

## 4 Ergebnisse und Diskussion

*Bei der vorliegenden Untersuchung wurde - ausgehend von LPS-Monomeren - zunächst im Vakuum ein Monolayer-Modell entwickelt, welches dann sukzessive durch Einbeziehung von Wasser und Kationen zu einem immer realistischeren Modell einer bakteriellen Membran erweitert wurde. Dieses Kapitel gliedert sich deshalb in vier Abschnitte: Zunächst werden die Vakuum-Rechnungen vorgestellt, die zur Erzeugung der Ausgangsstrukturen für die nachfolgenden Simulationen dienten. Anschließend werden die Simulationen hydratisierter LPS-Aggregate beschrieben. Die Exposition von LPS-Oberflächenepitopen wird im dritten Abschnitt diskutiert; den Abschluß bildet die Diskussion der Konsequenzen, die sich aus diesen Ergebnissen für ein Modell der Wechselwirkung zwischen LPS und LPS-Bindungsmolekülen ergeben.*

### 4.1 LPS-Moleküle im Vakuum

Zur Vorbereitung der MD-Simulationen hydratisierter LPS-Aggregate wurden zunächst Rechnungen im Vakuum durchgeführt. Den Ausgangspunkt stellten die chemischen Strukturen der Lipopolysaccharide dar, aus denen dreidimensionale Molekülmodelle aufgebaut wurden. Anschließend wurden aus diesen Molekülmodellen einschichtige Aggregate, sogenannte Monolayer, erzeugt. Den Abschluß dieses Untersuchungsabschnittes bildeten Vakuum-MD-Simulationen zur Überprüfung der Stabilität dieser Molekülaggregate.

#### 4.1.1 Der Aufbau der Monolayer-Packung

Aus den in Kapitel 3.3 beschriebenen LPS-Monomeren wurden einschichtige Aggregate, sogenannte Monolayer, aufgebaut. Um die Ergebnisse besser vergleichen zu können, ist hierbei für alle drei LPS-Varianten die gleiche Packungsgeometrie zu Grunde gelegt worden. Dieses Vorgehen ist dadurch gerechtfertigt, daß sich die verschiedenen LPS-Modelle nur in ihren Kopfgruppen, nicht aber im hydrophoben Bereich unterscheiden: Alle drei Modelle basieren auf der gleichen Lipid A-Struktur.

Die energetisch günstigste Packungsvariante, die von Koch (1998) mit Hilfe von MOLECULE (Kastowsky, 1993b) für das *E. coli* ReLPS ermittelt werden konnte, wird durch folgende Parameter (Abbildung 3.5) charakterisiert: Zwei Vektoren  $a = 14,41 \text{ \AA}$  und  $b = 9,32 \text{ \AA}$  schließen in der Membranebene einen Winkel  $\gamma = 87^\circ$  ein. Mit Hilfe dieser Packungsparameter war

es möglich, für alle untersuchten LPS-Modelle dicht geschlossene, lückenlose Packungen aus LPS-Molekülen aufzubauen, wie es für ein realistisches Membranmodell erforderlich ist.

Bei LPS-Aggregaten wurde sowohl in elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Amano et al., 1985; Wang & Hollingsworth, 1996) als auch bei Röntgen- und Elektronen-Diffraktionsexperimenten (Kato et al., 1985; Labischinski et al., 1989) eine hexagonale Anordnung der Acylketten des Lipid A beobachtet. Folglich sollten auch die modellierten LPS-Aggregate eine solche hexagonale Struktur im Fettsäurebereich aufweisen. In Abbildung 4.1 ist ein Ausschnitt aus einem Aggregat von 16 Molekülen des *E. coli* J5-LPS dargestellt. Deutlich ist die hexagonale Periodizität der Acylketten zu erkennen. Der Abstand beträgt ca. 5 Å und ist damit etwas größer als in den LPS-Kristalliten: Kato gibt für das hexagonale Gitter eine Gitterkonstante von 4,62 Å an (Kato et al., 1990a, 1990b). Dies ist nicht verwunderlich, da die Packung in den LPS-Monolayern bewußt weiter gewählt wurde als im Kristall, um Bewegungen im Fettsäurebereich zu ermöglichen. Die für die Simulationen gewählte Temperatur von 300 K liegt in der Nähe des  $L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$ -Phasenübergangs des LPS (Schultz, 1993) von der rigideren Gel- in die flüssig-kristalline Phase, die durch stärkere Bewegungen der Fettsäuren charakterisiert ist.

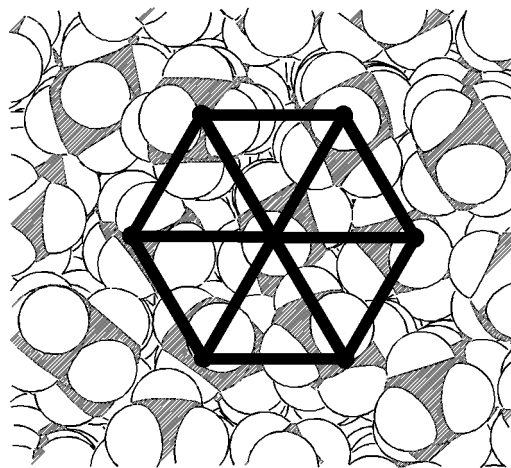


Abbildung 4.1: Ansicht der Fettsäuren von *E. coli* J5 LPS in einem Ausschnitt aus der Packung von 4 × 4 LPS-Molekülen. Das charakteristische Packungsmuster der Acylketten wird durch das Hexagon angedeutet; Kohlenstoffatome sind durch Schraffierung hervorgehoben.

Aus den Packungsparametern ergibt sich eine Fläche von  $134 \text{ \AA}^2$  pro LPS-Molekül oder ca.  $22 \text{ \AA}^2$  pro Fettsäure, wenn an ein LPS-Molekül sechs Acylketten gebunden sind. Dieser Flächenwert ist etwas größer als der Wert von ca.  $110 \text{ \AA}^2$  pro LPS-Molekül, welcher sich aus

der von Kato angegebenen Gitterkonstante im Kristallit ergibt. Auf der anderen Seite entsprechen die höheren Werte den experimentellen Befunden der molekularen Fläche in Monofilmen von Stearinsäure in der flüssig-analogen Phase (liquid-expanded Phase) (Ulman, 1991), den Messungen an Monofilmen von hochreinem *E. coli* ReLPS (Koch et al., 1997) und den Ergebnissen der theoretischen Untersuchung von Kastowsky (1993b) für *Salmonella*-LPS. Wiese et al. (1997) geben nach Monofilm-Messungen für das ReLPS von *E. coli* F515 eine Fläche von  $123 \text{ \AA}^2$  an. Dieser niedrige Wert entspricht einer Skalierung der Packungsachsen mit 95%. Die Packungsparameter wurden deshalb - wie im folgenden diskutiert - in einer Reihe von Vakuum-MD-Simulationen systematisch variiert, um für die weiteren MD-Simulationen die am besten geeignete Packung bzw. Skalierung zu bestimmen.

#### 4.1.2 Die Stabilität der Packung in der Vakuum-MD

Für alle drei LPS-Modelle wurden im Vakuum jeweils mehrere MD-Simulationen bei unterschiedlichen Flächenwerten durchgeführt. Dadurch konnte der Einfluß der Fläche, die den Molekülen in der Membranebene zur Verfügung steht, auf die Struktur und Stabilität der LPS-Packung untersucht werden. Durch Skalierung der Achsen der Packungsvektoren mit Faktoren zwischen 95% und 200% wurde die Querschnittsfläche der Membran variiert. Die Darstellung der Position der 1-Phosphatgruppe des Lipid A in der Membranebene nach 250 ps Simulation gibt ein anschauliches Bild der resultierenden Verteilung der Moleküle (s. Abbildungen 4.2, 4.3 und 4.4).

Bei allen drei untersuchten LPS-Varianten lagen bei Skalierung der Packungsparameter mit 95% bzw. 100% wohlgeordnete Strukturen vor. Bei 95% Achsskalierung war die Beweglichkeit im Fettsäurebereich stark eingeschränkt, mit zunehmender Aufweitung der Packung nahm diese Beweglichkeit zu. Demgegenüber führte eine Skalierung der Packungsvektoren mit 120% bzw. 140% zur Bildung von Molekülclustern und Lücken, d.h. die Verteilung wurde ungleichmäßig und der Monolayer war nicht mehr geschlossen.

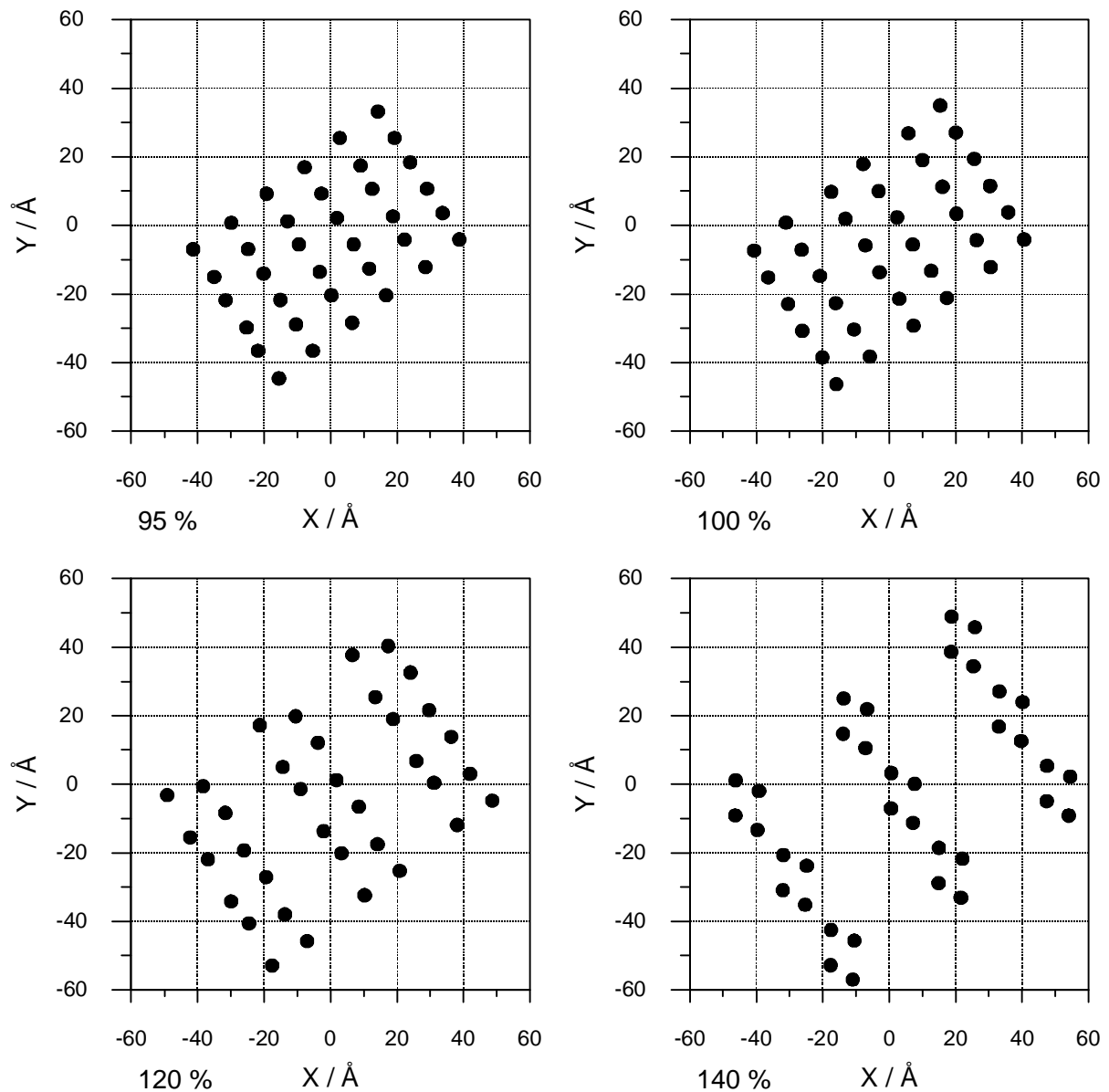


Abbildung 4.2: Position der 1-Phosphatgruppe des Lipid A von *E. coli* ReLPS in der Membranebene nach 250 ps MD-Simulation im Vakuum bei unterschiedlichen Flächenwerten pro Molekül. Die Prozentangabe bei jedem Diagramm gibt den Skalierungsfaktor der Packungsvektoren an. Durch Anwendung der periodischen Randbedingungen wurde für die Abbildung aus den Simulationen von vier LPS-Molekülen eine Packung aus 36 Molekülen erzeugt (s. Kapitel 3.6.1).

Die weitere Erhöhung des Skalierungsfaktors (160%, 180% und 200%), die für das ReLPS von *E. coli* untersucht wurde, führte erwartungsgemäß zu noch größeren Aufweitungen und Lücken. Den Molekülen stand in diesen Rechnungen so viel Platz zur Verfügung, daß es in einem Fall sogar zu einer Rotation der Fettsäureketten eines LPS-Moleküls in die Membranebene bis auf Höhe der Kopfgruppen kam. Eine völlige Umkehr eines LPS-Moleküls im Monolayer (analog einem Flip-Flop-Mechanismus) fand aber nicht statt.

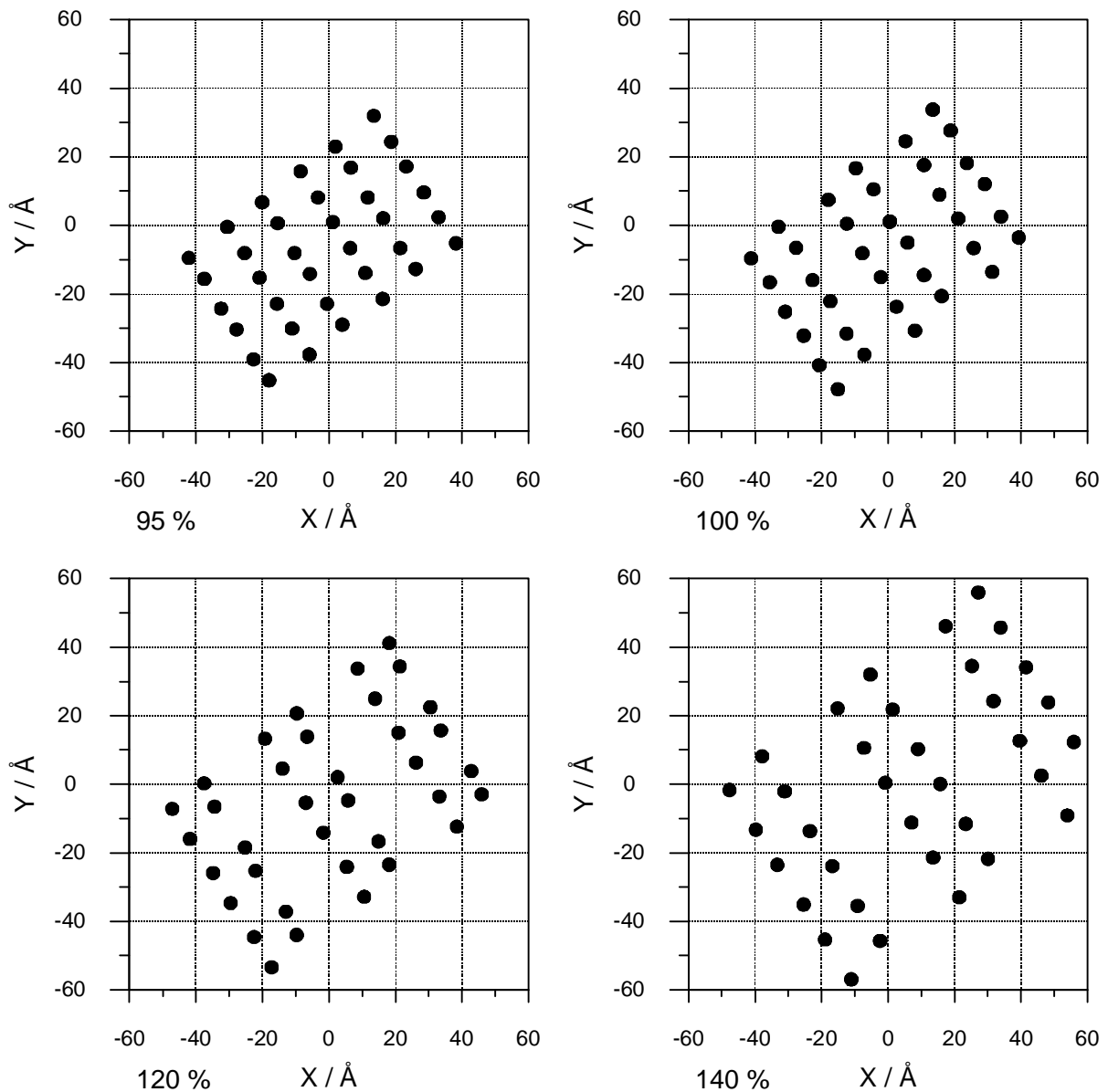


Abbildung 4.3: Position der 1-Phosphatgruppe des Lipid A von *E. coli* J5-LPS in der Membranebene nach 250 ps MD-Simulation im Vakuum bei unterschiedlichen Flächenwerten pro Molekül. Die Prozentangabe bei jedem Diagramm gibt den Skalierungsfaktor der Packungsvektoren an. Durch Anwendung der periodischen Randbedingungen wurde für die Abbildung aus den Simulationszellen von vier LPS-Molekülen eine Packung aus 36 Molekülen erzeugt (s. Kapitel 3.6.1).

Bei den Simulationen mit *E. coli* J5-LPS traten starke Bewegungen der Moleküle auf, was dazu führte, daß bei einer Skalierung der Packungsachsen auf 140% ein extrem hoher mittlerer Tiltwinkel von  $90^\circ$  beobachtet wurde. Gleichzeitig war in dieser Packung eine sehr breite Streuung der beobachteten Tiltwinkel festzustellen. Der Grund dafür lag in einer Rotation der Gruppe von vier LPS-Molekülen in die Membranebene. Dadurch, daß sich die vier LPS-Moleküle zu einem Cluster zusammenlagerten, reichten die Wechselwirkungen mit den benach-

barten virtuellen LPS-Molekülen, die durch die verwendeten periodischen Randbedingungen entstanden, nicht aus, um die ursprüngliche Orientierung aufrecht zu erhalten. Es handelt sich dabei um ein Artefakt der Simulationsbedingungen, welches unter Umständen auch darauf zurückzuführen ist, daß die Basiseinheit, für die MOLECULE (Kastowsky, 1993b) Packungen erzeugt, ein Aggregat aus vier Einheiten ist (s. Kapitel 3.4).

