipid A von *E. coli* F515 ReLPS aufgebaut. Solche Hybridstrukturen werden auch in experimentellen Untersuchungen verwendet (Holst et al., 1993b, Mamat et al., 1993, Brade et al., 1995).

Die Grundlage für das Modell des Genus-spezifischen *Chlamydia*-Epitops (Brade et al., 1987b) bildete die von Bock et al. (1992) bestimmte NMR-Struktur von *Chlamydia*-Oligosacchariden. Die Koordinaten eines *Chlamydia*-Tetrasaccharids (Struktur 1 bei Bock et al., 1992) wurden freundlicherweise von Prof. M. Wiese (Martin-Luther-Universität, Halle) zur Verfügung gestellt. Die in dem Datensatz fehlenden Dihydroxyethyl- und Carboxylgruppen wurden unter Verwendung von Standardgeometrien hinzugefügt. Anschließend wurde ihre Lage durch systematische Analyse der Torsionswinkel der verknüpfenden Bindungen optimiert. Die dabei ermittelte energetisch günstigste Konformation (Abbildung 3.5 und Abbildung 3.6) wurde eingestellt und für die weiteren Berechnungen verwendet.

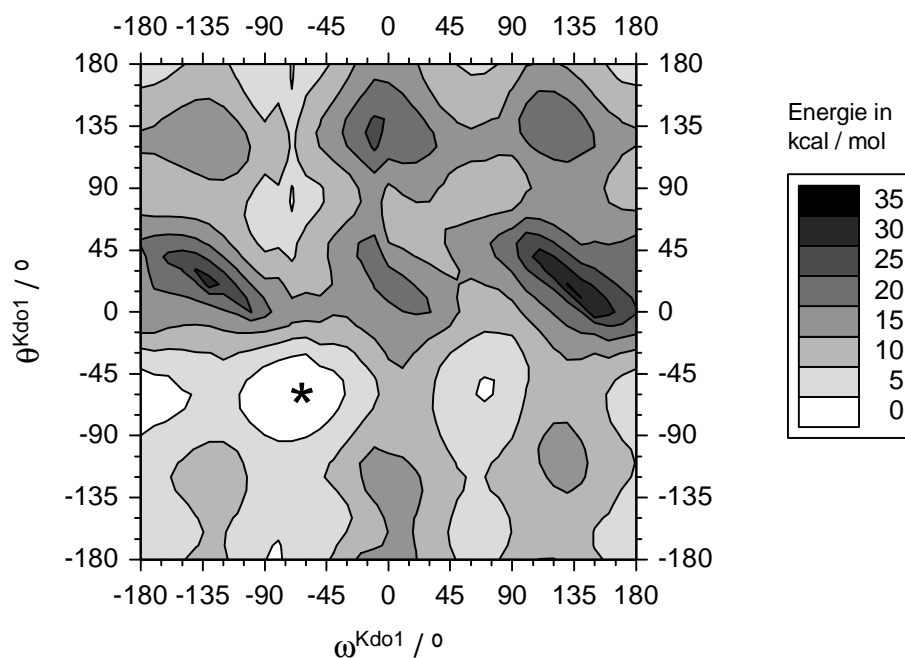


Abbildung 3.5: Energiekonturplot der Rotation der Dihydroxyethylgruppe an Kdo-1 des *Chlamydia*-LPS-Modells. An Kdo-3 ergibt sich ein nahezu identischer Energieverlauf, so daß auf eine gesonderte Darstellung verzichtet werden kann. Alle Energien sind in kcal/mol angegeben, alle Winkel in $^\circ$. Das Energieminimum bei $-60^\circ/-60^\circ$ ist durch einen Stern gekennzeichnet. Zur Definition der Torsionswinkel s. Abbildung 3.1.

Im Vergleich zur Kristallstruktur YEPNUC aus der Cambridge Kristallstruktur-Datenbank (CSD) eines 2[®]8-verknüpften Kdo-Disaccharids (Mikol et al., 1994) nehmen einige der hinzugefügten Gruppen (-C₂H₅O₂, -COO⁻) in der modellierten Struktur eine leicht veränderte Stellung ein:

In der Kristallstruktur des Kdo-Dimers ist nur eine freie Dihydroxyethylgruppe vorhanden, deren Torsionswinkel zu 75°/-50° bestimmt wurde. Demgegenüber liegt das Energieminimum in der modellierten Struktur bei -60°/-60°, allerdings tritt bei 70°/-70° ein Nebenminimum auf (s. Abbildung 3.5). Diese Differenzen können dadurch erklärt werden, daß im Kristall gegenüber der modellierten Struktur einschränkende Packungseffekte (Lifson et al., 1987; Kar et al., 1994; Billeter, 1992) auftreten.

Für die Carboxylgruppen erhält man aus der Kristallstruktur Torsionswinkel von 82°/-94° (Kdo-2) bzw. 72°/-105° (Kdo-3), wobei jeweils die zwei Werte für die äquivalenten Sauerstoffatome angegeben sind. Demgegenüber liegen die Minima der modellierten Struktur (Abbildung 3.6) bei 55°/-125° (Kdo-2) bzw. 75°/-105° (Kdo-3). Auch in diesem Fall können Einflüsse benachbarter Gruppen dazu führen, daß im Modell andere Konformationen als im Kristall energetisch begünstigt sind.

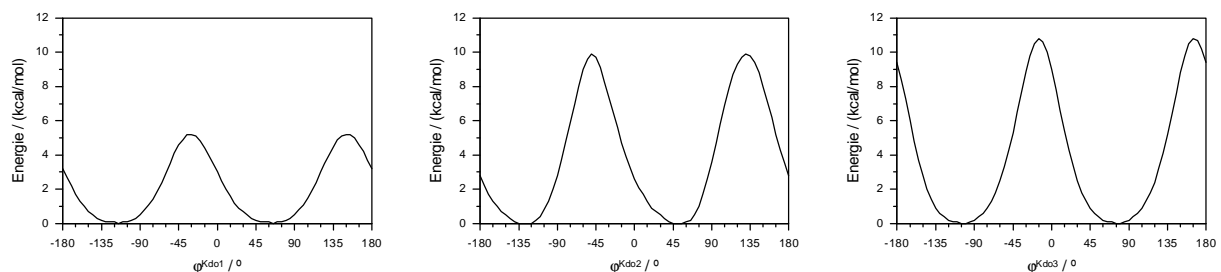


Abbildung 3.6: Relative Energie für die Rotation der Carboxylgruppen an Kdo-1 (links), Kdo-2 (Mitte) und Kdo-3 (rechts) um den Winkel ψ des Chlamydia-LPS-Modells. Alle Energien sind in kcal/mol angegeben, alle Winkel in °. Zur Definition der Torsionswinkel s. Abbildung 3.1.

Die Anbindung des *Chlamydia*-Core-Fragmentes an das Lipid A-Backbone von *E. coli* F515 erfolgte unter Beibehaltung der durch die NMR-Struktur vorgegebenen Geometrie der Kdo-GlcN-Bindung. Anschließend wurde zunächst die Kopfgruppe (bei fixiertem Lipid A) energie-minimiert. Danach wurden alle Atome freigegeben, so daß das Gesamtmolekül einer Energie-minimierung unterzogen werden konnte. Die Konformation des Lipid A wurde dabei nicht

signifikant verändert. Die resultierende Struktur stellt den Grundbaustein für den Aufbau der *Chlamydia*-Aggregate dar.

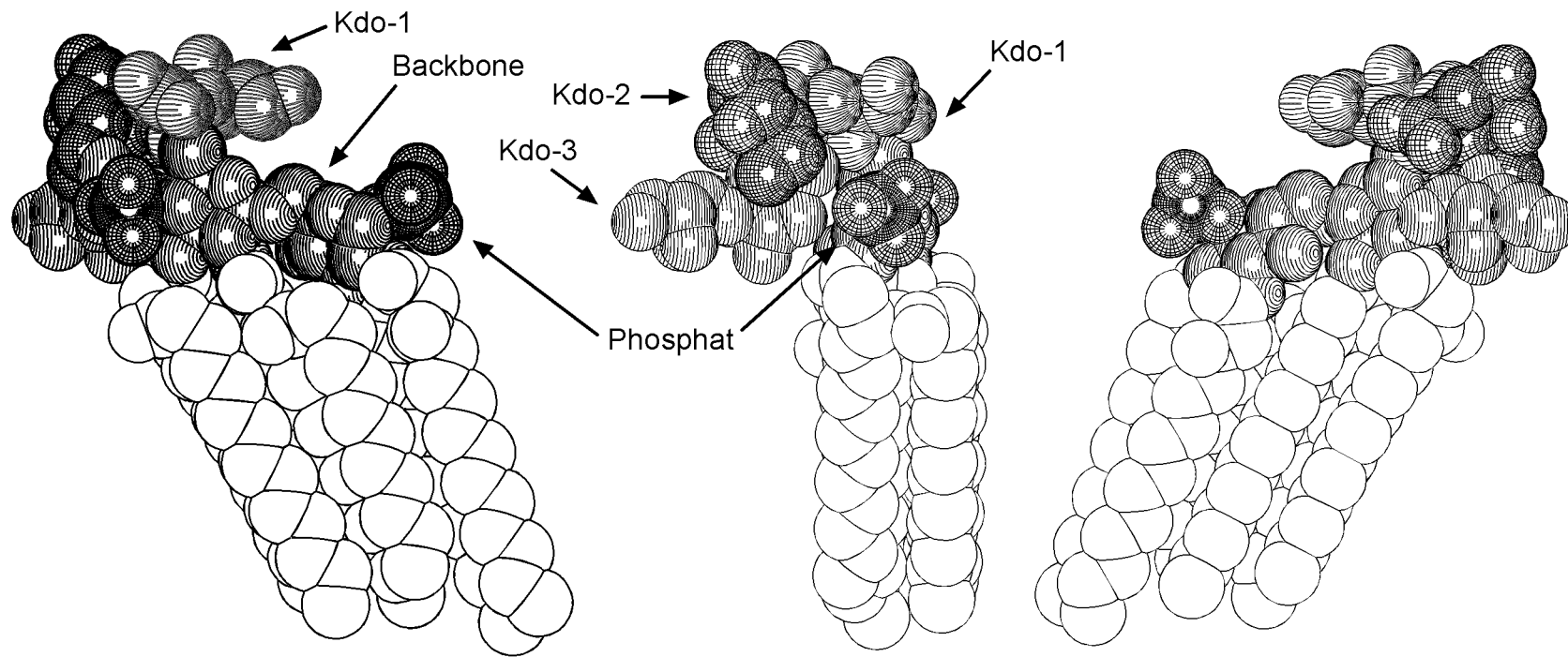


Abbildung 3.7: Die Startstruktur des Chlamydia-LPS in drei Ansichten (jeweils 90° gegeneinander rotiert). Wasserstoffatome sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht abgebildet. Die einzelnen Bereiche des LPS sind durch unterschiedliche Muster kenntlich gemacht.

3.3.5 Abmessungen und Ladungen der LPS-Modelle

Bei der Zuweisung der negativen Nettoladungen wurde beim *E. coli* ReLPS auf die Berechnungen von Din et al. (1993) zurückgegriffen, bei den anderen LPS-Modellen wurde in Übereinstimmung mit der Literatur (*E. coli*-J5: Müller-Loennies et al., 1994; *Chlamydia*: Holst et al., 1991) angenommen, daß die Carboxylat-Gruppen der Kdo-Zucker jeweils einfach negativ geladen sind. Zusammen mit den zwei negativen Ladungen, die von den jeweils einfach negativ geladenen Phosphatgruppen des Lipid A-Backbones stammen, ergaben sich die in Tabelle 3-2 aufgeführten Gesamtladungen.

Für alle LPS-Modelle wurden die von Quanta berechneten Partialladungen übernommen und in den anschließenden Rechnungen verwendet. Dieses Verfahren wurde bewußt einer quantenmechanischen bzw. semiempirischen Ladungsbestimmung vorgezogen, um die Konsistenz von CHARMM-Kraftfeld und Ladungen zu gewährleisten, da bei Kraftfeldrechnungen die Ladungen auch auf die anderen Parameter des Kraftfeldes abgestimmt sein müssen (s. Kapitel 2.2.2).

Einige Kenndaten der Moleküle sind in Tabelle 3-2 zusammengefaßt.

Tabelle 3-2: Kenndaten der in den Rechnungen verwendeten Lipopolysaccharid-Modelle. Die Länge ist entlang der Membrannormalen von den Fettsäuren bis zur Kopfgruppe gemessen. Volumen und Oberfläche wurden mit Quanta berechnet. Die Zahl der Saccharid-Einheiten gibt die Größe des Kernzuckerbereiches an.

Kenngroße / LPS	<i>E. coli</i> Re	<i>E. coli</i> J5	<i>Chlamydia</i>
Länge / Å	32	43	36
Volumen / Å ³	5064 ± 3	6484 ± 34	5358 ± 23
Oberfläche / Å ²	2086	2640	2247
Atomanzahl	351	469	377
Nettoladung	-4	-4	-5
Saccharid-Einheiten	2	7	3

3.4 Bestimmung der Packungsparameter mit MOLECULE

Der nächste Schritt auf dem Weg vom Einzelmolekül zur MD-Simulation von LPS-Aggregaten war - nach der Erzeugung der Startkonformationen der LPS-Einzelmoleküle - der Aufbau einer Monoschicht aus LPS-Molekülen. Die Untersuchung von Monoschichten als Modell biologischer Membranen ist eine etablierte experimentelle Technik (MacDonald & Simon, 1986; Swart, 1990; Ahlers et al., 1990; Chapman, 1993b). Bei Simulationsstudien an Monolayern (Ulman, 1991; Chiu, 1995) vereinfacht der Verzicht auf die Modellierung der zweiten Hälfte einer Doppelschichtmembran Aufbau und Durchführung der Rechnungen erheblich (Koch, 1998).

Bei der Erzeugung des LPS-Monolayers waren einige Voraussetzungen zu beachten, die sich aus experimentellen Erkenntnissen und theoretischen Überlegungen ableiten:

- Die Parameter müssen die Bildung einer geschlossenen Packung ermöglichen, da die Schutzfunktion der bakteriellen äußeren Membran auf ihrer Eigenschaft als Permeationsbarriere beruht, und somit in der intakten Membran *in vivo* keine Löcher durch Packungsdefekte auftreten können (Nikaido & Vaara, 1985).
- Das Packungsmuster muß mit den periodischen Randbedingungen der MD-Simulation vereinbar sein, d.h. durch Anwendung dieser Randbedingungen muß sich ein unendlicher geschlossener Monofilm bilden lassen.
- Das experimentell belegte hexagonale Packungsmuster der Fettsäuren des LPS muß beachtet werden (Labischinski et al., 1989; Kato et al., 1990a; Jung et al., 1996).
- Die experimentell am Langmuir-Trog ermittelten Flächenwerte von LPS-Molekülen in Monofilmen müssen reproduziert werden (Schultz, 1993, Koch et al., 1997).

Um die Vergleichbarkeit der anschließenden MD-Simulationen zu gewährleisten, wurde für alle drei LPS-Strukturen das gleiche Packungsmuster verwendet. Die mit Hilfe des Programmes MOLECULE (Kastowsky, 1993b) für *E. coli* ReLPS bestimmten Packungsparameter wurden aus einer Untersuchung von Koch (1998) übernommen. Aufgrund der Bedeutung eines geeigneten Membranmodells für den weiteren Verlauf der Rechnungen soll im folgenden kurz die Funktion von MOLECULE erläutert werden:

Das Programm untersucht zunächst die Packungsmöglichkeiten, die sich für zwei Moleküle ergeben. Zu diesem Zweck werden durch Rotation und Translation verschiedene Ausgangspositionen erzeugt. Anschließend werden die Moleküle durch Minimierungsrechnungen aufeinanderzubewegt und jeweils die Wechselwirkungsenergie berechnet, wobei der elektrostatische Teil nicht berücksichtigt wird. Nahe beieinander liegende optimierte Positionen werden zusammengefaßt. Die resultierenden Dimere werden anschließend zu Paaren von Dimeren zusammengepackt. Dadurch wird das Packungsmuster für ein Aggregat aus 2×2 Molekülen optimiert.

Durch visuelle Inspektion kann überprüft werden, ob das Ziel - die Bildung einer geschlossenen Membran bzw. eines Monolayers durch lückenlose Parkettierung der Membranebene mit LPS-Molekülen - erreicht wird. Als Resultat erhält man schließlich zwei Vektoren a , b und den von ihnen eingeschlossenen Winkel γ . Diese Parameter geben die Translationsvektoren für den Aufbau der Packung aus 2×2 -LPS-Molekülen an, welche die Basiseinheit für die nachfolgenden Rechnungen darstellt (Abbildung 3.8).

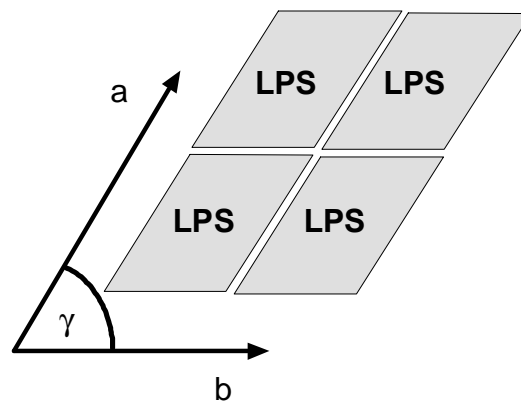


Abbildung 3.8: Aufbau der LPS-Aggregate aus LPS-Monomeren. Die Vektoren a , b und der eingeschlossene Winkel γ beschreiben die Simulationzelle aus vier LPS-Molekülen.