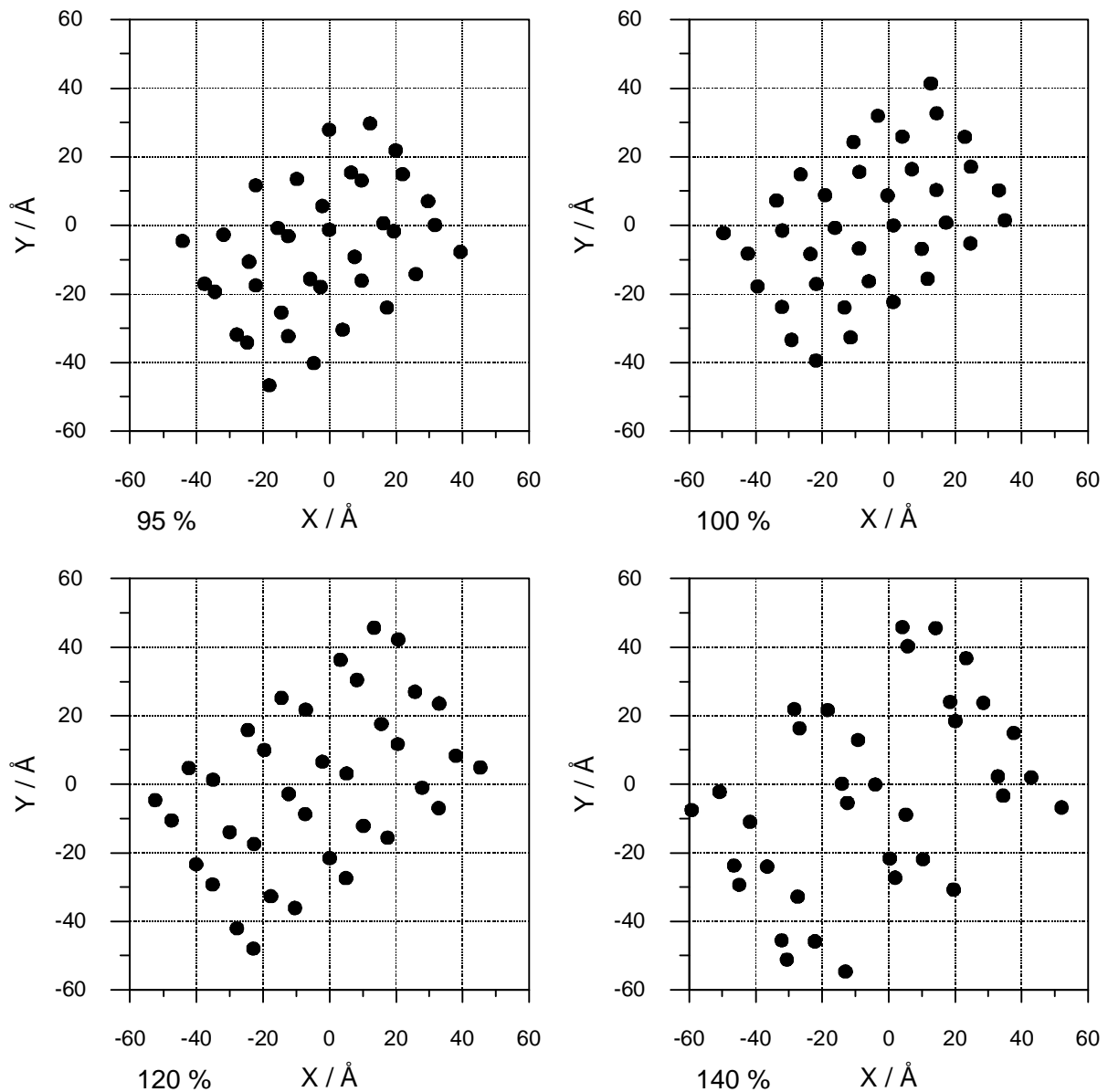


Abbildung 4.4: Position der 1-Phosphatgruppe des Lipid A von *Chlamydia*-LPS in der Membranebene nach 250 ps MD-Simulation im Vakuum bei unterschiedlichen Flächenwerten pro Molekül. Die Prozentangabe bei jedem Diagramm gibt den Skalierungsfaktor der Packungsvektoren an. Durch Anwendung der periodischen Randbedingungen wurde für die Abbildung aus den Simulationzellen von vier LPS-Molekülen eine Packung aus 36 Molekülen erzeugt (s. Kapitel 3.6.1).

Obwohl bei allen Simulationen der gleiche Lipid A-Grundkörper verwendet wurde, unterschieden sich interessanterweise die Phosphatgruppenmuster bei gleichen Skalierungsfaktoren nach Ende der Simulationsphase deutlich zwischen den drei LPS-Varianten. Beim *Chlamydia*-LPS mit 95% Achsskalierung war eine Störung des sehr regelmäßigen Musters der 1-Phosphatpositionen zu beobachten, da eine Verschiebung der LPS-Moleküle gegeneinander in Richtung der Membrannormalen Unebenheiten in der Membran zur Folge hatte. Angesichts der in den Vakuum-Rechnungen verwendeten hohen Dielektrizitätskonstanten ( $\epsilon=100$ ) kann es sich dabei nicht um eine Folge der höheren Zahl negativer Ladungen beim *Chlamydia*-LPS handeln, welches fünf und nicht, wie *E. coli*-LPS, vier negative Ladungen trägt. Offensichtlich beeinflusst die Struktur der Kopfgruppe das Packungsverhalten der LPS-Moleküle. Auch bei stärker aufgeweiteten Packungen (120%, 140%) waren deutliche Unterschiede zu erkennen: Während bei *E. coli* J5-LPS das Packungsmuster erhalten blieb, kam es bei *E. coli* ReLPS und, noch stärker, bei *Chlamydia*-LPS zu einer Umlagerung der Moleküle, die sich in einer Veränderung des Phosphatgruppenmusters widerspiegelte.

Die Reaktionen der LPS-Aggregate auf die Veränderung der Membranfläche lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: Bei 95% und 100% Achsskalierung paßten sich die LPS-Moleküle durch Veränderung ihrer Querschnittsfläche in der Membranebene und Veränderung des Tiltwinkels an die zur Verfügung stehende Fläche an. Bei Aufweitung der Packungsparameter auf mehr als 100% kam es in allen Fällen zur Bildung von Molekülclustern, denen an anderer Stelle Lücken im Monolayer gegenüberstanden. Wurde der Abstand zwischen den Molekülclustern zu groß, kam es zu einer völligen Entkoppelung der Bewegungen und es konnte nicht mehr von einer Membran gesprochen werden (s. *E. coli* J5-LPS, 140%).

Die geringe Expandierbarkeit der LPS-Aggregate in der Simulation ist insofern unerwartet, als im Experiment LPS-Monofilme auf dem Langmuir-Trog bis zu einer Fläche von  $36 \text{ \AA}^2$  pro Fettsäure ausgedehnt werden können, ehe kein Druck mehr meßbar ist, d.h. der Film von der flüssig-analogen in die gas-analoge Phase übergeht (P.-J. Koch, unveröffentlichte Ergebnisse). Dies entspricht einer Skalierung der Packungsparameter mit 126%, bezogen auf einen Ausgangswert von  $22 \text{ \AA}^2$ . Demgegenüber sind die im Vakuum simulierten LPS-Aggregate bereits bei 120% Skalierung nicht mehr in der Lage, über die gesamte Dauer des untersuchten Zeitbereichs von 250 ps eine geschlossene Schicht zu bilden. Wechselwirkung zwischen den einzelnen Molekülen und damit die Bildung einer geschlossenen Schicht ist aber die Voraussetzung für die experimentelle Messung eines lateralen Drucks im Monolayer. Diese Diskrepanz

zwischen Modell und Experiment ist vermutlich auf die geringe Größe der untersuchten LPS-Aggregate zurückzuführen, stellt aber für den weiteren Verlauf der Untersuchungen kein Hindernis dar, da für Bakterien *in vivo* die stark expandierten Phasen keine Rolle spielen.

#### 4.1.3 Der Tiltwinkel

Die Verkipfung von Molekülen um den Tiltwinkel  $\varphi$  relativ zur Membran beeinflusst die Querschnittsfläche  $A$  in der Membranebene gemäß

$$A = \frac{A_0}{\cos\varphi},$$

wobei  $A_0$  die Fläche eines senkrecht zur Membranebene ausgerichteten Moleküls ist. Typische Werte für Phospholipide liegen im Bereich zwischen  $25^\circ$  und  $30^\circ$  (Marsh, 1993). Bei der Untersuchung der LPS-Aggregate bestätigte sich der direkte Zusammenhang zwischen der zur Verfügung stehenden Fläche in der Membranebene und dem beobachteten mittleren Tiltwinkel: Im Vakuum wurden bei den engsten Packungen (95% Achsskalierung) Tiltwinkel von ca.  $20^\circ$  gemessen, und mit zunehmender Fläche stieg der mittlere Tiltwinkel auf Werte zwischen  $25^\circ$  und  $30^\circ$  (bei 100%) bzw. circa  $50^\circ$  (bei 120%) an (Abbildung 4.5). Zugleich wurde die Verteilung der beobachteten Winkel breiter, da die LPS-Moleküle größere räumliche Freiheiten besaßen und dadurch weniger stark gekoppelt waren.

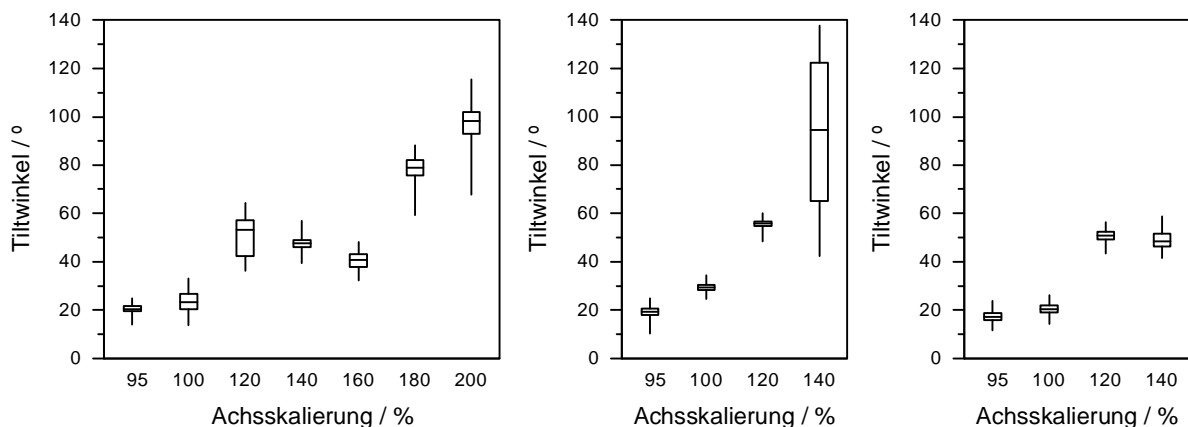


Abbildung 4.5: Tiltwinkel der Fettsäureketten von *E. coli* ReLPS (links), *E. coli* J5-LPS (Mitte) und *Chlamydia*-LPS (rechts) in Abhängigkeit von der Querschnittsfläche der Membran (ausgedrückt durch den Skalierungsfaktor der Packungsachsen). Beim Boxplot entspricht die Begrenzung der Box den Quartilen, die waagerechte Linie gibt den Median an und die senkrechten Linien verbinden die Extremwerte.



Bei einer darüber hinausgehenden Aufweitung der Packung wurden die Aggregate zerstört, was sich in einer extremen Streuung der Tiltwinkel und sehr hohen mittleren Tiltwinkeln ausdrückte. Bei *E. coli* J5-LPS in der mit 140% skalierten Packung kam es zur Rotation des gesamten Molekülensembles um  $90^\circ$ , so daß am Simulationsende die Fettsäureketten in der ehemaligen Membranebene lagen.

Peters et al. (1994) haben bei der Untersuchung eines DPG-Monolayers mittels MD-Simulation bei Erhöhung der den Molekülen zur Verfügung stehenden Querschnittsfläche um 10% eine Zunahme des Tiltwinkels von  $(2,6 \pm 2,0)^\circ$  auf  $(13,5 \pm 9,5)^\circ$  beobachtet. Dies entspricht ungefähr der Steigerung des Tiltwinkels, die bei der Aufweitung der Packung von 95% auf 100% Achsskalierung bei den LPS-Simulationen im Vakuum beobachtet wurde und unterstreicht somit die Validität der modellierten LPS-Aggregate.

#### 4.1.4 Zusammenfassung der Vakuum-MD

Das Ziel der Vakuum-MD-Simulationen war die Überprüfung der Validität der mit Hilfe von MOLECULE ermittelten Packungsparameter.

Eine Forderung an eine akzeptable, realistische Packung ist eine gleichmäßige Verteilung der Moleküle, da *in vivo* in der Membran keine Lücken entstehen dürfen, schließlich ist für die Bakterien die Integrität ihres 'Schutzschildes' überlebenswichtig (siehe z.B. Lugtenberg & van Alphen, 1983; Hancock & Bell, 1988). Auf der anderen Seite sollte nicht durch eine zu hohe Packungsdichte ein kristallartiger, unflexibler Zustand erzeugt werden, der ebenfalls nicht den natürlichen Gegebenheiten entspricht. Das Verhalten von Lipiden wird in sogenannten Phasendiagrammen beschrieben (siehe z.B. Chapman, 1993a), die unter Einbeziehung von kalorimetrischen, spektroskopischen und Röntgendaten für viele Amphiphile aufgestellt wurden. Die Übergangstemperatur  $T_C$  zwischen der rigiden  $L_b$ - und der flexibleren  $L_a$ -Phase liegt für LPS im Bereich zwischen  $30$  und  $36^\circ\text{C}$  (Brandenburg & Seydel, 1990a, 1990b, 1991b; Schultz, 1993; Wellinghausen et al., 1996; Koch et al., 1997; Wiese et al., 1997), wobei auch Wassergehalt sowie Art und Konzentration der Gegenionen eine Rolle spielen. Unter physiologischen Bedingungen, d.h. bei  $37^\circ\text{C}$ , liegt LPS daher überwiegend in der fluiden Phase vor. Folglich müssen die LPS-Moleküle in den modellierten Aggregaten soviel Platz haben, daß die Fettsäuren eine gewisse Beweglichkeit behalten und nicht, wie in einem Kristall, völlig fixiert

vorliegen. Die mit MOLECULE berechneten Packungsparameter ( $a = 14,41 \text{ \AA}$ ;  $b = 9,32 \text{ \AA}$ ;  $\gamma = 87^\circ$ , Skalierung 100%) stellen einen guten Kompromiß zwischen diesen Forderungen dar.

Für die Bildung von Molekülclustern als Reaktion auf die Aufweitung der Packung gibt es zwei mögliche Gründe: Zum einen entspricht die gewählte Größe der Simulationszelle mit vier LPS-Molekülen der Größe der mit Hilfe von MOLECULE erzeugten LPS-Packung. Es könnte daher eine Bevorzugung der Startpackung geben, die verhindert, daß die LPS-Moleküle bei Verwendung periodischer Randbedingungen ebenso intensiv mit ihren Bild-Molekülen wie mit den realen Molekülen wechselwirken. Um dies zu untersuchen, wurden MD-Simulationen mit größeren, hydratisierten Packungen durchgeführt (s. Kapitel 4.2).

Zum anderen ist bei einem LPS-Molekül die Zahl miteinander über das Backbone verknüpfter Fettsäuren höher als bei Phospholipiden. Während Phospholipide gemeinhin lediglich zwei Acylketten tragen, sind an das Glucosamin-Backbone des Lipid A, welches der Grundbaustein des LPS ist, sechs Fettsäuren gebunden. Dadurch stehen im LPS bereits intramolekular viele Partner für hydrophobe Wechselwirkungen zur Verfügung, die zur Stabilisierung der Struktur des Lipidankers beitragen können. Zudem sind die Fettsäuren durch ihre Bindung an ein gemeinsames Backbone in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt und können somit weniger frei auf die Vergrößerung des zur Verfügung stehenden Platzes reagieren. Ein entsprechendes Modell rigiderer Mikrodomänen wurde von Schultz (1993) zur Erklärung der experimentell beim Phasenübergang beobachteten Hysterese postuliert.

Auch bei den Voruntersuchungen zum Verhalten von LPS-Monomeren in Wasser war festgestellt worden, daß die Fettsäureketten eines monomeren, hydratisierten LPS-Moleküls während der Simulationen eine stabile Packung, die sogenannte Mikro-Membrandomäne, bildeten (Obst et al., 1997). Dies spricht dafür, daß die Struktur des Lipid A einen hohen Ordnungsgrad im hydrophoben Bereich begünstigt. Gleichzeitig erklärt diese Beobachtung, warum die Ketten nicht in der Lage sind, die aufgeweitete Packung auszufüllen.

In den weiteren Untersuchungen ist stets die mit MOLECULE bestimmte Packung (Skalierung 100%) verwendet worden, da sie einen guten Kompromiß zwischen Packungsdichte, Stabilität und Flexibilität darstellt und die grundlegende Voraussetzung für ein realistisches Membranmodell - die Bildung einer geschlossenen Packung - erfüllt ist.

## 4.2 Hydratisierte LPS-Aggregate

*In den folgenden Abschnitten werden zunächst die Auswirkungen unterschiedlicher Aggregatgrößen auf die Simulationsergebnisse besprochen. Anschließend wird die Positionierung der Kationen und die Beeinflussung der Beweglichkeit von hydratisierenden Wassermolekülen durch LPS und Kationen diskutiert. Danach werden Ergebnisse zum Ordnungsgrad im Fettsäurebereich vorgestellt, die Rückschlüsse auf den Phasenzustand des LPS zulassen. Den Abschluß bildet eine Diskussion der Resultate, die aus den Lösungsmittel-Simulationen gewonnen werden können.*

Nachdem mit Hilfe von Vakuum-Simulationen die Eignung der LPS-Startkonformationen überprüft worden war, sollten die Simulationsbedingungen durch Einbeziehung von Wasser und Kationen stärker an die Situation im biologischen System angenähert werden. Zur Validierung der Systeme wurden verschiedene Kenngrößen, wie z.B. Ordnungsparameter und Anteil von gauche-Torsionen herangezogen.

Bei allen MD-Simulationen, die unter expliziter Berücksichtigung von Wasser durchgeführt wurden, konnte - im Vergleich zu den Vakuum-Simulationen - eine deutliche Dämpfung der Bewegungen der LPS-Moleküle festgestellt werden. Dafür gibt es zwei Gründe: Zum einen wurden die Lösungsmittel-Simulationen bei einer geringeren Temperatur (300 K statt 350 K) als die Vakuum-Rechnungen durchgeführt, zum anderen ist bekannt, daß die explizite Berücksichtigung von Wassermolekülen zur Dämpfung von Bewegungen durch Reibung führt (van Gunsteren & Karplus, 1981; Brooks & Karplus, 1989).

Wassermoleküle drangen während der Simulationen maximal bis auf Höhe der Phosphatgruppen bzw. der Hydroxylgruppen der Acylketten in die Monolayer ein, in keinem Fall wurden Wassermoleküle im rein hydrophoben Bereich des LPS beobachtet. Ein Durchtritt von Wassermolekülen durch die Membran fand nicht statt. Diese Beobachtungen stehen in guter Übereinstimmung mit MD-Simulationsstudien an Phospholipiden (Chiu et al., 1995; López-Cascales, 1996). Gleichzeitig erklärt das Eindringen von Wassermolekülen in die Kopfgruppe bis auf Höhe des Lipid A-Backbones die experimentelle Beobachtung, daß eine erhebliche Wassermenge mit der LPS-Kopfgruppe assoziiert ist und daher bis zu einem Wassergehalt von 50% nicht ausgefroren werden kann (Brandenburg & Seydel, 1990).

#### 4.2.1 Der Einfluß der Aggregatgröße

Für alle drei LPS-Varianten wurden jeweils die drei folgenden unterschiedlichen Aggregatgrößen verwendet:  $2 \times 2$  (= 4) LPS-Moleküle,  $3 \times 3$  (= 9) LPS-Moleküle, und  $4 \times 4$  (= 16) LPS-Moleküle, um den Einfluß der Aggregatgröße und der periodischen Randbedingungen auf den Simulationsverlauf und die Ergebnisse zu untersuchen.

Bei *E. coli* ReLPS traten bei den größeren Aggregaten aus neun bzw. 16 Molekülen Unebenheiten in der Membranoberfläche auf, die bei dem aus vier LPS-Molekülen bestehenden Aggregat nicht zu beobachten waren. Einige Moleküle ragten um einige Ångström aus der Membranebene hervor. Zudem war die visuell beobachtete Kopplung der Kopfgruppenbewegungen bei den größeren Aggregaten mit neun bzw. 16 Molekülen etwas geringer ausgeprägt als bei der kleinsten ReLPS-Packung.

Während bei ReLPS mit zunehmender Aggregatgröße die Unebenheiten in der Membran zunahm, blieb beim J5-LPS der Monolayer in allen Fällen eben. Die Kopplung der Kopfgruppenbewegungen war unabhängig von der Größe der Packung sehr stark. Dies kann vermutlich auf die - im Vergleich mit ReLPS - viel größere Kopfgruppe und die damit verbundene Zunahme intermolekularer Wechselwirkungen zurückgeführt werden.

Bei *Chlamydia*-LPS schließlich waren die größeren LPS-Aggregate mit neun bzw. 16 LPS-Molekülen nicht über die gesamte Simulationsdauer stabil. Nach ca. 200 ps kam es zu Auflösungserscheinungen: Einzelne Moleküle tauchten unter die Membranebene ab, und in der Folge drangen einige Wassermoleküle bis auf die Höhe der Fettsäuren der benachbarten Moleküle in den Monolayer ein. Gleichzeitig wurden die Bewegungen der Kopfgruppen voneinander entkoppelt. Die letztgenannte Beobachtung spricht dafür, daß die bei allen Simulationen auftretenden konzertierten Bewegungen des Kernzuckerbereiches in erster Linie durch die hohe Packungsdichte verursacht wurden, d.h. dadurch, daß den Molekülen in lateraler Richtung wenig Raum zur Bewegung zur Verfügung stand.

Die auffällige Instabilität der *Chlamydia*-Monolayer verglichen mit den *E. coli*-Monolayern ist vermutlich auf die - im Vergleich zu den *E. coli* LPS-Varianten - höhere Zahl negativer Ladungen pro Molekül (Nettoladung  $-5 e$  statt  $-4 e$ ) zurückzuführen. In den Simulationen in reinem Wasser wurden diese nicht durch Kationen kompensiert, so daß eine beträchtliche negative Nettoladung entstand, die zu erheblichen intermolekularen Abstoßungen führte.

Die beobachteten Unterschiede zwischen den Monolayern mit vier LPS-Molekülen und solchen mit neun oder 16 LPS-Molekülen sind unter Umständen auch darauf zurückzuführen, daß MOLECULE - mit dessen Hilfe die Packungen erzeugt wurden - mit einer Packungszelle von vier Molekülen arbeitet, so daß die Optimierung primär für Ensembles von vier und nicht von sehr vielen Molekülen erfolgt.

Insgesamt betrachtet ist aber der Einfluß der Systemgröße auf die Simulationsergebnisse bei den hier untersuchten LPS-Aggregaten gering, so daß die Verwendung kleiner Aggregate gerechtfertigt ist. Dieses Vorgehen bietet den Vorteil, mit gleicher Rechenkapazität ein breiteres Spektrum an Varianten untersuchen zu können, als es bei der Verwendung großer Systeme mit 16 oder mehr LPS-Molekülen möglich ist.

#### 4.2.2 Die bevorzugte Position und der Einfluß der Kationen auf das LPS

Die hohe Dichte negativer Ladungen am LPS und die experimentellen Belege (Hancock & Bell, 1988) für die Bedeutung von Kationen für die Struktur und Funktion der Membran Gram-negativer Bakterien implizieren, daß den Gegenionen bei der Simulation hohe Aufmerksamkeit geschenkt werden muß. Es ist seit längerem bekannt, daß ein- und zweiwertige Kationen, insbesondere die Alkali- und Erdalkali-Ionen, zur Erhaltung der Membranintegrität beitragen und ihre Entfernung, z.B. durch Chelatoren wie EDTA, zur Zerstörung der Zellhülle führen kann (Nikaido & Vaara, 1985; Ferris, 1989; Vaara, 1992; Pelletier et al., 1994). Darüberhinaus wird den zweiwertigen Zink-Ionen eine Rolle bei der Induktion von Cytokinen durch LPS zugeschrieben, die auf der Veränderung der Fluidität des hydrophoben Bereichs des LPS beruht (Wellinghausen et al., 1996). Erste Studien zur Modellierung von Zink in MD-Simulationen sind erfolgversprechend (Obst & Bradacsek, 1997; Kuzmin et al., 1997). Schließlich zeigen Experimente, daß die Anwesenheit von Magnesium-Ionen - vermutlich durch Veränderung der Konformation des LPS - die Bindung von Antikörpern an Oberflächenepitope von *Chlamydia trachomatis* beeinflusst (Vretou et al., 1992).

In der vorliegenden Arbeit wurde durch den Vergleich von Simulationen unter expliziter Einbeziehung von ein- und zweiwertigen Kationen (Natrium, Calcium) mit Simulationen in reinem Wasser der Einfluß von Kationen auf das LPS untersucht.

Die optimale Positionierung der Kationen wurde für jedes untersuchte LPS-Aggregat individuell bestimmt, wobei durch eine systematische Analyse jeweils eine Vielzahl möglicher Positionen Berücksichtigung fand. In den Abbildungen 4.6, 4.7 und 4.8 ist für die drei LPS-Varianten

jeweils die Häufigkeitsverteilung für den Aufenthalt verschiedener Atomgruppen in Richtung der Membrannormalen aufgetragen.

Bei *E. coli* ReLPS waren die Calcium-Ionen in drei scharf getrennten Bereichen zu finden, während die Verteilung der Natrium-Ionen gleichmäßiger war (Abbildung 4.6). In einer Simulation diffundierte ein Natrium-Ion (von 16) vom LPS ab und verblieb während des weiteren Simulationsverlaufes in der Wasserphase. Dies wird in Abbildung 4.6 allerdings nicht deutlich, da die Aufenthaltswahrscheinlichkeit dort relativ gering war und sich deshalb nicht vom Hintergrund abhob.

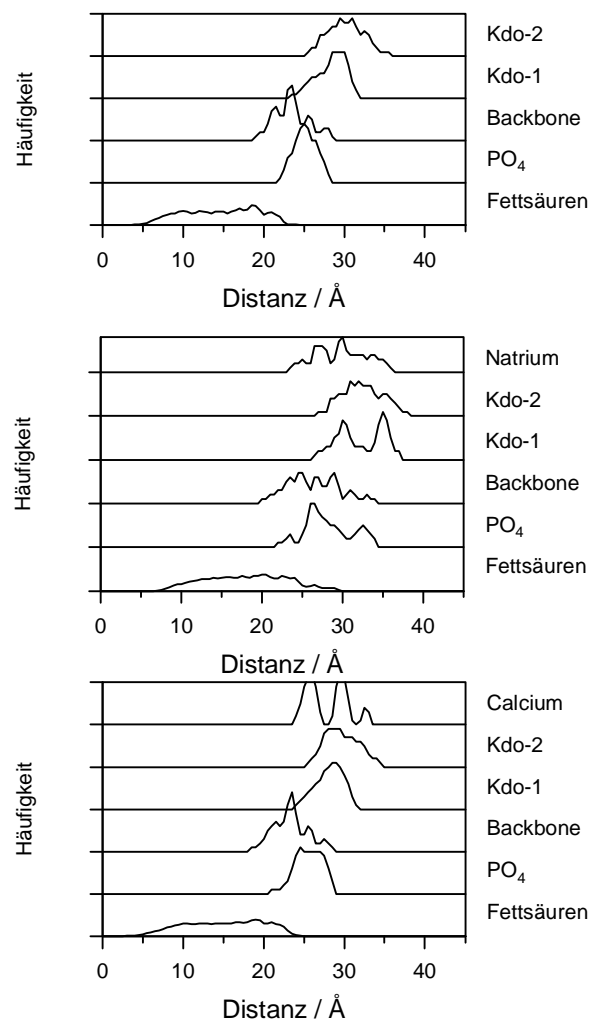


Abbildung 4.6: Relative Häufigkeit des Aufenthalts einzelner Atomgruppen bei *E. coli* ReLPS, aufgetragen in Richtung der Membrannormalen. Mittelwert über 250 ps MD- Simulation in reinem Wasser (oben), mit Natrium (Mitte) und mit Calcium (unten).

Die Calcium-Ionen waren bevorzugt gleichzeitig mit den Phosphat- und den Carboxylatgruppen des LPS assoziiert, während die Natrium-Ionen auch andere Positionen einnahmen. So

fanden sich Natrium-Ionen auch im Bereich der Hydroxylgruppen der Fettsäuren sowie in der Nähe von Phosphatgruppen, ohne dabei - wie die Calcium-Ionen - in jedem Fall inter- und intramolekulare Brücken zwischen mehreren negativ geladenen Gruppen zu bilden.

Auffällig ist der Unterschied in der Verteilung bei Kdo-1: In Wasser und mit Natrium-Ionen trat nur ein Peak auf, während in Gegenwart von Calcium-Ionen zwei scharfe Maxima beobachtet wurden. Die visuelle Untersuchung der Trajektorie ergab, daß diese Aufspaltung dadurch verursacht wurde, daß zwei LPS-Moleküle eine andere Konformation einnahmen als die beiden anderen LPS-Moleküle in der Simulationszelle (Abbildung 4.7). Beide Konformationen wurden jeweils durch die Calcium-Ionen stabilisiert und veränderten sich während der Simulation nicht signifikant. In beiden Fällen bildeten die Calcium-Ionen eine Brücke zwischen der Carboxylat-Gruppe an Kdo-2 und der 1-Phosphatgruppe eines benachbarten LPS-Moleküls. Die unterschiedlichen Kopfgruppen-Konformationen resultierten aus der unterschiedlichen Stellung der GlcN-Reste des Backbones des benachbarten LPS-Moleküls, wodurch die Phosphatgruppen andere Positionen einnahmen. Im einen Fall waren die GlcN-Reste nahezu parallel angeordnet, im zweiten Fall standen sie beinahe senkrecht zueinander.

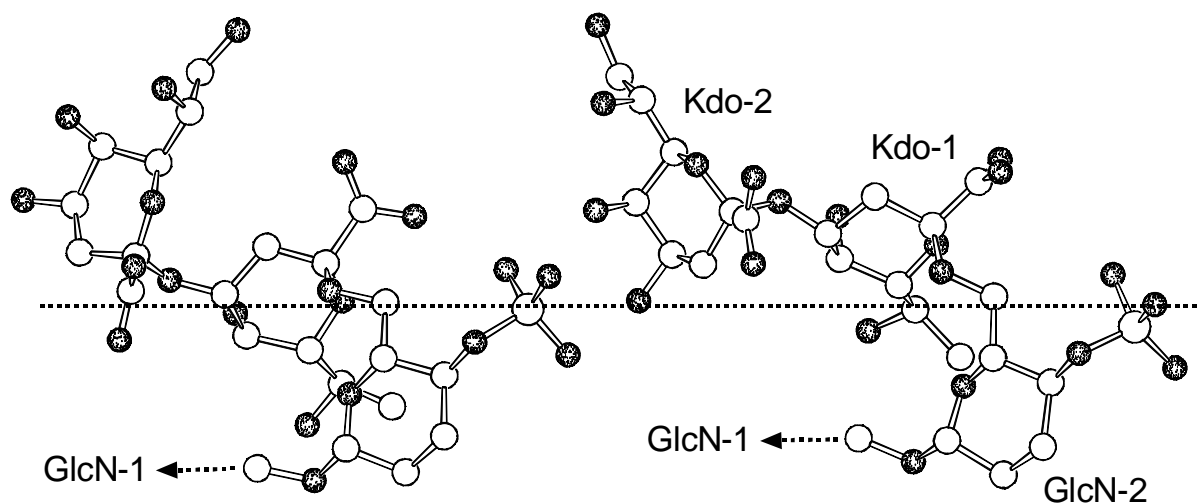


Abbildung 4.7: In Anwesenheit von Calcium-Ionen treten zwei unterschiedliche Konformationen im Kopfgruppenbereich des ReLPS von *E. coli* auf. Die Sauerstoffatome sind durch Schwärzung hervorgehoben. Die unterbrochene Linie dient als Orientierungshilfe zum Vergleich der Lage der Kdo-1-Reste beider Moleküle. Beide Konformationen treten in der Simulation gleich häufig auf. Die Calcium-Ionen sind zur Verbesserung der Übersichtlichkeit entfernt worden.

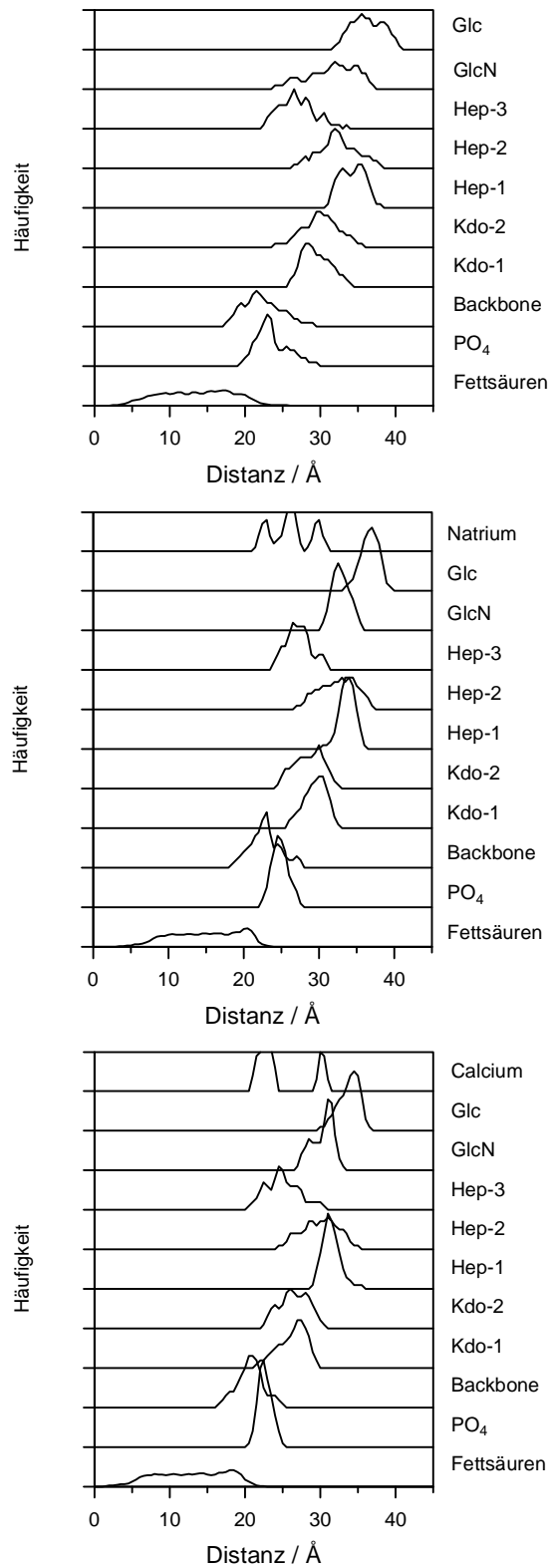


Abbildung 4.8: Relative Häufigkeit des Aufenthalts einzelner Atomgruppen bei *E. coli* J5-LPS, aufgetragen in Richtung der Membrannormalen. Mittelwert über 250 ps MD-Simulation in reinem Wasser (oben), mit Natrium (Mitte) und mit Calcium (unten).



Auch beim *E. coli* J5-LPS war die Verteilung der Calcium-Ionen schärfer konturiert als die der Natrium-Ionen (Abbildung 4.8). Calcium-Ionen waren bevorzugt im Bereich der Phosphatgruppen und zwischen Hep- und Kdo-Zuckern lokalisiert. Demgegenüber drangen einige Natrium-Ionen weit in den LPS-Monolayer ein. Sie fanden sich nicht nur in Höhe der Kdo-Zucker und der Phosphatgruppen, sondern auch tief im Monolayer zwischen den Sauerstoffatomen der Acylketten und den Phosphatgruppen.

Bei *Chlamydia*-LPS wies die Verteilung der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten für Calcium- und für Natrium-Ionen eine vergleichbare Breite auf, allerdings traten in der Verteilung der Calcium-Ionen schärfere Peaks auf (Abbildung 4.9).

Beide Ionenspezies wurden im gesamten Kernzuckerbereich, der bei *Chlamydia* ausschließlich aus Kdo besteht, angetroffen. Jeder Kdo-Zucker trägt eine negativ geladene Carboxylatgruppe, so daß den Kationen zusätzlich zu den zwei Phosphatgruppen des Lipid A eine Vielzahl weiterer Bindungspartner zur Verfügung steht. Experimentelle Untersuchungen deuten darauf hin, daß die Phosphatgruppen tatsächlich stark mit den divalenten Kationen wechselwirken, während die Rolle der Kdo-Zucker kontrovers diskutiert wird (Schindler & Osborn, 1979; Strain et al., 1983; Ferris & Beveridge, 1986; Ferris, 1989).

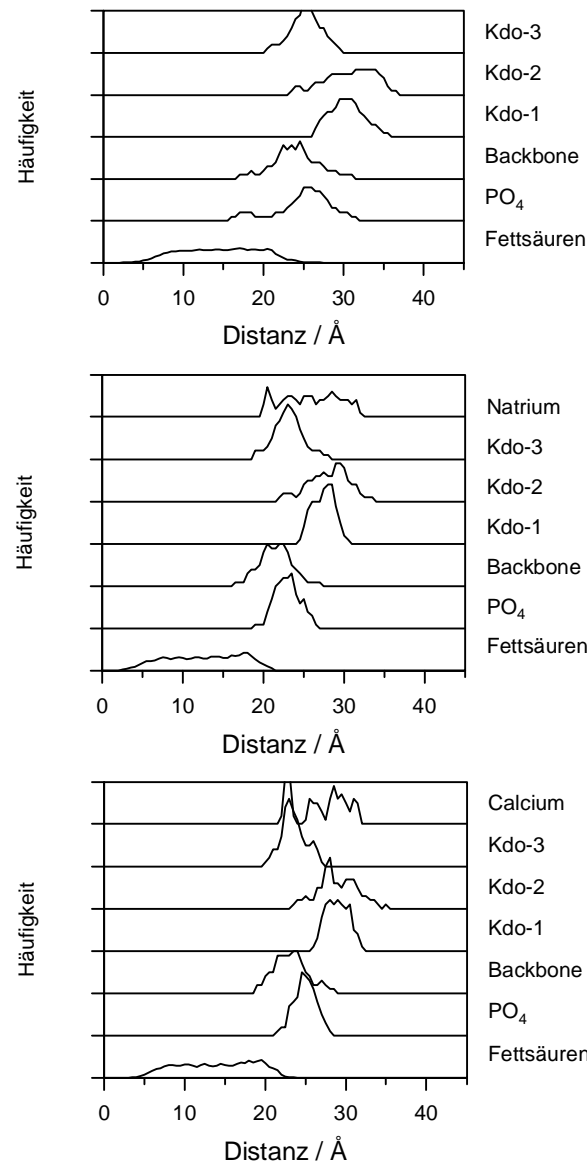


Abbildung 4.9: Relative Häufigkeit des Aufenthalts einzelner Atomgruppen bei *Chlamydia*-LPS, aufgetragen in Richtung der Membrannormalen. Mittelwert über 250 ps MD-Simulation in reinem Wasser (oben), mit Natrium (Mitte) und mit Calcium (unten).