3.5 MD-Simulationen

Die MD-Simulationen wurden mit dem CHARMM 22-Kraftfeld (MSI) durchgeführt. Der Zeitschritt für die Integration der Bewegungsgleichung konnte auf 1 fs gesetzt werden, da Bindungen zu Wasserstoffatomen durch den SHAKE-Algorithmus (van Gunsteren & Berendsen, 1977) kontrolliert wurden (Damodaran & Merz, 1994b). Die Speicherung von Koordinaten und Geschwindigkeiten erfolgte bei jedem 100sten Schritt - also alle 0,1 ps. Die Nachbarschaftslisten für die Berechnung langreichweitiger Wechselwirkungen wurden nach jeweils 10 Integrationsschritten (10 fs) erneuert.

Für die Berechnung langreichweitiger Wechselwirkungen wurde ein Abbruchradius von 12 Å verwendet. Dieser Wert liegt im Bereich der Abbruchradien, die bei vielen Simulationen an Lipiden und Membransystemen Verwendung fanden (Raghavan et al., 1992; Böcker et al., 1992; Damodaran & Merz, 1994b; MacKerell, 1995; López Cascales et al., 1996). Der von Alper et al. (1993a, 1993b) bevorzugte Abbruchradius von 30 Å läßt sich nicht auf die vorliegende Arbeit übertragen, da zur Vermeidung von Artefakten bei Verwendung periodischer Randbedingungen der Abbruchradius kleiner als die halbe Länge der Simulationszelle gewählt werden muß (Allen & Tildesley, 1987). Zur Verbesserung des Abbruchverhaltens wurde die Energiefunktion mit der SHIFT-Funktion (Brooks et al., 1983) multipliziert. In der Membranebene wurden periodische Randbedingungen angewendet, so daß die eigentliche Simulationszelle von acht Kopien umgeben war (s. Abbildung 3.9).

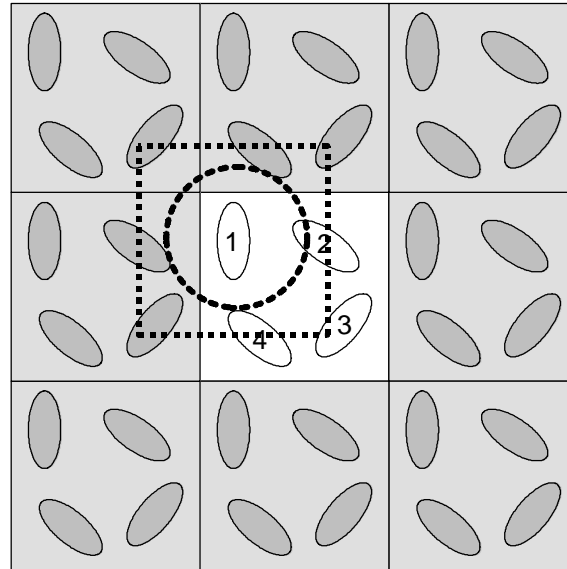


Abbildung 3.9: Die zentrale Simulationzelle (hell) mit vier LPS-Molekülen (1 bis 4) ist von 8 Kopien (sogenannten images, grau) umgeben, so daß die innenliegenden Moleküle in einem scheinbar unendlichen System eingebettet sind. Am Beispiel von Molekül 1 sind der Abbruchradius (gestrichelter Kreis) und die virtuelle Simulationzelle (gepunktetes Quadrat), die sich aus der Anwendung der periodischen Randbedingungen ergibt, angedeutet (modifizierte Abbildung nach Allen und Tildesley, 1987).

Das Protokoll der MD-Simulationen sah generell folgendermaßen aus:

- Aufheiz-Phase von 0 K auf die gewünschte Simulationstemperatur T_S
- Äquilibrierungs-Phase bei T_S
- Produktions-Phase bei T_S

Für die Auswertung wurden ausschließlich die Produktions-Phasen herangezogen. Zeitangaben bei der Auswertung beziehen sich daher stets auf den Beginn der Produktions-Phase ($t=0$).

In dieser Arbeit wurden sowohl MD-Simulationen im Vakuum als auch Simulationen unter expliziter Berücksichtigung von Wasser (und Kationen) durchgeführt. Vakuum-Simulationen bieten den Vorteil hoher Rechengeschwindigkeit, da nur eine minimale Atomanzahl berücksichtigt werden muß, während bei Einbeziehung von Wassermolekülen die Anzahl der Atome und damit auch die Rechenzeit enorm - näherungsweise quadratisch - ansteigt (van Gunsteren & Berendsen, 1990). Der Nachteil der Vakuum-Rechnungen besteht darin, daß die Eigenschaften von Atomen in der Nähe der Systemgrenzen verzerrt werden, da die Tendenz besteht, die Systemoberfläche zu minimieren und daß Probleme bei der Behandlung von

Wasserstoffbrücken auftreten (van Gunsteren & Karplus, 1981; Brooks & Karplus, 1989; Karplus & Petsko, 1990; van Gunsteren & Berendsen, 1990). Demgegenüber verbessert die Einbeziehung von Lösungsmittelleffekten den Realitätsbezug der Simulation.

Die Stabilität der Aggregate bei unterschiedlichen Flächenwerten wurde durch Vakuum-Simulationen untersucht, da auf diese Weise viele verschiedene Rechnungen für jeden LPS-Typ durchgeführt werden konnten. Andererseits wurden die MD-Simulationen zur Berechnung der exponierten Oberfläche unter expliziter Berücksichtigung von Wasser und, teilweise, von Kationen durchgeführt, da in diesem Fall Wert auf die korrekte Modellierung der Oberfläche gelegt wurde.

Einen Überblick über die durchgeführten MD-Simulationen gibt Tabelle 3-3.

*Tabelle 3-3: Zusammensetzung der verschiedenen LPS-Aggregate, die für jede LPS-Variante mittels MD-Simulation untersucht wurden. Im Vakuum werden mehrere Rechnungen bei unterschiedlichen Packungsskalierungen zwischen 95% und 140% (für *E. coli* Re bis 200%) durchgeführt.*

Packungsgröße	Packungs-skalierung / %	Wasser	Natrium	Calcium
2 × 2	95 - 140 (200)			
2 × 2	100	+		
2 × 2	100	+	+	
2 × 2	100	+		+
3 × 3	100	+		
4 × 4	100	+		

3.5.1 Aufbau und Durchführung der MD-Simulationen im Vakuum

Die MD-Simulationen im Vakuum dienen zur Überprüfung der mit MOLECULE (Kastowsky, 1993b) ermittelten Packungsparameter a , b und γ . Zu diesem Zweck wurden die beiden Packungsvektoren a und b systematisch zwischen 95% und 140% (bzw. 200% für *E. coli* ReLPS) variiert. Die Skalierungsfaktoren und die Flächenwerte sind in Tabelle 3-4 angegeben.

Tabelle 3-4: Skalierungsfaktoren, relative Flächenbelegungen und die sich daraus ergebenden absoluten Flächenwerte bei den Vakuum-MD-Simulationen (+) für verschiedene LPS-Varianten.

Skalierungs- faktor / %	relative Flächen- belegung	A _{abs} pro LPS / Å ²	A _{abs} pro Fettsäure / Å ²	<i>E. coli</i> Re	<i>E. coli</i> J5	<i>Chlamydia</i>
95	90	121,0	20,2	+	+	+
100	100	134,1	22,4	+	+	+
110	121	162,3	27,0	+	+	+
120	144	193,1	32,3	+	+	+
130	169	226,7	37,8	+	+	+
140	196	262,9	43,8	+	+	+
160	256	343,3	57,2	+	-	-
180	324	434,5	72,4	+	-	-
200	400	536,5	89,4	+	-	-

Um schnell feststellen zu können, ob die erzeugten LPS-Aggregate unter den untersuchten Bedingungen, d.h. bei unterschiedlichen Flächenwerten pro Molekül, stabil bleiben, wurden die Rechnungen im Vakuum bei einer erhöhten Simulationstemperatur T_s von 350 K durchgeführt. Die Erhöhung der Temperatur zur Beschleunigung der Durchmusterung des Konformationsraumes ist ein gängiges Verfahren in der MD-Simulation (van Gunsteren & Berendsen, 1990).

Tabelle 3-5: Protokoll der MD-Simulationen im Vakuum. Die Produktions-Phase betrug 250 ps für die Rechnungen mit Achs-Skalierungsfaktoren zwischen 95% und 140% und 100 ps für die MD mit Skalierungsfaktoren von mehr als 140%.

Phase	Dauer / ps	T _{Anfang} / K	T _{Ende} / K
Aufheizen	11,6	0	350
Äquilibrierung	25,0	350	350
Produktion	100 - 250	350	350

Die hohe, in den Kopfgruppen der LPS-Moleküle lokalisierte negative Nettoladung von -4 Elementarladungen e bei *E. coli* bzw. -5 e bei *Chlamydia*, macht im Vakuum einen besonderen Umgang mit elektrostatischen Wechselwirkungen erforderlich. Unkompensiert und ohne Abschirmung durch Wassermoleküle würden die Aggregate binnen kürzester Zeit zerstört. Daher wurde die dimensionslose relative Dielektrizitätskonstante ϵ auf 100 gesetzt. Dieser Wert hatte sich in anderen Untersuchungen als sinnvoll erwiesen (P.-J. Koch, pers. Mitteilung).

3.5.2 Aufbau der MD-Simulationszelle unter Einbeziehung von Wasser

Um die Vorgehensweise bei der Erzeugung der hydratisierten LPS-Aggregate verständlich zu machen, wird zunächst kurz deren Zusammensetzung geschildert: Durch die Verwendung zweidimensionaler periodischer Randbedingungen entsteht in der Membranebene ein scheinbar unendlicher LPS-Monolayer. Auf der hydrophilen Seite (im Bereich der Fettsäuren) grenzt er an das Vakuum, während auf der hydrophoben Seite Wassermoleküle für die Hydratisierung der Kopfgruppe sorgen. Um die Wassermoleküle gegenüber dem Vakuum abzuschließen, befindet sich oberhalb der Hydratwasserschicht eine Schicht von fixierten Wassermolekülen, welche ein Abdriften von einzelnen Wassermolekülen in das Vakuum verhindert (s. Abbildung 3.10).

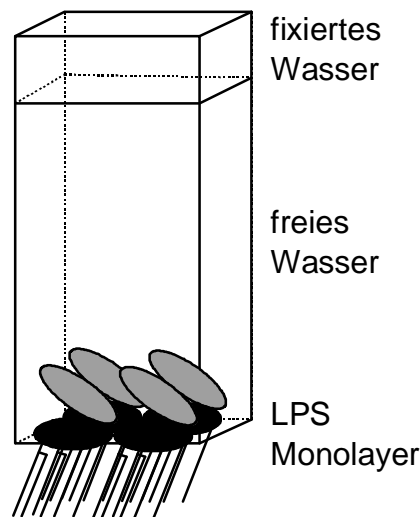


Abbildung 3.10: Aufbauprinzip der Simulationszelle hydratisierter LPS-Aggregate. Fixierte Wassermoleküle verhindern das Abdriften von frei beweglichen Wassermolekülen in das Vakuum.

Am Beispiel der 2×2 -Packung soll im folgenden das Vorgehen bei der Erzeugung der hydratisierten LPS-Aggregate erläutert werden:

Aus einer Box von bereits energieminiertem TIP3P-Wasser (Jorgensen et al., 1983) mit einer Dichte von $1,0 \text{ g/cm}^3$ wurde ein Segment herausgeschnitten, welches der Grundfläche der 2×2 -Packung aus LPS-Molekülen in der Membranebene entsprach. Zusätzlich wurde ein zweites Segment gleicher Grundfläche, aber geringerer Höhe aus der Ursprungsbox erzeugt (s. Tabelle 3-6).

Tabelle 3-6: Daten der Wasserboxen, die zur Hydratisierung der LPS-Monolayer mit vier LPS-Molekülen verwendet wurden.

Funktion	Ausgangsbox	Hydratisierung des LPS	Abschluß des Systems gegen Vakuum
Abmessungen (\AA^3)	$62 \times 62 \times 62$	$34 \times 30 \times 39$	$34 \times 30 \times 9$
Anzahl H_2O -Moleküle	8000	699	147
Status während Simulation	-	frei	fixiert

Würde man die Wasserbox direkt mit der Simulationszelle kombinieren, träten Randeffekte auf. Die Wasserbox muß deshalb an einen LPS-Monolayer angepaßt werden, der größer als die spätere Simulationszelle ist, um zu gewährleisten, daß nicht einzelne Wassermoleküle in Bereiche gelangen, wo sie die Anwendung der periodischen Randbedingungen während der Simulationen behindern.

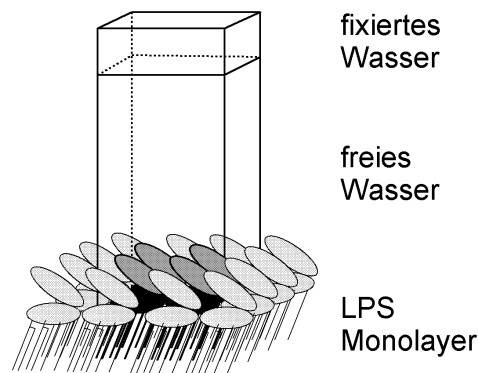


Abbildung 3.11: Schematische Darstellung des Zusammenbaus hydratisierter LPS-Packungen. Ein Monolayer aus $4 \cdot 4$ LPS-Molekülen wird mit einer Wasserbox kombiniert, die frei bewegliche Wassermoleküle enthält. Darüber befindet sich eine zweite Schicht von Wassermolekülen, die das System gegen das Vakuum abschließt und während der Simulation fixiert wird. Nach dem Zusammenfügen von LPS und Wasser werden überlappende Wassermoleküle gelöscht. Für die anschließende MD-Simulation werden nur die inneren vier LPS-Moleküle und das Wasser verwendet, die durch die Verwendung periodischer Randbedingungen in der Membranebene ein scheinbar unendliches System ergeben.

Zu diesem Zweck wurde aus der 2×2 LPS-Packung durch Translation um die Packungsvektoren a und b eine 4×4 Packung aufgebaut. Über der zentralen 2×2 LPS-Gruppe wurden die beiden Wasserensembles positioniert (s. Abbildung 3.11); die größere Box mit frei beweglichen Wassermolekülen in direktem Kontakt mit dem LPS und die kleinere Wasserbox mit fixierten Wassermolekülen oberhalb der größeren Wasserbox. Die vollständige Hydratisierung der

Kopfgruppe des LPS wurde durch Positionierung der Wasserbox auf Höhe der Phosphatgruppen erreicht. Wassermoleküle, deren Abstand zum LPS geringer als 2,6 Å war, wurden entfernt.

Anschließend wurden auch die äußeren 12 LPS-Moleküle entfernt, so daß die Simulationszelle noch die angepaßte Wasserbox (bestehend aus freiem und fixiertem Wasser) zusammen mit einer 2×2 LPS-Packung enthielt. Die oberste Wasserschicht war bei allen weiteren Rechnungen fixiert (vgl. Abbildung 3.10).

Die Basisstruktur für die folgenden MD-Simulationen bestand also aus einem Ensemble von vier LPS-Molekülen sowie freien und fixierten Wassermolekülen auf der hydrophilen Seite des LPS-Monolayers. Größere Aggregate wurden aus der 2×2 Packung durch Translation entlang der Packungsvektoren erzeugt.

Die Energie des resultierenden Ensembles wurde minimiert, wobei zunächst das LPS fixiert wurde, um eine Anpassung der hydratisierenden Wassermoleküle an die bereits im Vakuum minimierte LPS-Struktur zu ermöglichen. Anschließend wurde auch das LPS freigegeben und eine erneute Energieminimierung durchgeführt.

3.5.3 Unterschiedliche Aggregatgrößen für die MD-Simulationen von hydratisiertem LPS

Um den Einfluß der Aggregatgröße auf die Simulationsergebnisse zu untersuchen, wurden für jede der drei LPS-Varianten folgende Ensembles durch MD-Simulation untersucht: 4 (2×2), 9 (3×3) und 16 (4×4) LPS-Moleküle in Wasser.

Das Aggregat mit 16 LPS-Molekülen wurde aus der 2×2 -Basiseinheit durch Translation entlang der Packungsvektoren erzeugt, d.h. es enthält vier Kopien der ursprünglichen Simulationszelle mit vier LPS-Molekülen.

Aus der 4×4 -Einheit wurden sieben LPS-Moleküle und die darüberliegenden Wassermoleküle gelöscht, um ein Aggregat mit neun hydratisierten LPS-Molekülen zu erzeugen.

3.5.4 Aufbau der MD-Simulationszelle unter Einbeziehung von Wasser und Kationen

Die hohe Zahl negativer Ladungen im Kopfgruppenbereich der LPS-Moleküle führt bei vier Molekülen im Aggregat zu einer Nettoladung von $-16 e$ für die beiden *E. coli*-LPS bzw. $-20 e$ für *Chlamydia*-LPS. Da hinlänglich bekannt ist, daß Kationen einen erheblichen Einfluß auf das

Verhalten und die Struktur von LPS-Molekülen und ihren Aggregaten haben (Lugtenberg & Van Alphen, 1983; Nikaido & Vaara, 1985; Coughlin et al., 1983a, 1983b), wurden neben den Simulationen in reinem Wasser auch einige Rechnungen mit zwei verschiedenen Kationen als Gegenionen durchgeführt, um diesen Effekt bei den MD-Simulationen untersuchen zu können. Nach Diskussion mit Dr. K. Brandenburg (Forschungsinstitut Borstel) wurden Natrium- und Calcium-Ionen als Vertreter der ein- bzw. zweiwertigen Kationen ausgewählt.