Bei *Chlamydia*-LPS und bei *E. coli* J5-LPS blieben die Kationen während der Simulationen stets im Bereich des LPS, wohingegen beim ReLPS von *E. coli* ein Natrium-Ion während der Simulation in das bulk-Wasser abdiffundierte und dort bis zum Simulationsende verblieb. Ein ähnliches Verhalten haben auch Nicklas et al. (1991) bei der Computer-Simulation einer Membran-Wasser-Grenzfläche beobachtet: Aufgrund der Abstoßung gleichnamiger Ladungen im zur Verfügung stehenden Raum konnten sich nicht alle simulierten Natrium-Ionen an die negativ geladene Membran anlagern.

Darüberhinaus waren insbesondere bei *Chlamydia*-LPS und bei *E. coli* J5-LPS die Verteilungen der Kernzucker und der Phosphatgruppen in Anwesenheit von Kationen enger und wiesen scharfe Peaks auf. Diese Veränderung beruhte darauf, daß die LPS-Monolayer in Anwesenheit von Kationen rigider wurden und alle LPS-Moleküle eine ähnliche, bevorzugte Konformation einnahmen.

In Anwesenheit von Natrium- bzw. Calcium-Kationen waren die Bewegungen im Kopfgruppenbereich im Vergleich zu Simulationen ohne Kationen verringert, wobei Calcium-Ionen die Bewegungen stärker dämpften als Natrium-Ionen. Der Grund für die Reduzierung der Bewegungen des Kernzuckerbereiches liegt in der Lokalisation der Kationen innerhalb der Kopfgruppen. Bei allen untersuchten LPS-Packungen bilden Calcium- und Natrium-Ionen sowohl intra- als auch intermolekulare Brücken innerhalb des LPS-Monolayers. Die Ionen tragen auf diese Weise zur Stabilisierung und Rigidifizierung der Membran bei (Schindler & Osborn, 1979; Coughlin et al., 1985; Ferris, 1989; Schultz, 1993, Kastowsky, 1993a). Bereits bei der Untersuchung von hydratisierten ReLPS-Monomeren wurde die Versteifung der LPS-Moleküle in Gegenwart von Kationen in diesem Sinne interpretiert (Obst et al., 1997). Während beim Monomer nur intramolekulare Brücken zur Fixierung des LPS beitragen können, kamen bei den hier untersuchten LPS-Monolayern zusätzlich noch die intermolekularen Verklammerungen hinzu.

Die Bildung intermolekularer ionischer Brücken wird auch durch Monofilm-Studien bestätigt. Dort wurde beobachtet, daß ein *E. coli* ReLPS-Monofilm bei gleichem lateralen Druck in der Gegenwart von Calcium-Ionen eine ca. 10% geringere Fläche als in Anwesenheit von Natrium-Ionen belegt, d.h. die Calcium-Ionen bewirken eine dichtere Packung der LPS-Moleküle im Monofilm (C. Kahle, unveröffentlichte Ergebnisse). Eine analoge Kontraktion der Aggregate bei den MD-Simulationen ist nicht möglich, da dies die verwendeten periodischen Randbedingungen nicht erlauben.

Die beobachteten Unterschiede in der Wirkung von Natrium und Calcium auf die simulierten LPS-Aggregate entspricht damit nicht nur experimentellen Befunden (Ferris, 1989; Schultz, 1993), sondern korreliert auch mit zwei Beobachtungen: Während die zweiwertigen Ionen nur wenige verschiedene Positionen einnehmen, steht den einwertigen Kationen eine Vielzahl von Bindungsstellen offen. Zudem liegen die typischen Calcium-Bindungsstellen meist tiefer im Monolayer verborgen und ermöglichen die Bildung von intermolekularen Brücken. Demgegen-

über sind die Natrium-Ionen auch an der Oberfläche des Monolayers zu finden, wo sie leichter gegen Wassermoleküle ausgetauscht werden können und nicht in jedem Fall auch an intermolekularen Brücken teilnehmen.

Aus einer MD-Studie zu den Eigenschaften von hydratisierten Alkali- und Erdalkali-Ionen (Obst & Bradaczek, 1996) ist bekannt, daß die mittlere Residenzzeit von Wassermolekülen in der Nähe von Natrium-Ionen ca. 15 ps beträgt, während in der Nachbarschaft von Calcium-Ionen Aufenthaltszeiten von mehr als 1000 ps beobachtet wurden. Auch experimentell wurde bei negativ geladenen Phospholipiden L beobachtet, daß die Assoziationskonstante

$$K_{Ass} = \frac{[ML]}{[M][L]}$$

für Alkali-Ionen M im Bereich von  $K_{Ass}(M^+) \approx 0,05 - 1 \text{ M}^{-1}$  liegt, während sie bei den Erdalkali-Ionen mit  $K_{Ass}(M^{2+}) \approx 10 - 20 \text{ M}^{-1}$  um ein bis zwei Größenordnung höher ist (Marsh, 1993). Aus dem Vorangegangenen ist zu schließen, daß auch beim LPS, welches nicht nur - wie Wasser - negative Partialladungen, sondern sogar ganze negative Ladungen auf den Phosphat- und Carboxylatgruppen trägt, Calcium dauerhafter und stärker als Natrium gebunden wird und Calcium-Ionen deshalb die stärkere Kontraktion und Rigidifizierung des Monolayers bewirken. Die doppelte positive Ladung der Calcium-Ionen - und damit die höhere Ladungsdichte - ist die Ursache für die stärkere rigidifizierende Wirkung verglichen mit Natrium.

Auf der anderen Seite bedeuten die hohen Residenzzeiten aber auch, daß nur ein sehr geringer Austausch zwischen einzelnen Kationenpositionen erfolgt, d.h. eine einmal vorgegebene Kationenverteilung bleibt über lange Zeit erhalten. Es ist daher äußerst wichtig, die Ausgangspositionen der Kationen sorgfältig zu bestimmen, wie es in dieser Arbeit durch die Analyse einer Vielzahl möglicher Bindungsvarianten getan wurde.

#### 4.2.3 Der Einfluß von LPS und Kationen auf die Hydrathülle

Um einen Eindruck zu bekommen, in welchem Ausmaß die Anwesenheit von Kationen und LPS die Mobilität von Wassermolekülen, die sich in ihrer Nähe befinden, beeinflusst, wurde die Diffusion von Wassermolekülen in Abhängigkeit von ihrer Entfernung vom LPS untersucht. Aufgrund elektrostatischer und sterischer Effekte des LPS-Monolayers sollten - wie bei Phospholipiden - deutliche Unterschiede zwischen Wasser an der Grenzfläche und bulk-Wasser auftreten (Tocanne & Teissié, 1990; Cevc, 1990).

Da die Befunde bei allen untersuchten LPS-Varianten vergleichbar sind, wird im folgenden nur das Beispiel des *E. coli* J5-LPS ausführlich diskutiert. In den Abbildungen 4.10, 4.11 und 4.12 ist die Beweglichkeit  $D_{\text{relativ}}$  von Wassermolekülen in verschiedenen Abständen vom LPS dargestellt. Zu diesem Zweck wurden die Wassermoleküle in Schichten von jeweils 4 Å Stärke eingeteilt. Zum Vergleich ist darunter jeweils die Aufenthaltswahrscheinlichkeit einzelner Gruppen des LPS dargestellt.

Unabhängig von der Anwesenheit von Kationen war die Beweglichkeit von Wassermolekülen, die sich innerhalb der Kopfgruppenregion des LPS befinden, drastisch reduziert. Sie betrug maximal 30% des Wertes, der in freiem Wasser erreicht wird. In gleichem Maße beeinträchtigten die fixierten Wassermoleküle (im Bereich von  $60 \text{ \AA} < r < 70 \text{ \AA}$ ), welche das System gegen das Vakuum abschlossen, die Beweglichkeit der freien Wassermoleküle. Dies steht in guter Übereinstimmung mit NMR-Experimenten von Halle & Picullel (1986), die beobachtet haben, daß die Diffusion von Wassermolekülen in der Nähe kolloidaler Oberflächen um zwei bis drei Größenordnungen reduziert ist. Auch Raghavan et al. (1992) haben bei der Simulation von Wassermolekülen zwischen zwei DLPE-Bilayern beobachtet, daß die Wassermoleküle in der Nähe der Bilayer eine stark reduzierte Diffusion aufweisen. In hydratisierten DPPC-Multilayern konnte experimentell zwischen zwei Gruppen von Wassermolekülen unterschieden werden: Fest gebundenes Wasser, welches nur Rotationsfreiheitsgrade besitzt und ungebundenes Wasser, welches auch Translations-Bewegungen unterliegt (König et al., 1994). Dies steht in Übereinstimmung mit den Beobachtungen an hydratisierten LPS-Monolayern. Für die verringerte Beweglichkeit der Wassermoleküle in der Nähe fester Hindernisse gibt es vermutlich mehrere Gründe:

- Die LPS-Kopfgruppen bewegen sich nur sehr gedämpft und übertragen daher nur wenig kinetische Energie durch Stöße auf die benachbarten Wassermoleküle. Dies gilt umso mehr für die fixierten Wasseratome am oberen Rand der Simulationszelle. Bei einem Vergleich der Wasserdiffusion in der Umgebung flexibler und starrer DLPE-Kopfgruppen stellten Raghavan et al. (1992) fest, daß die thermische Bewegung der Lipid-Kopfgruppen die Beweglichkeit der Wassermoleküle deutlich steigert.
- Die Wassermoleküle können feste Wasserstoffbrücken zu den polaren Atomen der LPS-Kopfgruppe bzw. den fixierten Wassermolekülen ausbilden, da sich diese weniger bewegen

als freie Wassermoleküle im Bulk. Durch dieses stabile Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk werden die Verweilzeiten gegenüber dem Bulk erhöht.

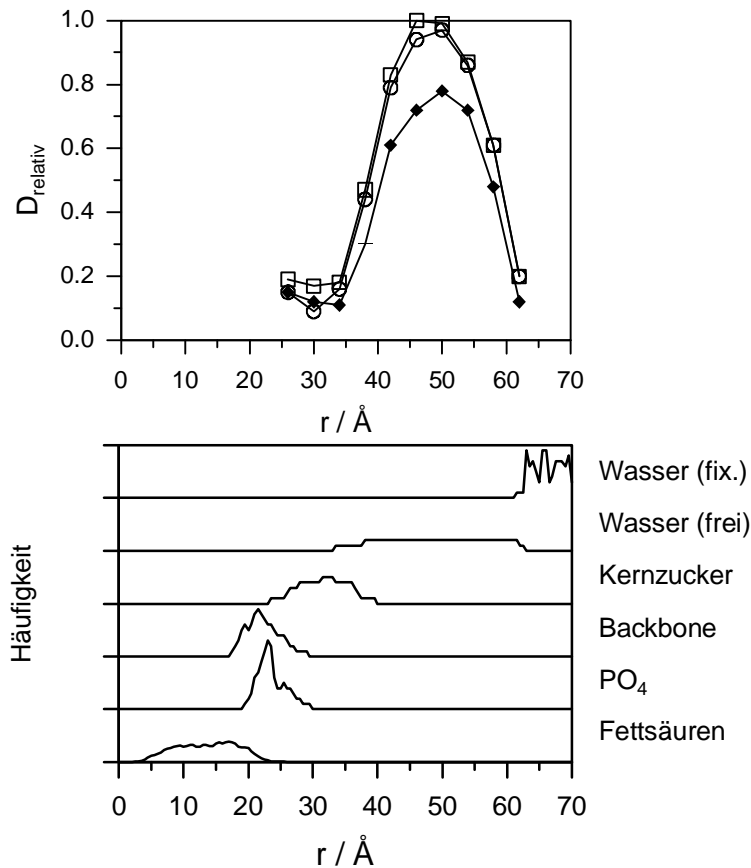


Abbildung 4.10: Relativer Diffusionskoeffizient von Wassermolekülen (oben) und Häufigkeit einzelner Gruppen (unten) bei der Simulation von vier *E. coli* J5-LPS-Molekülen.  $D_{\text{relativ}}$  bezieht sich auf den maximalen Wert des Diffusionskoeffizienten und ist in Abhängigkeit von der Entfernung  $r$  aufgetragen.  $r$  ist in Intervalle von  $4 \text{ \AA}$  eingeteilt und gibt den Abstand vom LPS-Lipidanker an. Offene Symbole: Mobilität in der Membranebene (Kreis:  $x$ , Quadrat:  $y$ ); schwarze Raute: Bewegung in Richtung der Membrannormalen ( $z$ ).

Nach den drei Raumrichtungen getrennt betrachtet, fällt die Anisotropie der Diffusion der Wassermoleküle auf: Parallel zur Membranebene war die Beweglichkeit höher als in Richtung der Membrannormalen. In den Bereichen behinderter Diffusion, d.h. in den Randbereichen, war diese Differenz geringer ausgeprägt als in Bereichen, in denen der maximale Diffusionskoeffizient erreicht wurde. Dabei spielten auch die Gegenionen eine Rolle: In Abwesenheit von Kationen (Abbildung 4.10) war der Unterschied zwischen der Beweglichkeit in Richtung der Membrannormalen (schwarze Raute) und der Beweglichkeit in der Membranebene (offene Symbole) besonders ausgeprägt: Senkrecht zur Membran betrug der Diffusionskoeffizient nur 80% des maximalen Wertes, der parallel zur Membran erreicht wurde.

Die beobachtete Anisotropie der Mobilität steht in guter Übereinstimmung mit Untersuchungen von Schlenkrich et al. (1990), die bei der Simulation einer Membran-Wasser-Grenzschicht eine um 70% bis 80% reduzierte Diffusion in Richtung der Membrannormalen, verglichen mit Bewegungen parallel zur Membranebene, beobachteten. Demgegenüber wurden Neutronen-Streuungs-Experimente (QENS) bei DPPC dahingehend interpretiert, daß Wassermoleküle über Distanzen von weniger als 10 Å einer isotropen Diffusion unterliegen (König et al., 1994). Dies kann sowohl auf die einfachere Struktur der DPPC-Kopfgruppe als auch die vereinfachenden Annahmen bei der Interpretation der QENS-Experimente zurückgeführt werden, wenn man in Betracht zieht, daß die Anisotropie in den MD-Simulationen nur 20 bis 30% betrug.

Der Einfluß fixierter Wassermoleküle oder wenig beweglicher Atome der LPS-Kopfgruppen erstreckte sich etwa 10 Å weit in das freie Wasser hinein, wobei der genaue Wert durch die Klassifizierung des Wassers in Schichten von 4 Å Stärke nicht angegeben werden kann. Dieser Wert (10 Å) stimmt in etwa mit dem Abbruchradius für die Berechnung langreichweitiger Wechselwirkungen  $r_{\text{cut}}$  überein, der bei diesen Rechnungen 12 Å betrug. Man könnte daher vermuten, daß es sich um ein Artefakt der verwendeten Abbruchradien handelt. Gegen diese Hypothese spricht, daß bei verschiedenen Simulationen mit kleineren Abbruchradien vergleichbare Reichweiten der Wasserstrukturierung beobachtet wurden: Bei der Untersuchung von Struktur und Dynamik von Wasser an unterschiedlichen Oberflächen haben Lee & Rossky (1994) einen Abbruchradius von 8,5 Å verwendet. Sie stellten Störungen der Wasserstruktur bis zu einer Entfernung von 10 Å von der Oberfläche fest. Die Strukturierung des Wassers oberhalb einer Modellmembran erstreckte sich bei einer Untersuchung von Nicklas et al. (1991) über einen Bereich von 7 bis 8 Å, wobei ein Abbruchradius von 11 Å verwendet wurde. Cevc (1990) gibt aufgrund experimenteller Befunde eine Reichweite der Grenzschicht-Hydratisierung von 7 bis 40 Å bei biologischen Membranen an. Diese Befunde stehen in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden LPS-Simulationen.

Auf der anderen Seite stellten Alper et al. (1993a, 1993b) bei der Simulation eines DMPC-Monolayers fest, daß die Verwendung von Abbruchradien von 10 bis 14 Å zu Störungen von Eigenschaften des Wassers führte, die bei Erhöhung des Abbruchradius auf 30 Å nicht mehr beobachtet wurden. Unter anderem maßen die Autoren bei Verwendung kleiner Abbruchradien eine 25%ige Zunahme der Bewegungen von Wassermolekülen in der Nähe des DMPC-Monolayers verglichen mit bulk-Wasser. Dies steht in starkem Kontrast zu dem bei den LPS-Simulationen und anderen Lipid-Simulationen beobachteten Verhalten. Unter Umständen ist dieser

Unterschied darauf zurückzuführen, daß Alper et al. bei der Berechnung der elektrostatischen Wechselwirkungen jeweils mehrere Atome zu Gruppen zusammenfaßten, während üblicherweise alle Atome getrennt behandelt werden.

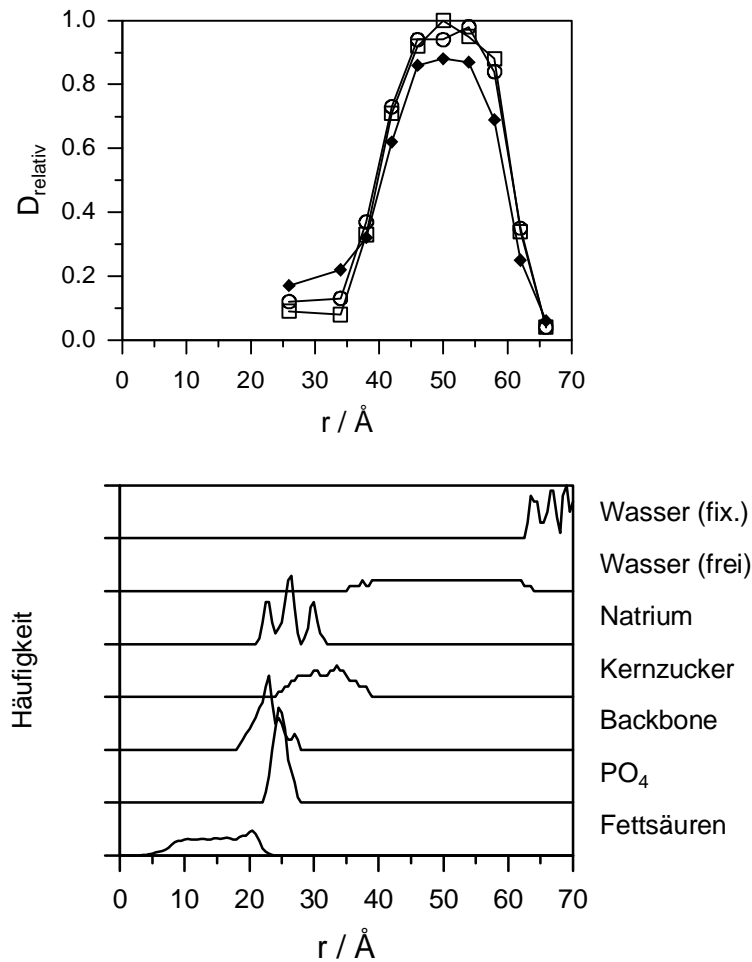


Abbildung 4.11: Relativer Diffusionskoeffizient von Wassermolekülen (oben) und Häufigkeit einzelner Gruppen (unten) bei der Simulation von vier *E. coli* J5-LPS-Molekülen mit Natrium.  $D_{\text{relativ}}$  bezieht sich auf den maximalen Wert des Diffusionskoeffizienten und ist in Abhängigkeit von der Entfernung  $r$  aufgetragen.  $r$  ist in Intervalle von  $4 \text{ \AA}$  eingeteilt und gibt den Abstand vom LPS-Lipidanker an. Offene Symbole: Mobilität in der Membranebene (Kreis: x, Quadrat: y); schwarze Raute: Bewegung in Richtung der Membrannormalen (z).