Mit der Einbeziehung der Kationen ist die Frage verbunden, an welchen Stellen diese zu plazieren sind. Eine völlig willkürliche Platzierung würde ohne Zweifel einen starken, unkontrollierten Einfluß auf das Ergebnis ausüben, da die hohen Residenzzeiten von Kationen in der Nähe negativ geladener Gruppen eine Äquilibration durch Austausch nicht erwarten lassen. Bei einer MD-Simulation von Calcium-Ionen in Wasser wurden innerhalb einer Simulationszeit von 1 ns nur zwei bis vier der acht Wassermoleküle der ersten Hydrathülle ausgetauscht (Obst & Bradacsek, 1996). Da in Anwesenheit von Wassermolekülen die Rechenzeit enorm ansteigt und gleichzeitig alle Bewegungen gedämpft verlaufen, wurde die Positionsbestimmung im Vakuum vorgenommen. Allerdings ist es bei der hohen Zahl von acht bis zwanzig Gegenionen auch im Vakuum nicht mehr möglich, alle Positionen und Kombinationen von Positionen systematisch zu untersuchen. Daher wurde eine begrenzte Anzahl an Kationen-Ensembles generiert, die dann jeweils mit einem LPS-Monolayer kombiniert und energieminimiert wurde. Die resultierenden Strukturen wurden nach ihrem Energiewert sortiert. Die Struktur mit der geringsten Energie stellte dann den Ausgangspunkt für die anschließenden MD-Simulationen dar. Im einzelnen wurde dabei wie folgt vorgegangen:

- Zehn bis zwanzig Sätze von Kationen-Koordinaten (für 16 Na⁺- bzw. 8 Ca²⁺-Ionen im Fall des *E. coli*-LPS und für 20 Na⁺- bzw. 10 Ca²⁺-Ionen bei *Chlamydia*-LPS) wurden mit Hilfe eines Zufallszahlen-Generators erzeugt. Alle Kationen-Koordinaten liegen in einer Ebene, die der Flächenbelegung einer 2 × 2 LPS-Packung entspricht.
- Weitere zehn bis zwanzig Koordinaten-Sätze wurden auf der Grundlage der Positionen negativ geladener Gruppen des LPS erzeugt. Dazu wurde die Projektion der Koordinaten dieser Gruppen auf die Membranebene entweder direkt, oder durch Translation in der Ebene systematisch verändert, als Kationen-Koordinaten übernommen.

Die Kationen-Koordinatensätze wurden anschließend mit den aus 2×2 Molekülen bestehenden LPS-Aggregaten unter Verwendung von periodischen Randbedingungen im Vakuum Energie-minimiert ($\epsilon = 1$), wobei das LPS fixiert war. Schließlich wurde die energetisch günstigste Kombination aus LPS und Kationen ausgewählt.

Die Hydratisierung der Ensembles aus Kationen und LPS erfolgte in gleicher Weise wie für reine LPS-Monolayer:

- Aufbau einer 4×4 -Packung aus LPS-Molekülen
- Hinzufügen des Wassers (fixiert und frei)
- Entfernen aller mit dem LPS bzw. den Kationen überlappenden Wassermoleküle
- Isolierung einer hydratisierten 2×2 -Packung aus LPS
- Energieminimierung

3.5.5 Durchführung der MD-Simulationen hydratisierter LPS-Aggregate

Für die Produktionsläufe der MD-Simulationen unter Einbeziehung von Wasser (und Kationen) wurde wie bei der Untersuchung von ReLPS-Monomeren (Obst et al., 1997) eine Temperatur von 300 K (27°C) gewählt. Diese Temperatur liegt im unteren Bereich der für LPS experimentell ermittelten Werte für den Übergang von der Gel- (L_β -) in die flüssig-kristalline (L_α -) Phase. Für Rauh-Mutanten werden in der Literatur Übergangstemperaturen im Bereich $30^\circ\text{C} < T_m < 37^\circ\text{C}$ berichtet (Brandenburg & Seydel, 1984; Schultz, 1993; Wiese et al., 1997). Im Gegensatz zu hochreinen, einfachen Phospholipiden, bei denen eine scharf definierte Übergangstemperatur T_m bestimmt werden kann, erstreckt sich der Phasenübergang bei LPS über einen Temperaturbereich von mindestens 10°C (Schultz, 1993). Der exakte Wert von T_m wird auch von den Umgebungsbedingungen wie Wasser- und Ionengehalt beeinflusst, ein Vergleich zwischen Simulation und Experiment ist daher prinzipiell nur näherungsweise möglich.

In Folge der expliziten Berücksichtigung des Wassers wurde die relative Dielektrizitätskonstante ϵ auf 1 gesetzt.

Der Ablauf der MD-Simulationen unter Einbeziehung von Wasser ist in Tabelle 3-7 zusammengefaßt. Für diese MD-Simulationen wurde die mit 100% skalierte Packung, d.h. wie mit

MOLECULE ermittelt, verwendet. Eine Übersicht über alle MD-Simulationen hydratisierter LPS-Aggregate gibt Tabelle 3-8.

Tabelle 3-7: Protokoll der MD-Simulationen unter Berücksichtigung von Wasser.

Phase	Dauer / ps	T _{Anfang} / K	T _{Ende} / K
Aufheizen	10	0	300
Äquilibrierung	25	300	300
Produktion	250	300	300

Tabelle 3-8: Zusammensetzung der Simulationszelle bei den Rechnungen mit hydratisierten LPS-Aggregaten. Für LPS, Wasser und Kationen ist jeweils die Zahl der Atome angegeben.

	System	LPS	Wasser (frei)	Wasser (fix.)	Natrium	Calcium
<i>E. coli</i> Re	2 × 2 LPS	1404	1272	480		
	2 × 2 LPS-Ca	1404	1272	480		8
	2 × 2 LPS-Na	1404	1404	480	16	
	3 × 3 LPS	3159	2859	1077		
	4 × 4 LPS	5616	5088	1920		
<i>E. coli</i> J5	2 × 2 LPS	1876	1536	441		
	2 × 2 LPS-Ca	1876	1551	441		8
	2 × 2 LPS-Na	1876	1564	441	16	
	3 × 3 LPS	4221	3465	984		
	4 × 4 LPS	7504	6144	1764		
<i>Chlamydia</i>	2 × 2 LPS	1508	1137	441		
	2 × 2 LPS-Ca	1508	1170	441		10
	2 × 2 LPS-Na	1508	1131	441	20	
	3 × 3 LPS	3393	2562	981		
	4 × 4 LPS	6032	4548	1764		

3.6 Auswertungsverfahren

Zur Auswertung der Molekulardynamik-Simulationen wurde eine Reihe von Verfahren verwendet, die im folgenden beschrieben werden sollen.

3.6.1 Der Flächenbedarf des LPS und die Stabilität der LPS-Aggregate im Vakuum

Die Reaktion der LPS-Aggregate auf die Veränderung der in der Membranebene zur Verfügung stehenden Fläche wurde anhand der Positionen der 1-Phosphatgruppe der LPS-Moleküle analysiert. Die Phosphatgruppen sind Bestandteil des einheitlichen Lipid A-Grundkörpers und konnten so bei allen drei untersuchten LPS-Varianten in gleicher Weise ausgewertet werden. Zudem gibt es Untersuchungen, die darauf hinweisen, daß der inter- und intramolekulare Abstand der Phosphatgruppen eine große Rolle bei der Bindung von Wirkstoffen an Lipid A spielt (David et al., 1995).

Durch Verwendung des letzten gespeicherten Koordinatensatzes nach Abschluß der Vakuum-MD ($t = 250$ ps) bei der Auswertung wurde sichergestellt, daß die Moleküle Gelegenheit hatten, sich an die veränderte Querschnittsfläche anzupassen. Die Koordinaten des 2×2 -Aggregates wurden durch Anwendung der periodischen Randbedingungen zu einem 6×6 -Ensemble erweitert. Anschließend wurden die Koordinaten in der Membranebene (x, y) geplottet, so daß die Verteilung der Moleküle sofort visuell erfaßt werden kann.

3.6.2 Die Verteilung der Aufenthaltswahrscheinlichkeit entlang der Membrannormalen

Um einen Eindruck von den bevorzugten Aufenthaltsorten und der relativen Lage einzelner Molekülgruppen zu bekommen, wurde die Verteilung der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten dieser Gruppen bezüglich der Membrannormalen über die gesamte MD-Produktions-Phase hinweg ermittelt. Die Verteilungen sind jeweils auf eine Einheitsfläche normiert.

Wie Abbildung 3.12 zeigt, ergibt sich ein Bild, welches einen Schnitt durch die Membran entlang der Normalen widerspiegelt. Da bei der Auswertung über alle LPS-Moleküle in der Simulationszelle gemittelt wird, kann eine Verteilung mit mehreren Maxima (s. Backbone in Abbildung 3.12) einen Hinweis auf den Wechsel der Moleküle zwischen unterschiedlichen Konformationen im Verlauf der Simulation darstellen. Andererseits kann aber diese Verteilung auch aus der Mittelung mehrerer LPS-Moleküle resultieren, die unterschiedliche, aber über die Simulationsdauer stabile, Konformationen einnehmen. Im einzelnen kann dies durch eine Inspektion der Trajektorie geklärt werden.

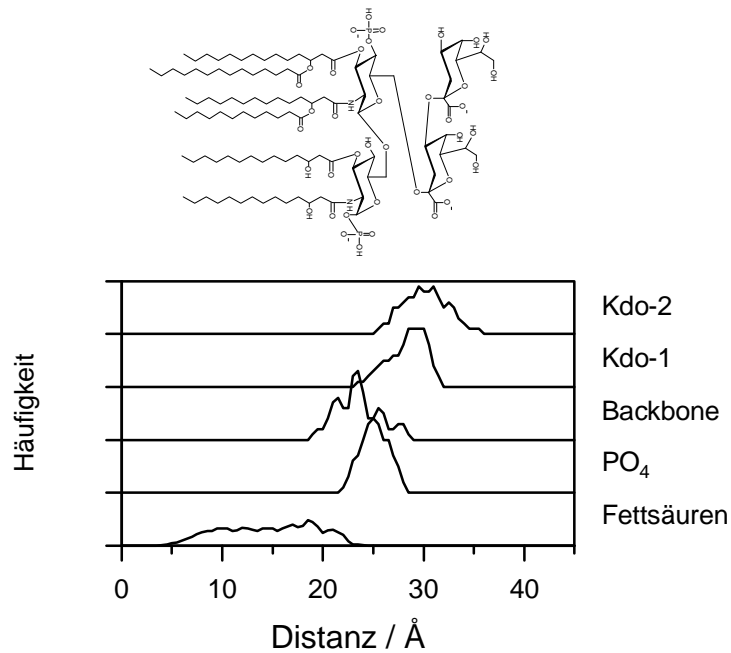


Abbildung 3.12: Schematische Darstellung des Bezugs zwischen der molekularen Gestalt und der Aufenthaltsverteilung einzelner Molekülgruppen beim ReLPS von *E. coli*.

Die Zuordnung der LPS-Atome zu den einzelnen Gruppen, die bei der Auswertung zusammengefaßt wurden, ist Abbildung 3.1 zu entnehmen. Das Backbone besteht aus GlcN-1 und GlcN-2 des Lipid A. Unter der Bezeichnung PO₄ sind die beiden Phosphatgruppen zusammengefaßt. Die Entfernungsangaben auf der Abszisse beziehen sich auf die Atome der Fettsäureketten, die von der Kopfgruppe am weitesten entfernt liegen.

3.6.3 Der Diffusionskoeffizient als Maß für die Beweglichkeit von Wassermolekülen

Der Diffusionskoeffizient D ist ein Maß für die Beweglichkeit von Wassermolekülen. Er kann aus dem mittleren Verlagerungsquadrat (mean square displacement, MSD)

$$MSD_d(t) = |r_d(t) - r_d(0)|^2$$

nach der auf Einstein (1905) zurückgehenden Beziehung

$$D = \frac{1}{3} \sum_{d=1}^3 \frac{\Delta MSD_d}{2\Delta t}$$

berechnet werden (Allen & Tildesley, 1987). In diesen Gleichungen läuft d über die drei Raumrichtungen (x , y , z); $r_d(t)$ (bzw. $r_d(0)$) ist die d -Komponente des Ortsvektors zum Zeitpunkt t (bzw. 0). In der Praxis wurde D für die drei Raumrichtungen getrennt berechnet, wobei die x -

und y-Komponenten die Diffusion in der Membranebene beschreiben und die z-Komponente die Beweglichkeit senkrecht zur Membran charakterisiert.

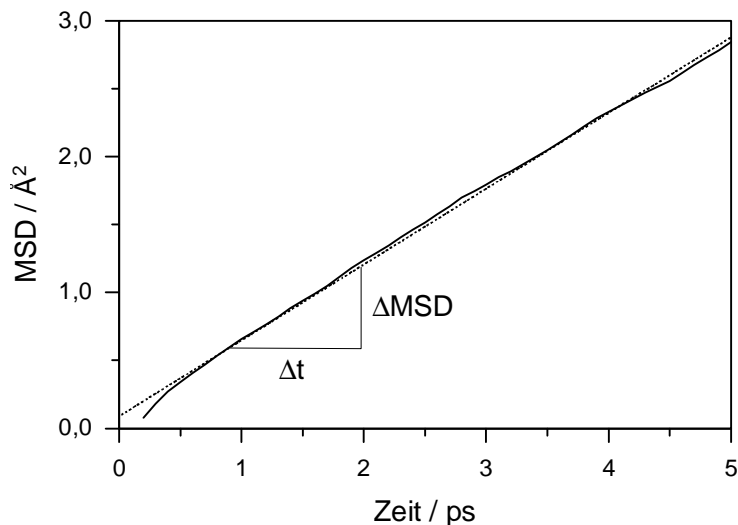


Abbildung 3.13: Zunahme des mittleren Verlagerungsquadrates MSD von Wassermolekülen mit der Zeit t . Bei kleinen Zeiten ($t < 1$ ps) verläuft der Anstieg von MSD (durchgezogene Linie) nicht linear, da in diesem Bereich die ursprünglichen, ungedämpften Bewegungen dominieren. Die Ausgleichsgerade, aus deren Steigung D berechnet wird, ist gestrichelt gezeichnet.

Für jedes Wassermolekül wurde das MSD in Intervallen von jeweils 5 ps bestimmt. Nach Ablauf eines Intervalls wurde das Wasser in Schichten von jeweils 4 Å Stärke parallel zur Membranebene eingeteilt. Die Zuordnung einzelner Moleküle zu einer Schicht erfolgte auf der Basis des mittleren Aufenthaltsortes während des Auswertungsintervalls. Nach Auswertung der gesamten Produktions-Phase wurden für jede Schicht aus den akkumulierten MSD drei Diffusionskoeffizienten D_x , D_y und D_z berechnet.

Der Wahl dieser Parameter liegen folgende Überlegungen zu Grunde:

Um die statistische Genauigkeit der Rechnung zu verbessern, ist es wünschenswert, für möglichst viele Zeitintervalle MSD-Werte zu berechnen. Wie in Abbildung 3.13 ersichtlich, dominiert bei sehr kleinen Zeitintervallen die ursprüngliche, nicht durch Stöße mit anderen Molekülen gedämpfte Bewegung (Jimenez et al., 1994), so daß das Verlagerungsquadrat nicht linear zunimmt. Um diesen Effekt zu eliminieren, muß ein größeres Zeitintervall (z.B. 5 ps) untersucht werden (Hertz, 1973).

Bei der Wahl der Schichtdicke zur Klassifizierung von Wassermolekülen nach ihrem Abstand vom LPS ist zu beachten, daß dünne Schichten zwar eine hohe Ortsauflösung bieten, aber auf-

grund der geringen Anzahl von Wassermolekülen pro Schicht die Genauigkeit abnimmt (vgl. Alper et al., 1993b). Zudem sollte ein Wassermolekül während des Auswertungsintervalls nicht mehr als eine Schicht durchqueren können, um die Zuordnung nicht zu erschweren. Es wurde daher nach einigen Vorversuchen eine Schichtstärke von 4 Å gewählt. Dieser Wert liegt zwischen der von Alper et al. (1993b) gewählten Schichtstärke von 10 Å und der von Schlenkrich et al. (1990) verwendeten Schichtdicke von 1 bis 2,5 Å.

Um den Vergleich zu erleichtern, wurden die Werte für die Darstellungen in relative Diffusionskoeffizienten (bezogen auf den jeweils höchsten Wert von D) umgerechnet und - wie bei den Aufenthaltswahrscheinlichkeitsplots erläutert - über der Membrannormalen aufgetragen.

3.6.4 Der Ordnungsgrad im Fettsäurebereich des LPS

3.6.4.1 Der Tiltwinkel

Der Tiltwinkel gibt die Verkippung der Fettsäureketten relativ zur Membrannormalen an. Zu diesem Zweck wurden für jedes LPS-Molekül und für jede Fettsäurekette Vektoren zwischen dem ersten und dem letzten Kohlenstoffatom dieser Ketten berechnet.

Wie in Abbildung 3.14 ersichtlich, ist der Winkel zwischen diesen Vektoren und der Membrannormalen der Tiltwinkel (s. z.B. Hauser et al., 1981).

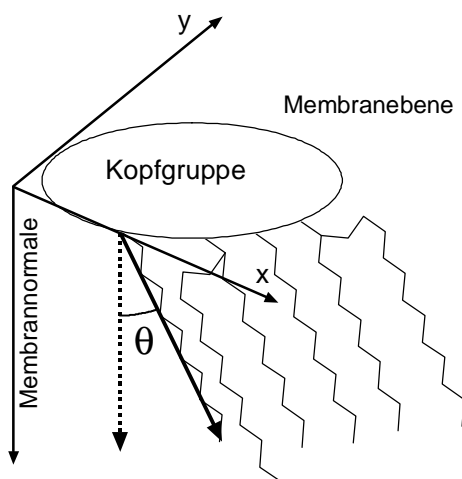


Abbildung 3.14: Der Tiltwinkel θ wird von der Membrannormalen und dem Vektor zwischen erstem und letztem Kohlenstoffatom einer Fettsäurekette gebildet. Die Vektoren x und y spannen die Membranebene auf.