Einen Überblick über verschiedene MD-Simulationen an Lipiden geben die Übersichtsartikel von Damodaran & Merz (1994b) und von Mouritsen et al. (1995).

In Anwesenheit von Natrium- oder Calcium-Ionen (Abbildungen 4.11 und 4.12) waren die Unterschiede zwischen lateraler und perpendikularer Diffusion weniger stark ausgeprägt. Sie beliefen sich auf maximal 10%. Zusätzlich verringerten die Calcium-Ionen die Eindringtiefe von Wassermolekülen in die LPS-Kopfgruppe. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß



die Wechselwirkung zwischen Wasser und Calcium-Ionen stärker und dauerhafter ist als die zwischen Wasser und Natrium-Ionen, wie es auch in einer MD-Studie gezeigt werden konnte (Obst & Bradaczek, 1996).

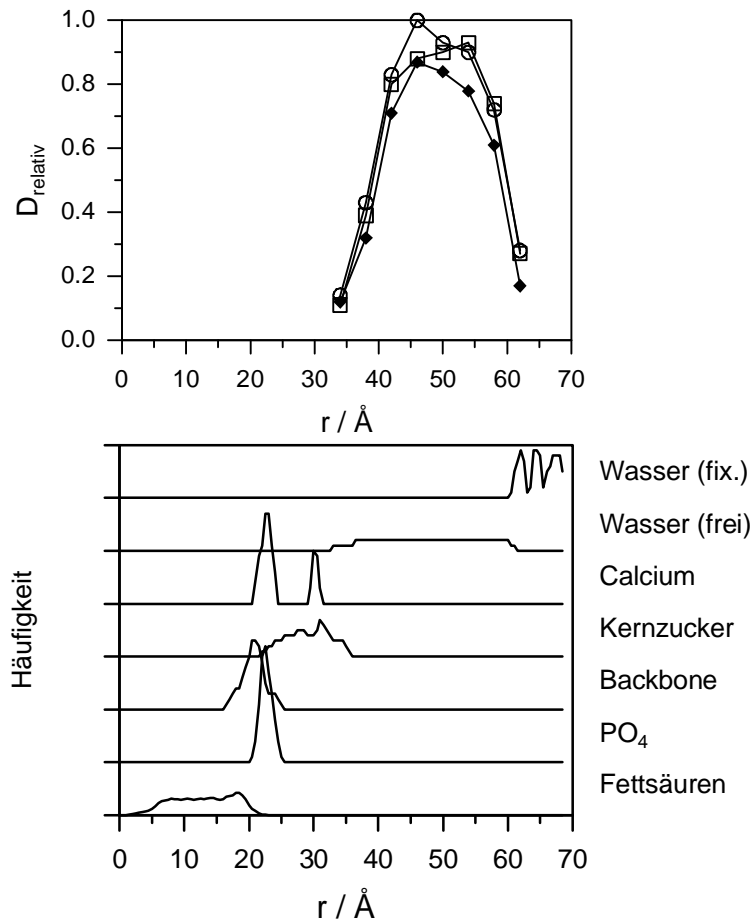


Abbildung 4.12: Relativer Diffusionskoeffizient von Wassermolekülen (oben) und Häufigkeit einzelner Gruppen (unten) bei der Simulation von vier *E. coli* J5-LPS-Molekülen mit Calcium.  $D_{\text{relativ}}$  bezieht sich auf den maximalen Wert des Diffusionskoeffizienten und ist in Abhängigkeit von der Entfernung  $r$  aufgetragen.  $r$  ist in Intervalle von 4 Å eingeteilt und gibt den Abstand vom LPS-Lipidanker an. Offene Symbole: Mobilität in der Membranebene (Kreis: x, Quadrat: y); schwarze Raute: Bewegung in Richtung der Membrannormalen (z).

Aus den MD-Simulationen ergibt sich folgendes Bild der Hydrathülle von LPS-Monoschichten: Wassermoleküle hydratisieren die gesamte Kopfgruppe des LPS und dringen bis auf Höhe der Phosphatgruppen in den Monolayer ein. Im rein hydrophoben Bereich des LPS werden keine Wassermoleküle angetroffen. Im Bereich der Kopfgruppen und in direkt angrenzenden Wasserschichten ist die Diffusion von Wassermolekülen deutlich gegenüber freiem (bulk-) Wasser verringert. Mit zunehmender Entfernung vom Monolayer nimmt der Einfluß des LPS auf das Wasser ab, gleichzeitig steigt aber die Anisotropie der Diffusion: senkrecht

zur Membranebene ist die Beweglichkeit bis zu 20% geringer als in der Membranebene. Ebenso wie der LPS-Monolayer wirkt auch das fixierte Wasser hemmend auf die Beweglichkeit benachbarter Wassermoleküle. Kationen sind im gesamten Kopfgruppenbereich anzutreffen, wobei Calcium-Ionen bevorzugt Positionen einnehmen, welche die Bildung von intra- bzw. intermolekularen Brücken zwischen mehreren negativ geladenen Gruppen ermöglichen. Demgegenüber sind einige Natrium-Ionen nur mit einer negativ geladenen Gruppe assoziiert und bilden keine Brücken, andere nehmen ähnliche Positionen wie Calcium-Ionen ein.

Dieses Bild der Hydrathülle, das sich aus den MD-Untersuchungen ergibt, steht weitgehend im Einklang mit experimentellen Daten (Schindler & Osborn, 1979; Halle & Piculell, 1986; Cevc, 1990; Schultz, 1993) und den Ergebnissen von Simulationstudien (Raghavan et al., 1992; Schlenkrich et al., 1990; Nicklas et al., 1991; Lee & Rosky, 1994).

#### **4.2.4 Der Ordnungszustand im Fettsäurebereich**

Eine Reihe von Parametern wie Tiltwinkel, Torsionswinkel und NMR-Ordnungsparameter gibt Auskunft über den Ordnungsgrad des hydrophoben Bereichs des LPS. Da auch experimentelle Daten zum Ordnungsgrad vorliegen, kann anhand dieser Kenngrößen die Übereinstimmung zwischen Modell und Experiment überprüft werden. So postulierten Labischinski et al. bereits 1985 einen hohen Ordnungsgrad des hydrophoben Bereichs von LPS.

##### **4.2.4.1 Der Tiltwinkel**

Der Tiltwinkel ist ein Maß für die Orientierung der Fettsäureketten von Phospholipiden und LPS relativ zur Membrannormalen.

In Anwesenheit von Wasser wurde bei den beiden *E. coli* LPS-Varianten ein mittlerer Tiltwinkel von ca. 30° beobachtet; die Verteilung der Winkel war eng (Abbildung 4.13). Die Gegenwart von Kationen und die Größe des Aggregats spielten dabei keine Rolle. Interessanterweise war beim *Chlamydia*-LPS ein etwas geringerer mittlerer Tiltwinkel von ca. 25° zu beobachten. Offensichtlich gibt es hier einen Zusammenhang zwischen der Struktur der Kopfgruppe und der Anordnung der Fettsäureketten im hydrophoben Bereich des Monolayers. Die geringe Streuung der Tiltwinkel weist darauf hin, daß dieser Parameter in den Simulationen einen Gleichgewichtswert eingenommen hat.

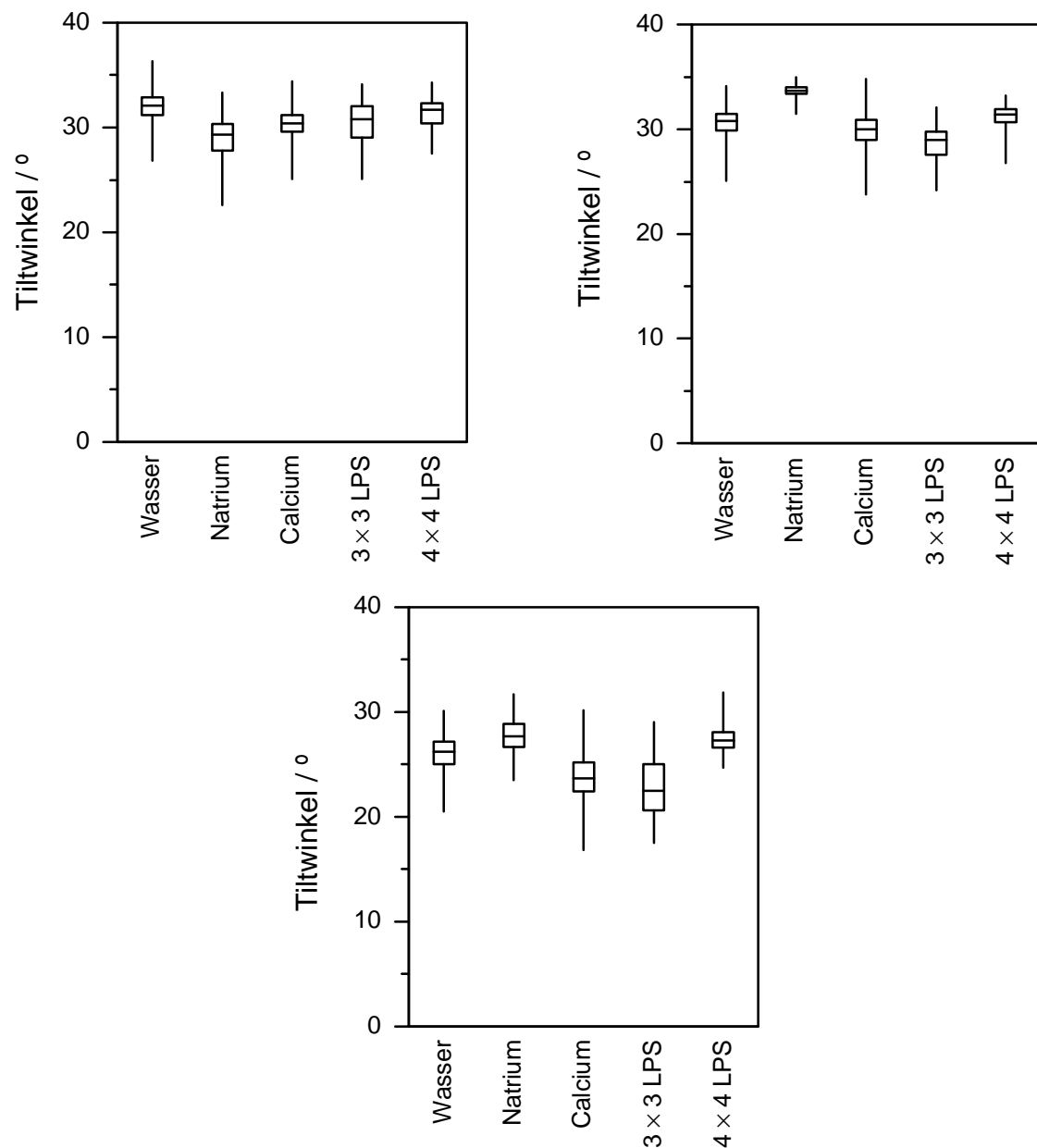


Abbildung 4.13: Tiltwinkel bei den verschiedenen LPS-Simulationen. Oben links: *E. coli* ReLPS; oben rechts: *E. coli* J5-LPS; unten: *Chlamydia*-LPS. Beim Boxplot entspricht die Begrenzung der Box den Quartilen, die waagerechte Linie gibt den Median an und die senkrechten Linien verbinden die Extremwerte.

Für ReLPS in der  $L_b$ -Phase hat Sabisch (1994) auf der Grundlage von Elektronendichteverteilungen einen Tiltwinkel von  $15 \pm 3^\circ$  berechnet. Dieser Wert liegt etwas unterhalb des bei den Simulationen beobachteten. Allerdings beziehen sich diese Daten auf Multischichtpräparate auf festen Trägern, d.h. einen nicht-physiologischen Zustand, bei dem Einflüsse der Präparationsmethode auf das Ergebnis nicht auszuschließen sind.

#### 4.2.4.2 Die Ausdehnung der Acylketten

Durch den Vergleich der Ausdehnung der Acylketten, d.h. des Abstandes zwischen erstem und letztem Kohlenstoffatom einer Kette, kann man schnell den Ordnungsgrad des Fettsäurebereichs beurteilen. Im hochgeordneten all-trans-Zustand, der zu Beginn der Simulationen vorlag, war die Ausdehnung der Ketten maximal. Durch Veränderung der Torsionswinkel im Fettsäurebereich bis hin zu gauche-Stellungen wurde im Laufe der Simulation die effektive Kettenlänge verringert.

Beim Vergleich der Kettenlängen einzelner Fettsäuren ist zu beachten, daß die mit 2 bezeichnete Acylkette nur zwölf Kohlenstoffatome besitzt, während die anderen Ketten aus 14 Kohlenstoffatomen bestehen. Nimmt man pro Methylengruppe in einer all-trans-Konformation ein Kettenlängen-Inkrement von  $1,25 \text{ \AA}$  an (Marsh, 1993), so sollte eine Differenz von  $2,5 \text{ \AA}$  zwischen den Dodecanoat- und den Tetradecanoat-Ketten zu erwarten sein. Tatsächlich war die mittlere Differenz mit  $2,7 \text{ \AA}$  etwas höher. Dies lag an der Geometrie der Anknüpfung der Dodecanoyl-Kette an die Tetradecanoyl-Kette, welche die erste C-C-Bindung der kurzen Kette in eine Orientierung parallel zur Membranebene zwang und somit zur Verkürzung der Kettenausdehnung beitrug.

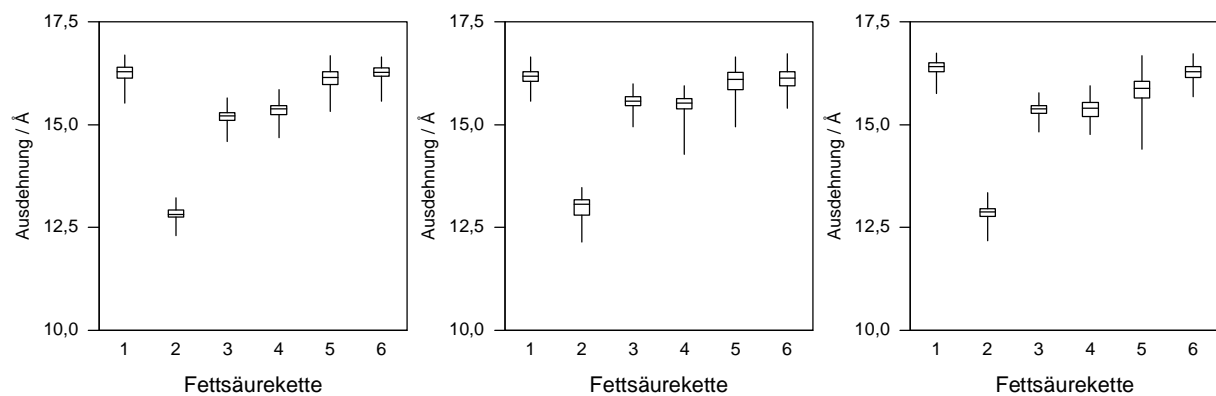


Abbildung 4.14: Ausdehnung der Fettsäureketten von *E. coli* ReLPS. Simulation mit Wasser (links) und Natrium- (Mitte) bzw. Calcium-Ionen (rechts). Die Zuordnung der Fettsäureketten ist Abbildung 3.1 zu entnehmen. Beim Boxplot entspricht die Begrenzung der Box den Quartilen, die waagerechte Linie gibt den Median an und die senkrechten Linien verbinden die Extremwerte.

Die Verteilung der Kettenlängen war relativ eng (Abbildungen 4.14, 4.15 und 4.16), d.h. die Mittelwerte repräsentierten gut das Verhalten der Acylketten, die in einer weitgehend gestreckten Konformation vorlagen, wie man aus dem Vergleich zwischen maximaler Ausdehnung

und mittlerer Ausdehnung schließen kann. Ein signifikanter Einfluß der Kationen auf die Ausdehnung der Ketten kann bei *E. coli*-LPS nicht festgestellt werden.

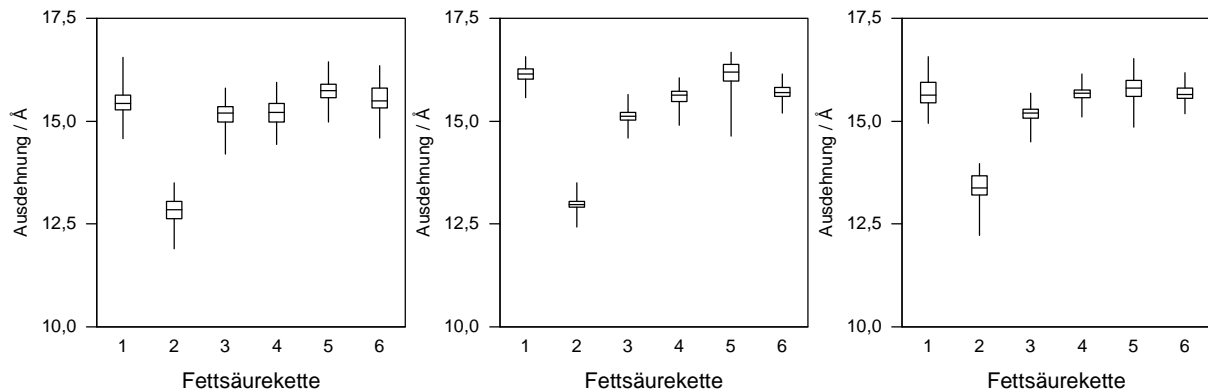


Abbildung 4.15: Ausdehnung der Fettsäureketten von *E. coli* J5-LPS. Simulation mit Wasser (links) und Natrium- (Mitte) bzw. Calcium-Ionen (rechts). Die Zuordnung der Fettsäureketten ist Abbildung 3.1 zu entnehmen. Beim Boxplot entspricht die Begrenzung der Box den Quartilen, die waagerechte Linie gibt den Median an und die senkrechten Linien verbinden die Extremwerte.

Lediglich bei Chlamydia-LPS deutete sich ein geringfügiger ordnender Effekt der Kationen an: Aus den vergleichsweise niedrigen Minimalwerten, die beim hydratisierten Chlamydia-LPS in Abwesenheit von Kationen beobachtet wurden (s. Abbildung 4.16), kann man schließen, daß im Fettsäurebereich zeitweise erhebliche Störungen, d.h. Abweichungen von der all-trans-Konformation auftraten. Diese Information geht bei der Betrachtung von zeitlichen Mittelwerten, wie sie bei der Berechnung des Ordnungsparameters Eingang finden, verloren. Um ein möglichst umfassendes Bild der Simulationen zu erhalten, ist es deshalb wichtig, verschiedene Auswertungsverfahren zu verwenden, so wie es in der vorliegenden Arbeit der Fall war.