Zur Berechnung der Tiltwinkelverteilung wurde jeweils die gesamte Produktions-Phase der MD-Simulationen ausgewertet.

Die Darstellung der Verteilung der Tiltwinkel erfolgt in der Form des Boxplots (Abbildung 3.15), der in übersichtlicher Form wichtige Kenngrößen einer Verteilung darstellt. Sowohl die Extremwerte der Verteilung als auch die Grenzen der Quartile sowie der Median können dieser Darstellung entnommen werden. Die Quartile schließen 50% der Verteilung ein.

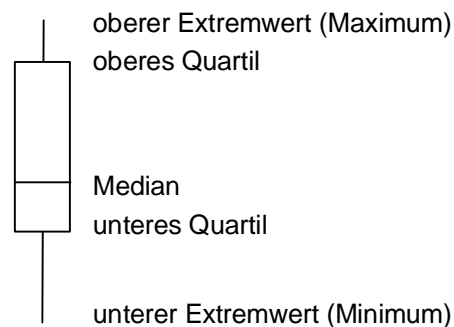


Abbildung 3.15: Der Boxplot als Hilfsmittel zur Visualisierung von Werteverteilungen. Der Median teilt die Verteilung in der Mitte. Oberhalb des oberen bzw. unterhalb des unteren Quartils liegt jeweils noch ein Viertel der Meßwerte, die Box umfaßt also 50% der Verteilung.

3.6.4.2 Die Ausdehnung der Acylketten

Die Ausdehnung der Acylketten gibt Aufschluß über den Ordnungszustand des Fettsäurebereiches. Die Ketten haben in vollständig gestrecktem all-trans-Zustand die größte Ausdehnung; durch die Einführung von gauche-Torsionen und Kinken wird die Länge reduziert. Für die Auswertung wurde bei jedem gespeicherten Koordinatensatz der Produktions-Phase jeweils die Distanz zwischen erstem und letztem Atom einer Fettsäurekette gemessen und über die gleichen Ketten (d.h. die jeweils an der gleichen Position im LPS gebunden sind) im Aggregat gemittelt. Die Darstellung erfolgt - wie beim Tiltwinkel - in Form von Boxplots, die einen guten Überblick über die Kenngrößen einer Verteilung ermöglichen.

3.6.4.3 Die Torsionswinkel im Fettsäurebereich

Für alle Bindungen im Fettsäurebereich wurden die Torsionswinkel τ berechnet und jeweils über alle LPS-Acylketten und über die gesamte Produktions-Phase der MD gemittelt. Die Torsionswinkel sind durch vier aufeinanderfolgende Kohlenstoffatome definiert, daher können bei einer Kette mit vierzehn (zwölf) Einheiten maximal elf (neun) Torsionswinkel bestimmt

werden. Die Numerierung der Torsionswinkel beginnt am Anknüpfungspunkt der Ketten am Backbone und steigt in Richtung der terminalen Methylgruppe an.

Die Auftragung erfolgt in Form von Häufigkeitsverteilungen. Die Bezeichnungen für die Winkelbereiche sind an die Arbeit von Hauser et al. (1981) angelehnt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Winkelbereich von $-180^\circ < \tau < 180^\circ$ durch Verwendung des Betrags von τ auf das Intervall $0^\circ < \tau < 180^\circ$ reduziert, da experimentelle Untersuchungen an LPS nur Angaben über den Anteil an gauche-Torsionen, nicht aber über einzelne Winkelwerte liefern. Die verwendeten Begriffe sind in Tabelle 3-9 erläutert.

Tabelle 3-9: Bezeichnungen von Torsions-Winkelbereichen bei Fettsäuren (vgl. Hauser et al., 1981).

Bezeichnung	Winkelbereich / °	Synonym
syn-periplanar	0 - 30	
syn-clinal	30 - 90	gauche
anti-clinal	90 - 150	
anti-periplanar	150 - 180	trans

3.6.4.4 Der NMR-Ordnungsparameter S_{CD}

Der Ordnungsparameter S_{CD} ist ein Maß für die Ordnung im Fettsäurebereich (Seelig & Seelig, 1974; Douliez et al., 1995) und bezieht sich auf die Stellung der Methylengruppen der Acylketten relativ zur Membrannormalen. Experimentell ist S_{CD} durch ^2H -NMR-Messungen zugänglich und für eine Vielzahl an Phospholipiden sind solche Untersuchungen publiziert worden (vgl. Seelig & Seelig, 1974; van der Meer, 1993; Douliez et al., 1995). Auch bei einer Reihe von MD-Simulationen an Phospholipiden wurde dieser Parameter berechnet (s. z.B. van der Ploeg & Berendsen, 1982; Woods & Haile, 1986; Pastor & Venable, 1988; Pastor et al. 1991; De Loof et al., 1991; Edholm & Nyberg, 1992; Heller et al., 1993; Damodaran & Merz, 1994a; Hardy & Pastor, 1994; van der Sijs & Levine, 1994; Chiu et al., 1995).

Die Berechnung erfolgt nach der Formel (Seelig & Seelig, 1974)

$$S_{CD} = \frac{1}{2} \left(3 \langle \cos^2 a \rangle - 1 \right),$$

wobei α der Winkel zwischen der Membrannormalen und dem C-H (C-D)-Vektor zwischen Kohlenstoff- und Wasserstoff- (Deuterium-)atomen einer Fettsäure-Methylengruppe ist (Abbildung 3.16). Eckige Klammern bedeuten eine zeitliche Mittelung.

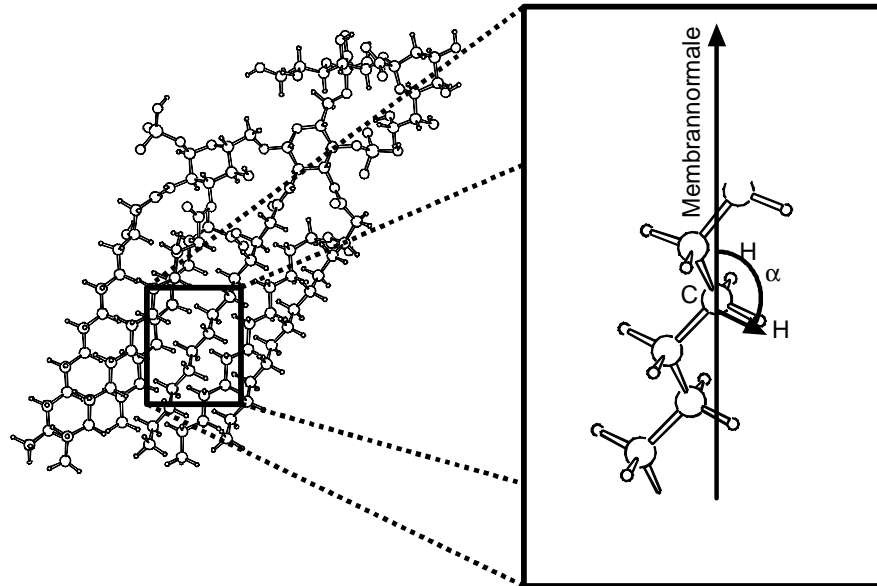


Abbildung 3.16: Definition des Winkels α zwischen der Membrannormalen und dem C-H-Vektor einer Methylengruppe.

S_{CD} kann Werte zwischen -0,5 und 1 annehmen, wobei $S_{CD}=-0,5$ einem hochgeordneten Zustand entspricht, bei dem eine Alkylkette in all-trans-Konformation vorliegt. Weist die Alkylkette keine Vorzugsorientierung bezüglich der Membrannormalen auf, so erhält man $S_{CD}=0$ (Damodaran & Merz, 1994b).

3.6.5 Die zugängliche Oberfläche (SAS)

Die Exponierung von Oberflächen-Epitopen der LPS-Aggregate wurde an Hand der zugänglichen Oberfläche (Solvent accessible surface, SAS) untersucht. Die SAS eines Moleküls ist die Oberfläche, die von einer Probenkugel mit vorgegebenem Radius berührt werden kann, wenn man diese über die Oberfläche rollt (Lee & Richards, 1971; Connolly, 1983). Üblicherweise setzt man als Probenradius den Radius eines Wassermoleküls (1,4 Å) ein (Lee & Richards, 1971; Jackson & Sternberg, 1993).

Die auf diese Weise mit $r = 1,4 \text{ \AA}$ ermittelte Oberfläche entspricht der maximal von einem im Wasser gelösten Stoff erreichbaren Oberfläche, wenn man mögliche Gestaltveränderungen des

Solutes bei Annäherung eines potentiellen Bindungspartners nicht berücksichtigt. Für biologische LPS-Bindungspartner, z.B. einen Antikörper oder ein LPS-Bindeprotein, die in ihren Abmessungen viel größer als ein Wassermolekül sind, steht demzufolge eine geringere Oberfläche als Kontaktbereich zur Verfügung.

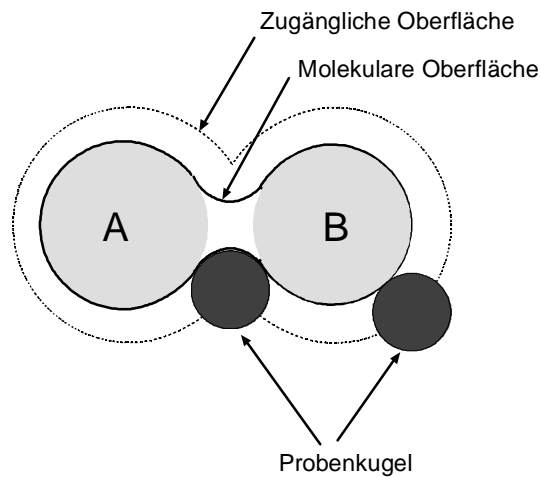


Abbildung 3.17: Die zugängliche Oberfläche (SAS, gestrichelt) des Moleküls A-B (hellgrau) wird durch Abrollen der molekularen Oberfläche (kräftige Linie) mit einer Probenkugel (dunkel) berechnet. Abbildung verändert nach Jackson & Sternberg (1993), Hermann (1994) und Totrov & Abagyan (1996).

Zur Berechnung der Oberflächen wurde die in CHARMM implementierte SURFace-Routine verwendet, die auf den Arbeiten von Lee & Richards (1971) basiert. Die Routine liefert als Ergebnis für jedes Atom die SAS in \AA^2 . Diese Werte wurden jeweils für einzelne molekulare Gruppen des LPS addiert, so daß am Ende für jede Gruppe eine absolute SAS (in \AA^2) angegeben werden konnte. Die Definition dieser Gruppen ist Abbildung 3.1 zu entnehmen. Neben den einzelnen Saccharid-Einheiten des Kernzuckerbereiches wurden noch die beiden Phosphatgruppen des Lipid A (Bezeichnung: PO_4) sowie das GlcN-Backbone des Lipid A (Bezeichnung: Backbone) für die Berechnung der zugänglichen Oberfläche herangezogen.

Die Zugänglichkeit von Atomen in einem Molekül wird durch ihre Umgebung beeinflusst. Dabei spielen sowohl intra- als auch intermolekulare Abschirmungen eine Rolle. Um die Rolle dieser Effekte beim LPS einschätzen zu können, wurden die folgenden drei Ansätze untersucht, die in Abbildung 3.18 skizziert sind:

- (1) isolierte Saccharid-Einheiten des Kernzuckerbereiches, die aus den Startkonformationen der LPS-Moleküle gewonnen wurden
- (2) komplette LPS-Monomere (jeweils in der Startkonformation)
- (3) LPS-Aggregate (d.h. eingebettet in eine scheinbar unendliche Membran)

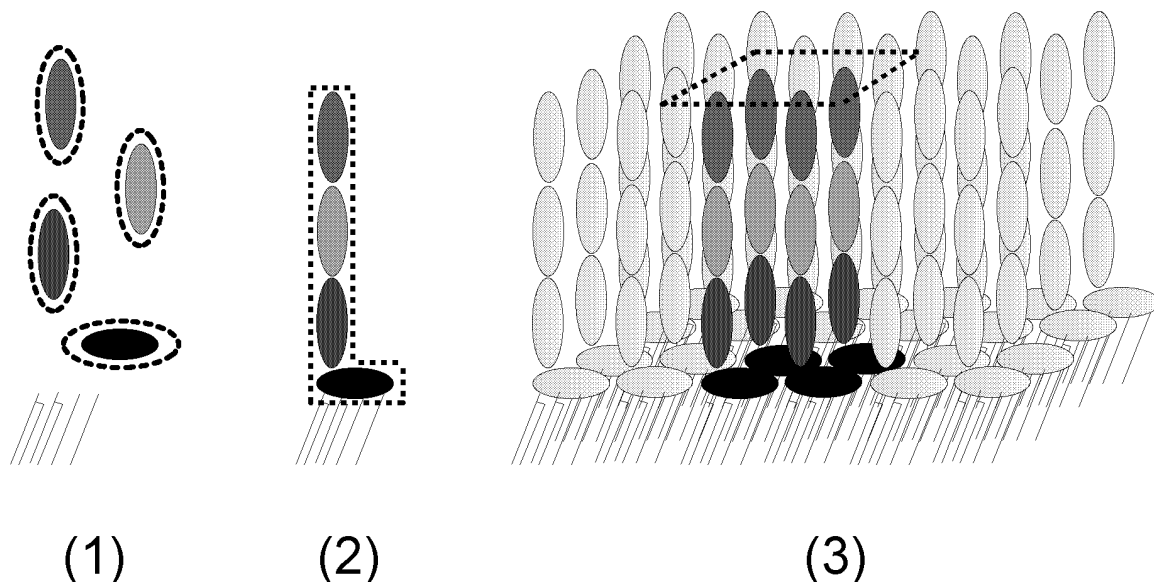


Abbildung 3.18: Die zugängliche Oberfläche (gestrichelte Linie) wurde in drei verschiedenen Ansätzen berechnet: (1) isolierte Einheiten, (2) komplette LPS-Monomere und (3) LPS-Aggregate. Bei (3) ist zur Erhöhung der Übersichtlichkeit die vorderste LPS-Schicht entfernt.

Bei der Untersuchung von Modellen von Molekül-Aggregaten (3) ist die endliche Ausdehnung der Packungen zu beachten. Damit nicht Fehler in Form von Randeffecten auftreten, wurde bei der Analyse der Exponierung die Oberfläche jeweils nur für solche Moleküle berechnet, die in der Membranebene vollständig von anderen Molekülen umgeben sind.

So sind in Abbildung 3.19 die innenliegenden Moleküle (dunkelgrau) vollständig von LPS-Molekülen (hellgrau) umgeben und nur für die inneren vier Moleküle werden Oberflächen-Werte berechnet.

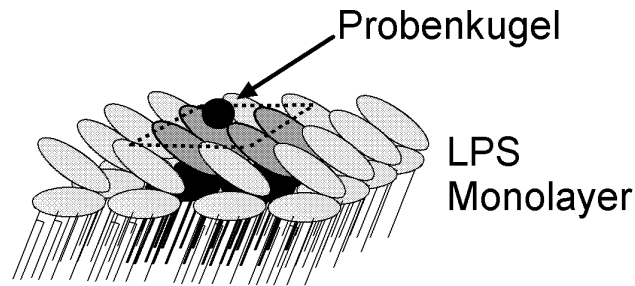


Abbildung 3.19: Berechnung der zugänglichen Oberfläche (SAS) aggregierter Lipopolysaccharide. Die Oberfläche der vier innenliegenden LPS-Moleküle (grau, innerhalb des gestrichelten Rahmens) wird mit einer Probenkugel (schwarz) abgerollt. Für jedes Atom der vier LPS-Moleküle kann die Fläche angegeben werden, die in Kontakt mit der Probenkugel steht. Dadurch, daß die inneren vier LPS-Moleküle in eine Matrix aus 12 weiteren LPS-Molekülen eingebettet sind, entspricht die auf diese Weise ermittelte SAS der Situation in einer Membran unendlicher Ausdehnung, d.h. es treten keine Randeffekte auf. Bei der Oberflächenberechnung entspricht der Radius der Probenkugel dem eines Wassermoleküls ($1,4 \text{ \AA}$). Die Zeichnung ist nicht maßstabsgetreu.

Für die isolierten Einheiten (1) und für die LPS-Monomere (2) wurde die SAS jeweils an Hand der Startkonformationen berechnet. Demgegenüber wurde die SAS der LPS-Aggregate (3) für 250 Konformationen aus der Produktions-Phase der MD-Trajektorien berechnet. Zu diesem Zweck wurde in Abständen von 1 ps jeweils ein Koordinatensatz der LPS-Moleküle als Momentaufnahme zu diesem Zeitpunkt (snapshot) herausgeschrieben, wobei Wasser und Kationen nicht berücksichtigt wurden.

Auf die Aggregate aus 2×2 LPS-Molekülen wurden dann anschließend die periodischen Randbedingungen angewendet und dadurch eine 6×6 -Packung erzeugt. Schließlich wurden die SAS-Werte mit CHARMM berechnet und für die einzelnen Atome herausgeschrieben. Die einzelnen SAS-Werte wurden schließlich mit Hilfe eines FORTRAN-Programms den einzelnen Gruppen zugeordnet und addiert.

Bei den 3×3 -Packungen wurde nur für das zentrale LPS-Molekül die Exponierung berechnet, die restlichen 8 Moleküle stellten die Membranumgebung dar.

Für die Auswertung der 4×4 -Ensembles wurden die inneren vier LPS-Moleküle herangezogen, die umgebenden 12 Moleküle bildeten die Randregion.