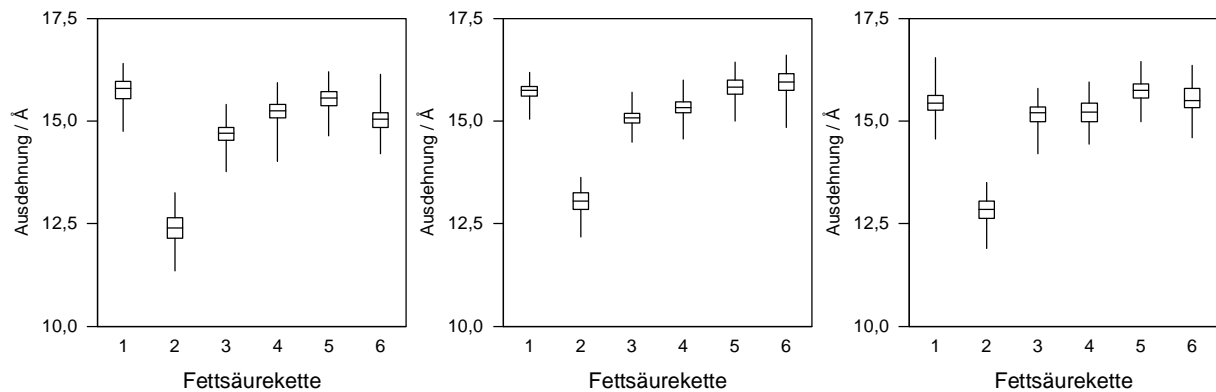


Abbildung 4.16: Ausdehnung der Fettsäureketten von *Chlamydia*-LPS. Simulation mit Wasser (links) und Natrium- (Mitte) bzw. Calcium-Ionen (rechts). Die Zuordnung der Fettsäureketten ist Abbildung 3.1 zu entnehmen. Beim Boxplot entspricht die Begrenzung der Box den Quartilen, die waagerechte Linie gibt den Median an und die senkrechten Linien verbinden die Extremwerte.

#### 4.2.4.3 Bindungswinkel und gauche-Anteil

Die Analyse der Bindungswinkel der Fettsäuren des LPS liefert wichtige Erkenntnisse über den Ordnungszustand des hydrophoben Bereichs. In den Abbildungen 4.17, 4.18 und 4.19 ist die relative Häufigkeit bestimmter Torsionswinkel an einzelnen Bindungen als Mittelwert über alle Fettsäureketten der LPS-Moleküle dargestellt. Diese Auftragung stellt sehr übersichtlich die Verteilung von Torsionswinkeln entlang der Fettsäureketten dar.

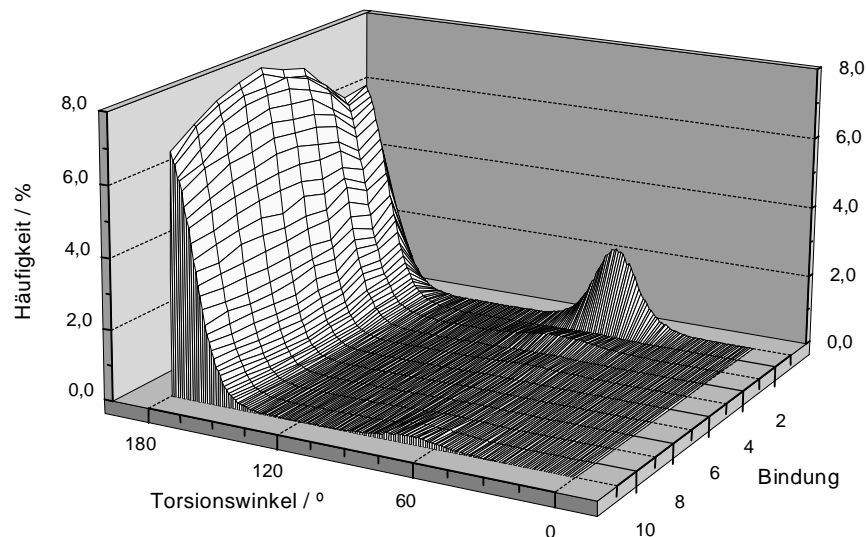


Abbildung 4.17: Häufigkeitsverteilung von Torsionswinkeln entlang der Fettsäureketten von *E. coli* ReLPS. Mittelwerte aus der Simulation von 3 × 3 LPS-Molekülen. Bindung bezeichnet die Position entlang der Fettsäureketten, wobei 1 der Anknüpfungsstelle an das Backbone am nächsten liegt.

Während im Bereich hoher Winkel ( $\varphi > 150^\circ$ ) für alle untersuchten LPS-Varianten die Profile weitgehend identisch waren, zeigten sich Unterschiede im Winkelbereich von  $45^\circ < \varphi < 120^\circ$  zwischen den Lipopolysacchariden von *E. coli* Re, J5 und *Chlamydia*, obwohl alle drei LPS den gleichen Lipid A-Grundkörper enthalten und sich die Moleküle nur im Kopfgruppenbereich voneinander unterscheiden. Die Kopfgruppe übte offensichtlich einen merklichen Einfluß auf das Lipid A aus, der sich bis in den Fettsäurebereich auswirkte. Der Anteil an Torsionen im synklinalen Bereich war bei *E. coli* ReLPS am niedrigsten und bei *Chlamydia*-LPS am höchsten. Daraus kann geschlossen werden, daß es keine Korrelation gibt zwischen der Größe der Kopfgruppe und dem Anteil an gestörten Bindungswinkeln, da das *E. coli* J5-LPS zwar mit sieben Saccharid-Einheiten die größte Kopfgruppe besitzt, bei der Häufigkeit synklinaler Winkel aber nur eine mittlere Position einnimmt. Der insgesamt recht geringe Anteil von gauche-Torsionen entspricht einem hoch geordneten Zustand des hydrophoben Bereichs des LPS und steht in Übereinstimmung mit der experimentellen Beobachtung, daß der gauche-Anteil bei LPS deutlich niedriger als beim Phospholipid DMPC ist (Schultz, 1993).

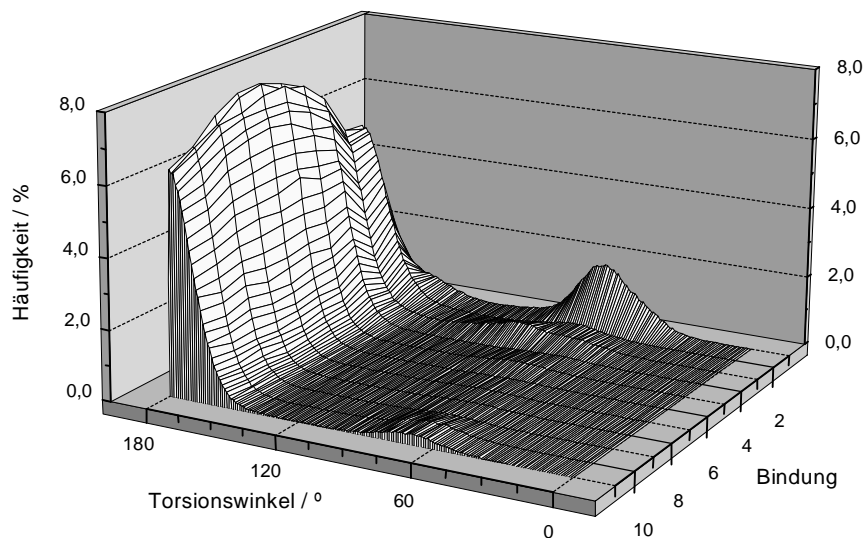


Abbildung 4.18: Häufigkeitsverteilung von Torsionswinkeln entlang der Fettsäureketten von *E. coli* J5-LPS. Mittelwerte aus der Simulation von  $3 \times 3$  LPS-Molekülen. Bindung bezeichnet die Position entlang der Fettsäureketten, wobei 1 der Anknüpfungsstelle an das Backbone am nächsten liegt.

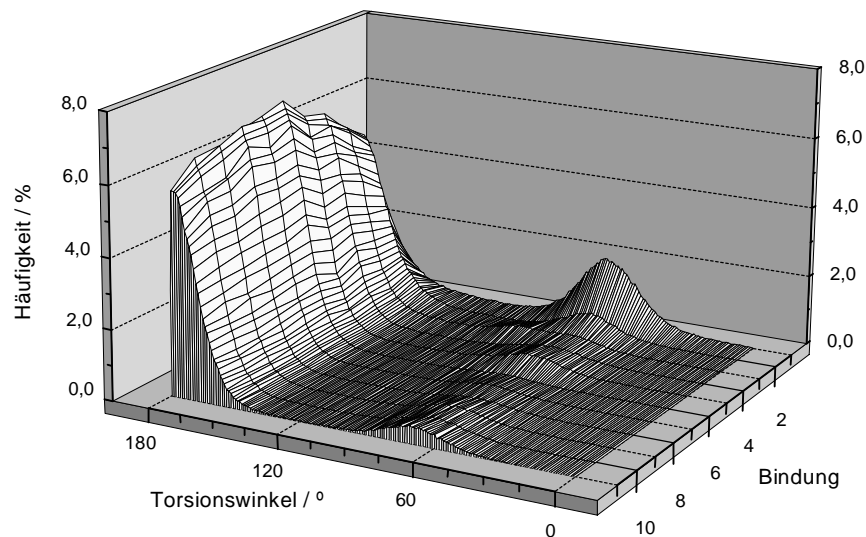


Abbildung 4.19: Häufigkeitsverteilung von Torsionswinkeln entlang der Fettsäureketten von *Chlamydia*-LPS. Mittelwerte aus der Simulation von 3 × 3 LPS-Molekülen. Bindung bezeichnet die Position entlang der Fettsäureketten, wobei 1 der Anknüpfungsstelle an das Backbone am nächsten liegt.

Die Dominanz von Torsionswinkeln im Bereich  $150^\circ < \varphi < 180^\circ$  (antiperiplanar), die einer trans-Stellung aufeinanderfolgender Methylengruppen entsprechen, zeugt davon, daß die all-trans-Konformationen der Startstrukturen weitgehend erhalten bleiben. Gleichzeitig demonstriert das Auftreten von gauche-Torsionen im Verlauf der Simulationen, daß die Fettsäuren gewisse konformationelle Freiheiten besitzen und nicht - wie in einem Kristall - keinerlei Beweglichkeit aufweisen. Der hohe Anteil an antiperiplanaren Torsionen entspricht einem hohen Ordnungsgrad der Alkylketten, wie er für LPS aufgrund experimenteller Untersuchungen diskutiert wird (Labischinski et al., 1985; Schultz, 1993).

Die Häufung von synklinalen Torsionen bei den ersten Bindungen, die auf die Anknüpfungsstelle an das Backbone folgen, erklärt sich durch die besonderen konformationellen Restriktionen, die durch eben diese Anknüpfung entstehen. Insbesondere den Acylketten, die an GlcN-II des Backbones gebunden sind und mit weiteren Acylketten verestert sind, wird durch die parallele Ausrichtung aller Ketten im Anknüpfungsbereich eine weniger günstige gauche-Konformation aufgezwungen. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 4.20 illustriert.



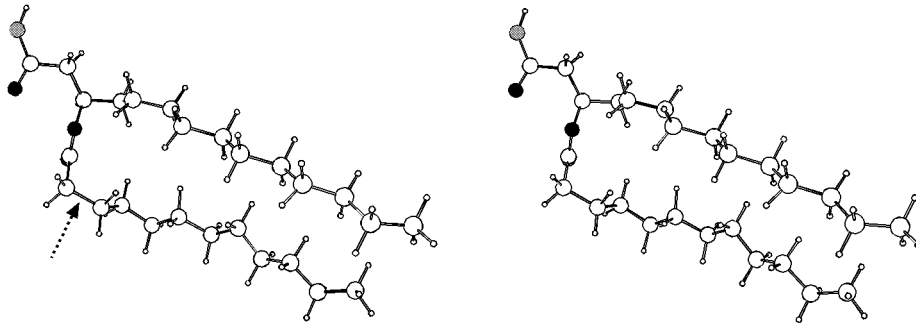


Abbildung 4.20: Im Bereich der Verzweigungen unterliegen die Fettsäureketten besonderen Restriktionen, so daß dort bevorzugt gauche-Torsionen (Pfeil) auftreten. Stereoabbildung eines Schnappschusses ( $t = 50\text{ps}$ ) aus der Simulation von *E. coli* J5 mit Wasser und Calcium für die an 2'-Position des GlcN-2 amidisch gebundene Kette mit ihrer Verzweigung. Grau: Stickstoff; schwarz: Sauerstoff, kleine Kreise: Wasserstoff, große Kreise: Kohlenstoff.

Am Beispiel des LPS von *E. coli* J5 und anhand der Abbildungen 4.21, 4.22 und 4.23 wird im folgenden die Wirkung von Kationen auf die Torsionswinkel im Fettsäurebereich diskutiert, wobei sich die Betrachtungen auf den Winkelbereich von  $0^\circ$  bis  $150^\circ$  beschränkt. Die starke Häufung antiperiplanarer Winkel ( $150^\circ > \varphi > 180^\circ$ ) würde ansonsten die Details überdecken.

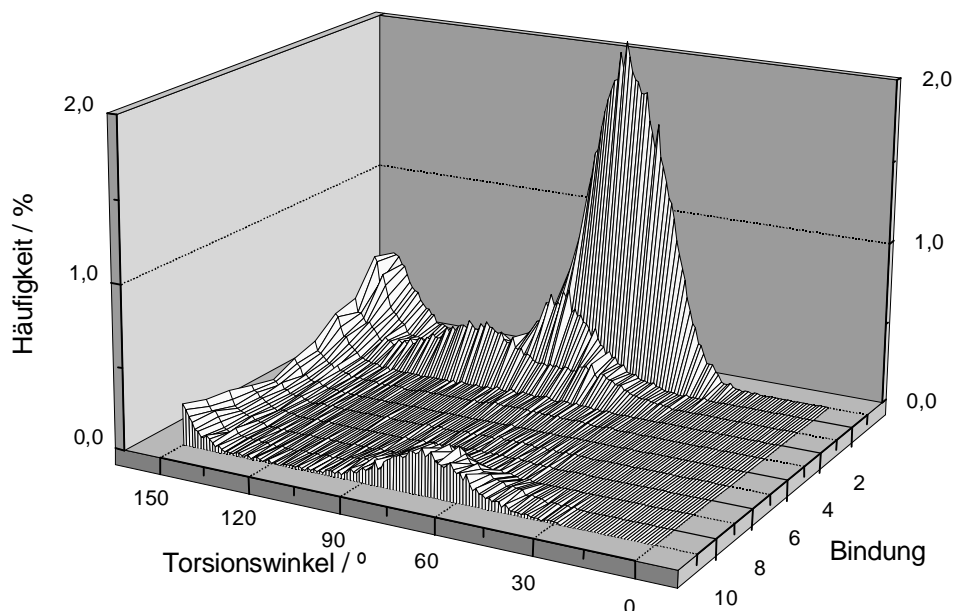


Abbildung 4.21: Häufigkeitsverteilung von Torsionswinkeln entlang der Fettsäureketten von *E. coli* J5-LPS. Mittelwerte aus der Simulation von 4 LPS-Molekülen und Wasser. Bindung bezeichnet die Position entlang der Fettsäureketten, wobei 1 der Anknüpfungsstelle an das Backbone am nächsten liegt.

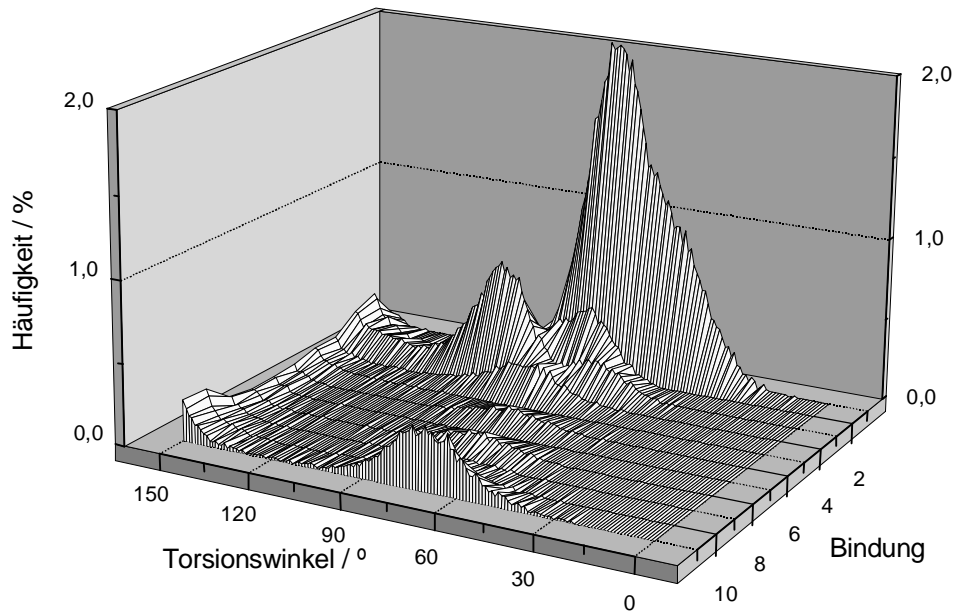


Abbildung 4.22: Häufigkeitsverteilung von Torsionswinkeln entlang der Fettsäureketten von *E. coli* J5-LPS. Mittelwerte aus der Simulation von vier LPS-Molekülen, Wasser und Natrium-Ionen. Bindung bezeichnet die Position entlang der Fettsäureketten, wobei 1 der Anknüpfungsstelle an das Backbone am nächsten liegt.

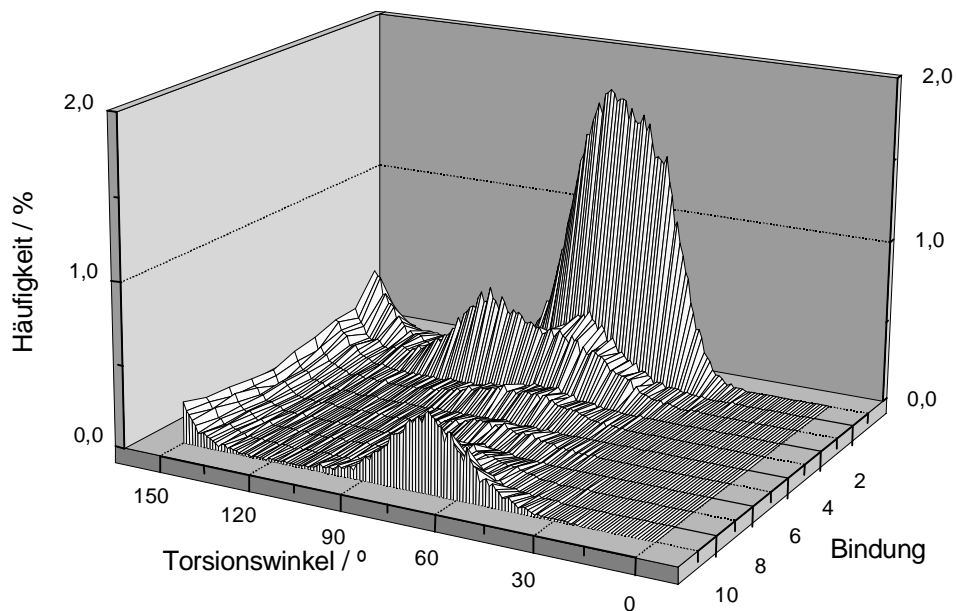


Abbildung 4.23: Häufigkeitsverteilung von Torsionswinkeln entlang der Fettsäureketten von *E. coli* J5-LPS. Mittelwerte aus der Simulation von 4 LPS-Molekülen, Wasser und Calcium-Ionen. Bindung bezeichnet die Position entlang der Fettsäureketten, wobei 1 der Anknüpfungsstelle an das Backbone am nächsten liegt.

In Anwesenheit von Kationen war der Anteil an Torsionswinkeln im Bereich um  $60^\circ$  (synklinal bzw. gauche) an vielen Positionen in den Fettsäureketten erhöht, wobei jeweils nur jede zweite Bindung betroffen war. Die resultierende molekulare Struktur ist in Abbildung 4.24 illustriert.

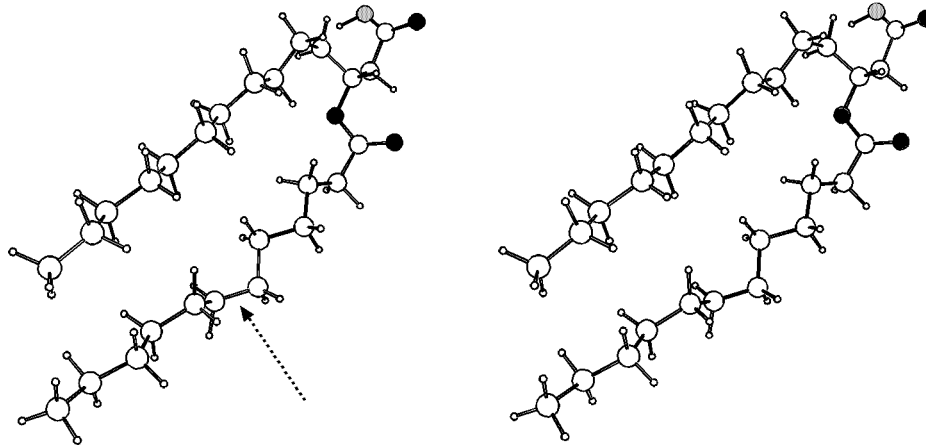


Abbildung 4.24: In den Fettsäureketten treten im Verlauf der MD-Simulation gauche-Torsionen (Pfeil) auf. Stereoabbildung eines Schnappschusses ( $t = 10$  ps) aus der Simulation von *E. coli* J5 mit Wasser und Calcium. Es ist die an 2'-Position des GlcN-2 amidisch gebundene verzweigte Kette dargestellt. Grau: Stickstoff; schwarz: Sauerstoff, kleine Kreise: Wasserstoff, große Kreise: Kohlenstoff.

Auch die terminalen Methylgruppen wiesen in Gegenwart von Kationen einen erhöhten Anteil an synklinalen Torsionen auf. Dies bestätigt die oben ausgeführte Beobachtung, daß die Kationen, obwohl sie in der Kopfgruppe des LPS lokalisiert sind, einen merklichen Einfluß auf die Struktur des Fettsäurebereiches ausüben.

Die bemerkenswerte Häufung von gauche-Torsionen bei jeder zweiten Bindung führte zu einem Wellenmuster in der Verteilung (Abbildung 4.22 und Abbildung 4.23). Dieser Befund kann auf molekularer Ebene als Effekt einer Kinken-Bildung interpretiert werden (Stouch, 1993). In Abbildung 4.25 ist dieser Sachverhalt verdeutlicht: Die Torsionswinkel-Folge gauche-trans-gauche (g-t-g) führt zur Bildung einer Kinke in der Alkylkette. Dadurch bleibt die Richtung der Kette erhalten, sie ist lediglich parallel gegenüber einer all-trans-Kette verschoben. Diese Struktur ist die Folge der engen Packung im hydrophoben Bereich des LPS-Monolayers und der daraus resultierenden Restriktionen für die Anordnung der Fettsäuren. Eine isolierte gauche-Bindung würde die Richtung der Alkylkette drastisch verändern und damit die geordnete Struktur im hydrophoben Bereich stören.

Das Auftreten von Kinken wurde auch bei MD-Simulationen von Phospholipiden beobachtet (Karaborni, 1993; Stouch, 1993).

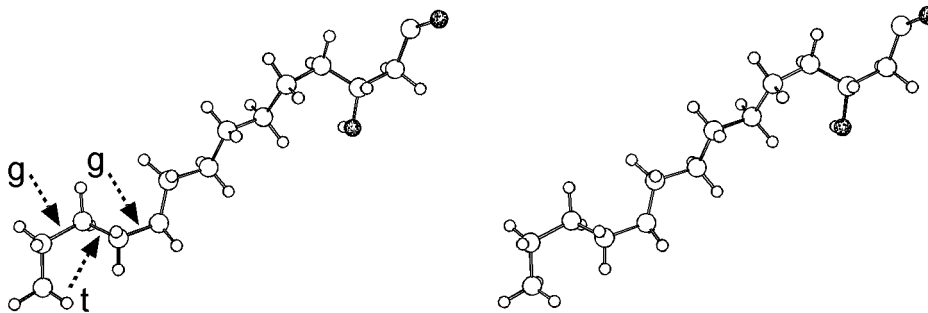


Abbildung 4.25: Kinkenbildung in den Fettsäureketten ist durch die Abfolge g-t-g (gauche-trans-gauche, Pfeile) charakterisiert. Stereoabbildung eines Schnappschusses der in 2-Position an GlcN-1 gebundenen Kette aus der Simulation von *E. coli* J5-LPS mit Calcium-Ionen. Sauerstoffatome sind durch Schwärzung hervorgehoben.

#### 4.2.4.4 Der Ordnungsparameter $S_{CD}$

Der NMR-Ordnungsparameter  $S_{CD}$  ist ein Maß für die Ordnung im Fettsäurebereich (s. z.B. Seelig & Seelig, 1974; van der Meer, 1993; Douliez et al., 1995) und bezieht sich auf die Stellung der Methylengruppen der Acylketten.

Der Verlauf der Ordnungsparameterprofile ist charakteristisch: Die ersten Methylengruppen wiesen einen niedrigeren Ordnungsgrad auf, im weiteren Verlauf der Kette stieg dieser auf einen Plateau-Wert an und sank schließlich im Bereich der Kettenenden wieder ab. Dieser Verlauf kann leicht interpretiert werden, wenn man sich die Struktur der hydrophoben Region des LPS vor Augen hält: An den Anknüpfungsstellen der Fettsäuren an das GlcN-Backbone unterliegen die Methylengruppen konformationellen Restriktionen, die stark von der Verknüpfungsstelle beeinflusst sind. Eine Mittelung über verschiedene Ketten des LPS ergibt deshalb eine breite Streuung des Ordnungsparameters. Im weiteren Kettenverlauf können sich die Methylengruppen aller Ketten in gleicher Weise orientieren, wobei ihre Flexibilität durch die benachbarten Acylketten in der vorgegebenen Packung beschränkt wird. Zum Kettenende hin erhöht sich der Spielraum für die Bewegungen der Fettsäuren, so daß in diesem Bereich der Ordnungsgrad abnimmt. Ein vergleichbarer Verlauf wird auch bei der experimentellen Untersuchung von Phospholipiden beobachtet (Seelig & Seelig, 1974; van der Meer, 1993). Der Ordnungsparameter der Oleoyl-Kette von POPC liegt aufgrund konformationeller Restriktionen im Bereich der Verknüpfung zum Backbone bei 0,1 und steigt anschließend deutlich an. Der

charakteristische Abfall des Ordnungsparameters zum Kettenende hin kann z.B. bei der Palmitoylkette des POPC beobachtet werden. Während für die Methylgruppen 2 bis 8 ein konstanter Wert von ca. 0,2 gemessen wird, sinkt der Ordnungsparameter zwischen den Positionen 9 und 15 auf weniger als 0,1 ab (van der Meer, 1993). Bei einer Simulation von DPPC haben de Loof et al. (1991) im Plateau-Bereich zwischen den Kohlenstoffpositionen 5 und 12  $S_{CD}$ -Werte von ca. 0,2 beobachtet, was knapp unterhalb der beim LPS bestimmten Ordnungsparameter liegt. Folglich bestätigt sich auch hier der experimentelle Befund, daß der hydrophobe Bereich des LPS hoch geordnet ist (Labischinski et al., 1989; Schultz, 1993).

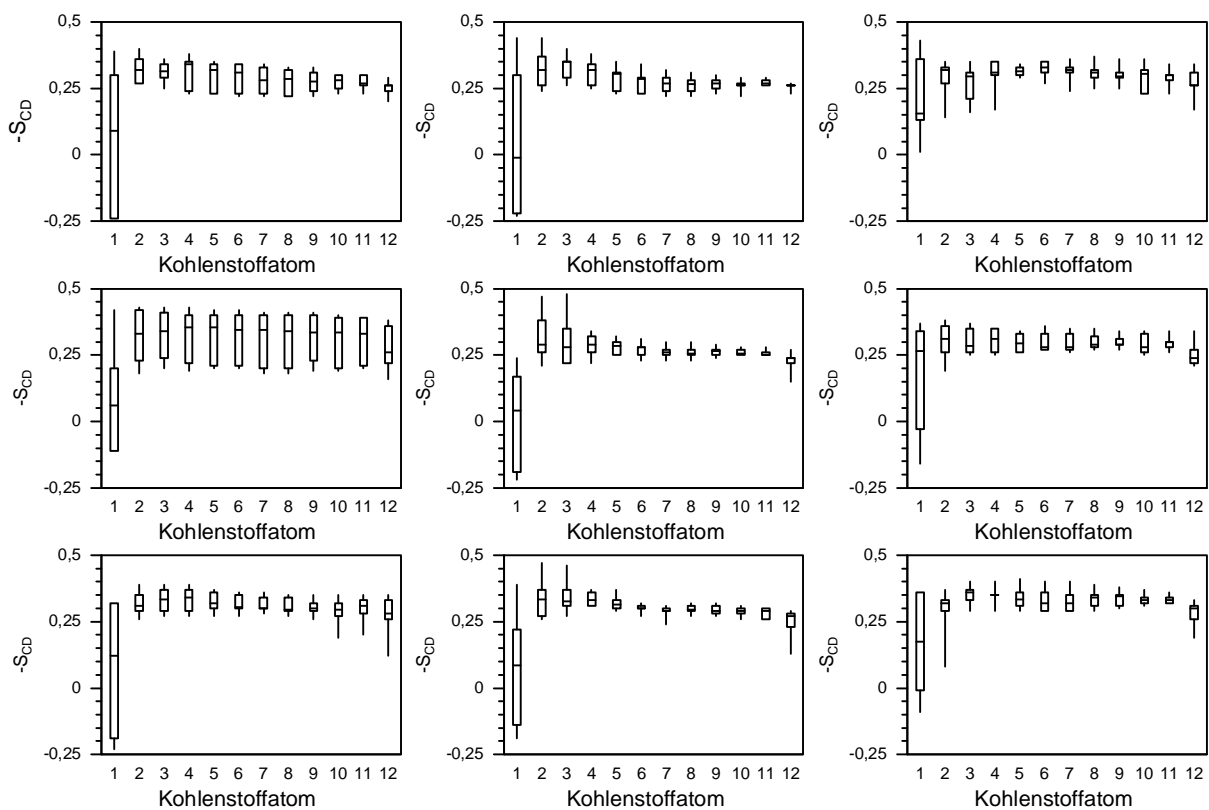


Abbildung 4.26: Profile des Ordnungsparameters  $S_{CD}$  für *E. coli* ReLPS (links), *E. coli* J5-LPS (Mitte) und *Chlamydia*-LPS (rechts). Obere Reihe: Simulationen in Wasser; mittlere Reihe: Simulationen in Gegenwart von Natrium-Ionen; untere Reihe: Simulationen in Anwesenheit von Calcium-Ionen. Die Zahlen geben die Position der Methylgruppe in der Acylkette an, wobei das Kohlenstoffatom, welches an der Anknüpfung zum Backbone beteiligt ist, die Nummer 0 erhält. Beim Boxplot entspricht die Begrenzung der Box den Quartilen, die waagerechte Linie gibt den Median an und die senkrechten Linien verbinden die Extremwerte.

Im Gegensatz zur visuell beobachteten Rigidifizierung der LPS-Monolayer in Gegenwart von Kationen und zur Veränderung der Torsionswinkel im Fettsäurebereich wirkte sich die An-

wesenheit von Kationen nicht signifikant auf den Verlauf des Fettsäureordnungsparameters aus. Dies könnte mehrere Gründe haben: Zum einen finden sich die Kationen primär im Bereich der Kopfgruppen. Eine Wirkung auf den hydrophoben Bereich des LPS kann also nur indirekt erfolgen. Wenn aber die Querschnittsfläche der Kopfgruppen in der Membranebene größer als die Fläche der Fettsäuren ist und damit den Gesamtplatzbedarf bestimmt, so bleibt eine stärkere Verklammerung der Kopfgruppen im Fettsäurebereich zunächst folgenlos. Zum zweiten wurden bei den Simulationen feste periodische Randbedingungen verwendet, so daß eine hypothetische Kontraktion der Molekülaggregate insgesamt nicht zu einer Reduktion der Querschnittsfläche führen konnte. Diese Unterschiede zeigen, daß sich das Verhalten eines komplexen Moleküls wie LPS nicht durch einen Parameter alleine hinreichend beschreiben läßt, sondern - wie in der vorliegenden Arbeit - mehrere Verfahren zur Charakterisierung herangezogen werden müssen.

Während in experimentellen Untersuchungen eine Zunahme des Ordnungsgrades mit zunehmender Größe des Oligosaccharidanteils des LPS beobachtet wurde (Rottem & Leive, 1977; Schultz, 1993), konnte bei den Simulationen kein signifikanter Einfluß der Größe des Kernzuckerbereiches auf den Ordnungsgrad festgestellt werden. Allerdings war im Experiment das Rc-LPS von *E. coli* J5, welches die größte simulierte Struktur darstellt, das LPS mit der kleineren Kopfgruppe. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, daß deutlichere Unterschiede im Ordnungsparameter erst bei der Simulation noch größerer LPS-Oligosaccharidanteile bis hin zum S-LPS beobachtet werden könnten.

#### 4.2.5 Zusammenfassung der Lösungsmittel-MD

Alle untersuchten Parameter zeigen, daß die MD-Simulationen unter Einbeziehung von Wasser und Kationen ein gutes Modell für eine bakterielle Membran darstellen:

Die dichte Packung der Fettsäureketten verhinderte über die gesamte Simulationsdauer hinweg das Eindringen von Wassermolekülen in den geschlossenen hydrophoben Bereich bzw. das Passieren des hydrophoben Bereichs durch einzelne Wassermoleküle. Dies steht in Einklang mit der biologischen Funktion der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, eine Permeabilitätsbarriere zwischen der Umgebung und dem Inneren der Bakterien zu bilden, um das Eindringen schädlicher Substanzen wie Antibiotika oder Verdauungssekreten zu verhindern (s. z.B. Lugtenberg & van Alphen, 1983).

In Übereinstimmung mit experimentellen Befunden (Halle & Picullel, 1986) und anderen MD-Simulationen (Raghavan et al., 1992; Schlenkrich et al., 1990; Nicklas et al., 1991; Lee & Rossky, 1994) wurde in der Nähe des LPS eine verringerte Beweglichkeit von Wassermolekülen beobachtet, wobei der Diffusionskoeffizient bis auf 10% des in freiem Wasser beobachteten Wertes absank.

In guter Übereinstimmung mit experimentellen Befunden (Schindler & Osborn, 1979; Coughlin et al., 1985; Schultz, 1993) führte die Einbeziehung von Kationen zu einer Rigidifizierung der LPS-Moleküle, da insbesondere die Calcium-Ionen inter- und intramolekulare Brücken zwischen negativ geladenen Gruppen bildeten. Die Natrium-Ionen waren demgegenüber im gesamten Kopfgruppenbereich anzutreffen.

Eine Vergrößerung der LPS-Monolayer von vier auf neun oder 16 Moleküle veränderte die Ergebnisse nicht wesentlich, führte aber zu einer massiven Zunahme der erforderlichen Rechenzeiten bei den MD-Simulationen. Daher wurden die meisten Simulationen mit 2 × 2-LPS-Aggregaten durchgeführt.

Der Tiltwinkel variierte in Abhängigkeit vom untersuchten LPS-Typ, d.h. von der Struktur des Kernzuckerbereiches, zwischen 25° und 30°. Die Fettsäuren des LPS waren folglich deutlich gegenüber der Membrannormalen - analog einer L<sub>B</sub>-Phase - verkippt. Diese Verkipfung steht in Übereinstimmung mit der Interpretation von Röntgenexperimenten an LPS-Multischichten durch Sabisch (1993).

Die mittlere Ausdehnung der Acylketten entsprach einem hohen Anteil an Torsionen in trans-Stellung. Die Analyse der Torsionswinkel im Fettsäurebereich zeigte, daß - ausgehend von einer höchst geordneten all-trans-Anordnung der Fettsäuren - im Laufe der Simulationen insbesondere in Gegenwart von Kationen einzelne gauche-Torsionen und Kinken auftraten, wobei aber insgesamt eine hochgeordnete Struktur erhalten blieb.

Das Profil des NMR-Ordnungsparameter S<sub>CD</sub> der Fettsäuren verläuft für LPS höher als bei einer Simulation des Phospholipids DPPC (de Loof et al., 1991) und zeigt damit einen höheren Ordnungsgrad des LPS an.

Der anhand einer Reihe von Parametern im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgewiesene hohe Ordnungsgrad im Fettsäurebereich des LPS bestätigt frühere experimentelle Untersuchungen (Rottem & Leive, 1977; Labischinski et al., 1985, 1989; Schultz, 1993). Der hohe

Ordnungsgrad wird durch eine Vielzahl inter- und intramolekularer van der Waals-Kontakte und durch die geringe zur Verfügung stehende Fläche begünstigt.



### 4.3 Die exponierte Oberfläche

*Nachdem in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt wurde, daß die simulierten LPS-Aggregate ein plausibles Modell der bakteriellen Membran darstellen, soll in diesem Abschnitt schließlich das Hauptziel der Arbeit beschrieben werden: die Untersuchung der Exposition von antigenen Oberflächenstrukturen. Die Epitop-Exponierung wird anhand der Fläche (SAS) diskutiert, die einem Probenmolekül von der Monolayer-Oberfläche aus zugänglich ist.*

*Im folgenden werden zunächst die berechneten Oberflächenwerte der einzelnen Bestandteile des LPS, d.h. der isolierten Saccharid-Monomere diskutiert. Anschließend werden diese Werte den Oberflächenwerten von kompletten, isolierten LPS-Molekülen gegenübergestellt. Während für diese Berechnungen jeweils die Startkonformation verwendet wurde, ist für die Untersuchung der Oberflächen-Exponierung in LPS-Aggregaten auf die MD-Trajektorien zurückgegriffen worden. Den Abschluß bildet der Vergleich der exponierten Oberflächen der drei verschiedenen Lipopolysaccharide. Durch dieses abgestufte Vorgehen wurde für jeden Zuckerrest sowohl die intramolekulare Abschirmung im LPS-Monomer als auch die intermolekulare Abschirmung im LPS-Aggregat abgeschätzt.*

#### 4.3.1 Monosaccharide

Zu Vergleichszwecken wurden zunächst für alle Zuckerreste isolierter LPS-Moleküle zugängliche Oberflächen (solvent accessible surface, SAS) berechnet. Die Definition der einzelnen Oligosaccharidfragmente, die bei den Berechnungen verwendet wurden, ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

Die Ergebnisse der SAS-Berechnungen an Saccharid-Monomeren sind in Tabelle 4-1 zusammengefaßt. Da die Anzahl der Atome, die einem Zuckerrest bei der Oberflächenberechnung zugeordnet wurde, von der Art und Zahl der Verknüpfungen abhängt, an denen der Rest beteiligt ist, ergaben sich in den verschiedenen Kernzuckerfragmenten unterschiedliche Atomanzahlen und damit auch unterschiedliche Oberflächenwerte für vergleichbare Zuckerreste (s. Abbildung 3.1). Demgegenüber spielten konformationelle Unterschiede zwischen vergleichbaren Sacchariden - resultierend aus der Energie-Minimierung bei der Erzeugung der Startstrukturen - offensichtlich eine geringere Rolle, da die mittlere quadratische Abweichung (RMSD) der einzelnen Fragmente untereinander geringer als  $0,1 \text{ \AA}^2$  war.

Für Kdo wurden exponierte Oberflächen zwischen 366 und 395 Å<sup>2</sup> ermittelt, der Mittelwert lag bei 376 Å<sup>2</sup>. Die Anzahl der berücksichtigten Atome schwankte zwischen 23 und 28, je nach Verknüpfung des Zuckers, wobei sich die niedrigste Atomanzahl beim Kdo-1 von *E. coli* J5 ergab, welches mit drei weiteren Zuckerresten verbunden ist. Terminale Zucker, die nur über eine Bindung mit dem LPS verbunden sind, wiesen demgegenüber die maximale Atomanzahl auf. In gleicher Weise wie die Oberflächen veränderten sich auch die berechneten Volumen der Fragmente mit der Anzahl der berücksichtigten Atome.

*Tabelle 4-1: Zugängliche Oberfläche (solvent accessible surface, SAS) und Volumen isolierter Monosaccharide der verschiedenen LPS-Modelle (Berechnung mit Quanta). Unterschiedliche Atomanzahlen gleicher Zucker ergeben sich durch die unterschiedlichen Verknüpfungsmuster in den drei Kernzuckerbereichen.*

LPS	Zucker	Atomanzahl	SAS / Å <sup>2</sup>	Volumen / Å <sup>3</sup>
<i>E. coli</i> Re	Kdo-1	25	368	561 ± 4
	Kdo-2	28	379	581 ± 5
<i>E. coli</i> J5	Kdo-1	23	366	534 ± 11
	Kdo-2	28	395	600 ± 4
	Glc-1	23	331	492 ± 18
	GlcN-1	24	337	502 ± 6
	Hep-1	25	351	526 ± 6
	Hep-2	23	341	498 ± 10
	Hep-3	25	350	522 ± 6
<i>Chlamydia</i>	Kdo-1	26	385	579 ± 1
	Kdo-2	26	371	569 ± 6
	Kdo-3	26	369	559 ± 6

Nach der Berechnung von Monosaccharid-Oberflächen war der nächste Schritt bei der Untersuchung der Oberflächenexponierung die Einbeziehung der intramolekularen Abschirmung durch Zuckerreste desselben Kernzuckeroligosaccharids. Zu diesem Zweck wurden an kompletten, isolierten LPS-Monomeren Oberflächenberechnungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.27, 4.28 und 4.29 den Oberflächenwerten gegenübergestellt, die sich für die einzelnen Oligosaccharidfragmente (Tabelle 4-1) ergaben.

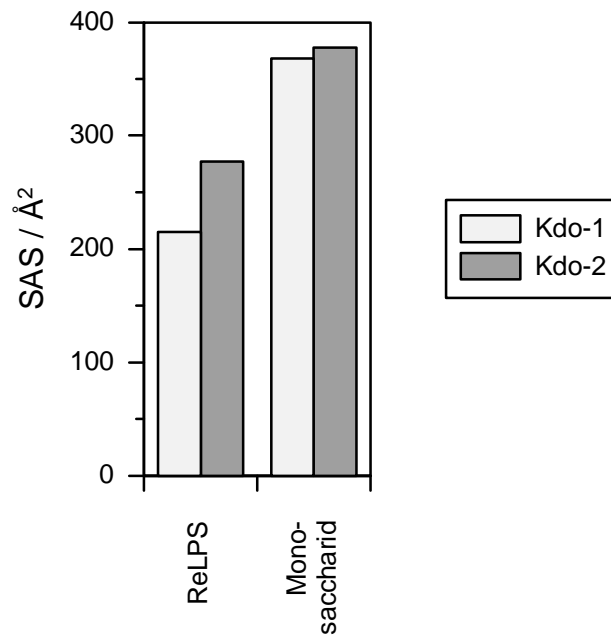


Abbildung 4.27: Exponierte Oberfläche (SAS) des isolierten *E. coli*-ReLPS im Vergleich zum Kdo-Monosaccharid (Tabelle 4-1).

Im monomeren ReLPS waren 58% der Oberfläche von Kdo-1 und 73% der Oberfläche von Kdo-2 zugänglich, d.h. 30 bis 40% der Oberfläche der Kernzucker wurden durch intramolekulare Abschirmung verdeckt.

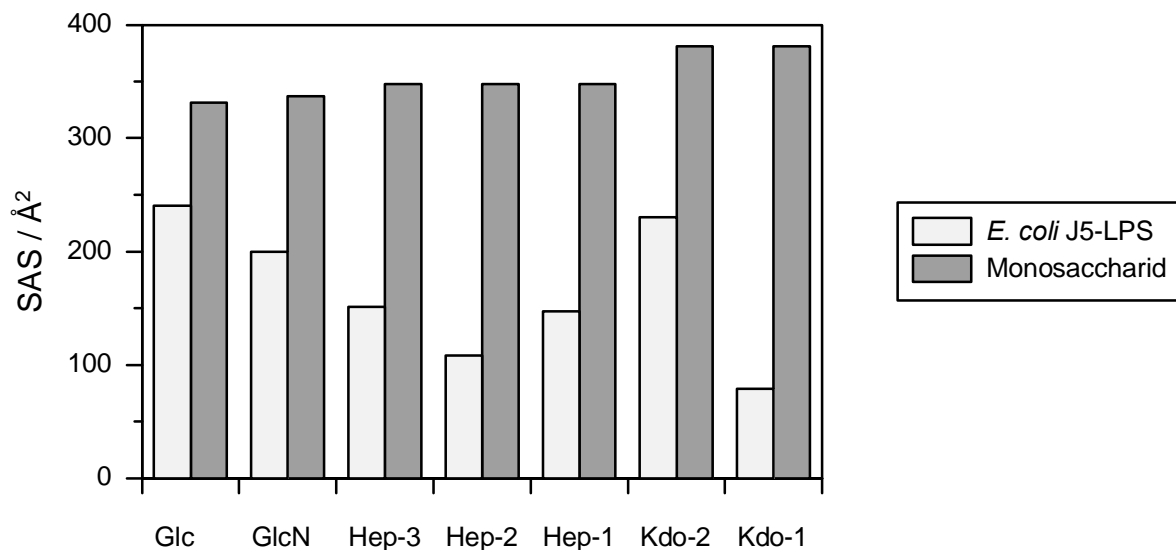


Abbildung 4.28: Exponierte Oberfläche (SAS) der Elemente des Kernzuckerbereiches von isoliertem *E. coli* J5-LPS im Vergleich zu Monosacchariden (Tabelle 4-1).

Beim Monomer des *E. coli* J5-LPS gab es demgegenüber starke Unterschiede in der Exposition einzelner Einheiten des Kernzuckerbereiches: Während die Monosaccharide vergleichbare

Flächenwerte aufwiesen, reichten die relativen Oberflächenwerte der im LPS gebundenen Zucker von 21% für Kdo-1 bis hin zu 73% für Glc-1. Beim J5-LPS, welches als RcLPS gegenüber dem ReLPS einen erweiterten Kernzuckerbereich aufweist, war also eine deutliche intramolekulare Abschirmung einzelner Saccharideinheiten zu beobachten.

Beim *Chlamydia*-LPS-Monomer war die Exponierung aller drei Kdo-Reste ungefähr gleich; sie betrug etwa 50% des Wertes der Kdo-Monomere.

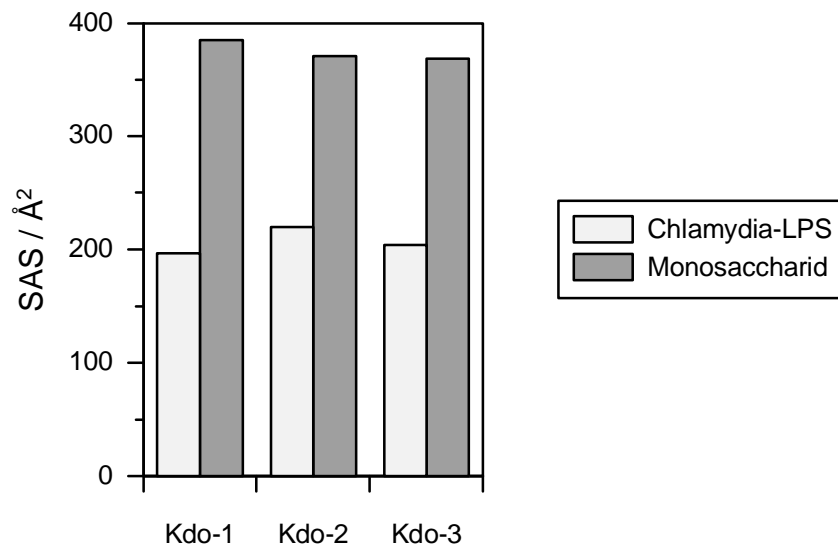


Abbildung 4.29: Exponierte Oberfläche (SAS) eines *Chlamydia*-LPS-Moleküls im Vergleich zu Kdo-Monomeren (Tabelle 4-1).

Obwohl bei der Berechnung der Oberfläche an LPS-Monomeren eine Abschirmung durch benachbarte LPS-Moleküle nicht berücksichtigt wurde, war beim *E. coli* J5-LPS, welches von den drei untersuchten LPS-Varianten den größten Kernzuckerbereich aufweist, eine deutliche Abschirmung einzelner Elemente des Kernzuckerbereichs offensichtlich. Das Ausmaß der intramolekularen Abschirmung korrelierte dabei nicht direkt mit der Reihenfolge der Reste in der Sequenz des Kernzuckerbereiches, wie der Vergleich der Flächen von Kdo-1, Kdo-2 und Hep-1 zeigt. Der Grund dafür liegt in einer Rückfaltung einzelner Zucker in Richtung des Backbones. Eine vergleichbare Rückfaltung der Zucker der Core-Region wurde mittels NMR-Untersuchungen und Monte Carlo-Rechnungen auch bei *Vibrio cholerae*-LPS festgestellt (Vinogradov et al., 1993, Bock et al., 1994).

Im Vergleich der drei LPS-Varianten wird deutlich, daß auch bei isolierten LPS-Molekülen die intramolekulare Abschirmung mit der Größe des Kernzuckerbereiches zunimmt. In Abbildung 4.30 ist der Mechanismus der intramolekularen Abschirmung schematisch dargestellt.

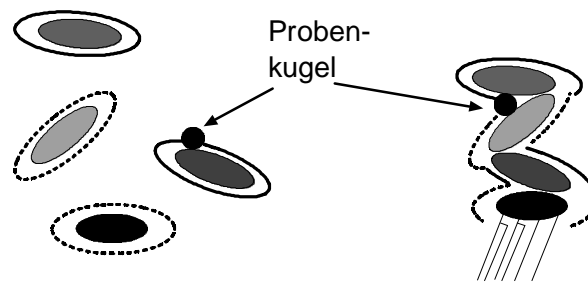


Abbildung 4.30: Bei einzelnen, isolierten Saccharideinheiten (links) kann die Probenkugel die gesamte Oberfläche erreichen, die SAS erreicht ein Maximum. Im kompletten LPS (rechts) sind einzelne Bereiche der Saccharideinheiten (schattierte Ovale) für die Probenkugel (schwarzer Kreis) nicht mehr zugänglich, sie werden durch andere Bestandteile des Cores verdeckt. Die Linien symbolisieren die zugängliche Oberfläche.

Die Werte, die für die isolierten Moleküle ermittelt wurden, können als obere Abschätzung der zugänglichen Flächen interpretiert werden, die für die Interaktion zwischen LPS-Monomeren und Antikörpern oder anderen Bindeproteinen zur Verfügung steht. Liegt das LPS in einer Membran vor, sind die zugänglichen Bereiche weiter eingeschränkt, da zur intramolekularen Abschirmung die intermolekulare Abschirmung hinzukommt, wie die folgenden Ergebnisse zeigen.

### 4.3.2 LPS-Aggregate

Bei allen Vakuum-Simulationen war die Zugänglichkeit einzelner Kernzuckerresiduen des LPS von der Packungsdichte, d.h. der zur Verfügung stehenden Fläche in der Membranebene abhängig.

#### 4.3.2.1 *E. coli* ReLPS

Bei der engeren Packungsvariante (95% Achsskalierung), bei der die Moleküle dichter aneinandergedrückt wurden, war Kdo-2 etwas weniger gut von der Membranoberfläche her zugänglich als Kdo-1. Die Zwischenräume in der Kopfgruppe waren so weit verkleinert, daß die Probenkugel, die zur SAS-Berechnung verwendet wurde, nur noch eine geringere Oberfläche des Kdo-2 'sehen' konnte (Abbildung 4.31). Demgegenüber war bei der mit 100% skalierten Packung die exponierte Oberfläche für beide Kdo-Reste gleich groß.

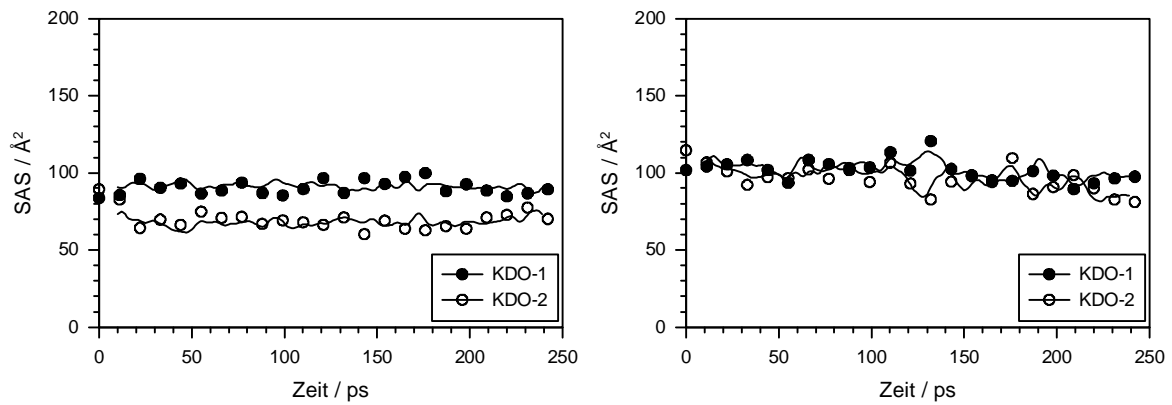


Abbildung 4.31: Exponierte Oberfläche der Kdo-Reste von *E. coli*-ReLPS im Vakuum. Auswertung von Simulationen von 2 · 2-ReLPS im Vakuum bei 95% (links) bzw. 100% (rechts) Skalierung der Packungsparameter.

In Abbildung 4.32 wird deutlich, daß eine Erhöhung der Packungsdichte leicht zur Verdeckung einzelner Bereiche des ReLPS führen kann: Phosphatgruppen, Backbone und Kdo-2 werden dann leicht durch benachbarte LPS-Moleküle abgeschirmt.

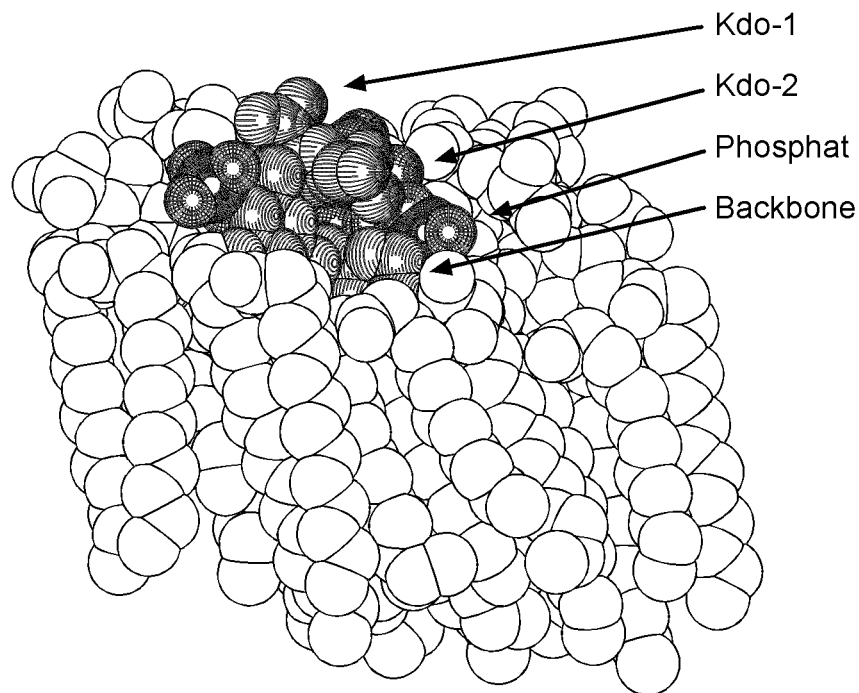


Abbildung 4.32: Schnitt durch einen Monolayer aus *E. coli* ReLPS. Schnappschuß zu Beginn der Simulationsphase von vier LPS-Molekülen im Vakuum (100% Achsskalierung). Wasserstoffatome sind nicht dargestellt. Die Schraffuren wurden wie in Abbildung 3.2 den einzelnen Gruppen des LPS zugeordnet.

Bei den Simulationen in Wasser unterschieden sich demgegenüber die Flächenwerte für Kdo-1 und Kdo-2 deutlich. Der Flächenwert für Kdo-1 lag in allen Fällen bei ca.  $100 \text{ \AA}^2$ , während er für Kdo-2 zwischen  $70$  und  $190 \text{ \AA}^2$  variierte (s. Tabelle 4-2).

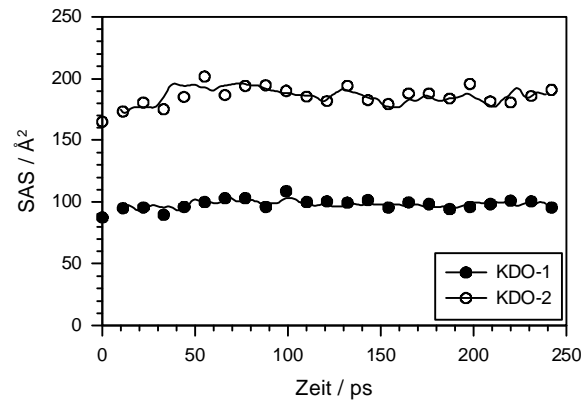


Abbildung 4.33: Exponierte Oberfläche der Kdo-Reste von *E. coli*-ReLPS in Wasser. Auswertung einer Simulation von 2 · 2-ReLPS in Wasser.

Vergleicht man die im Vakuum erzielten Ergebnisse mit denen in Wasser, so stellt man fest, daß in Anwesenheit von Wasser Kdo-2 deutlich stärker exponiert wurde als Kdo-1 (vgl. Abbildungen 4.31 und 4.33). Oder anders ausgedrückt: Die Vernachlässigung des Wassers bei den Vakuum-Simulationen führte dazu, daß Kdo-2 eine zu geringe SAS aufwies. Es ist bekannt, daß Kraftfeldrechnungen im Vakuum globuläre Strukturen mit einer minimierten Oberfläche bevorzugen (van Gunsteren & Berendsen, 1990). Im vorliegenden Fall wurde die Oberfläche des Kdo-2 durch Vermeidung einer 'aufgerichteten' Stellung des Zuckers verkleinert. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 4.34 illustriert.

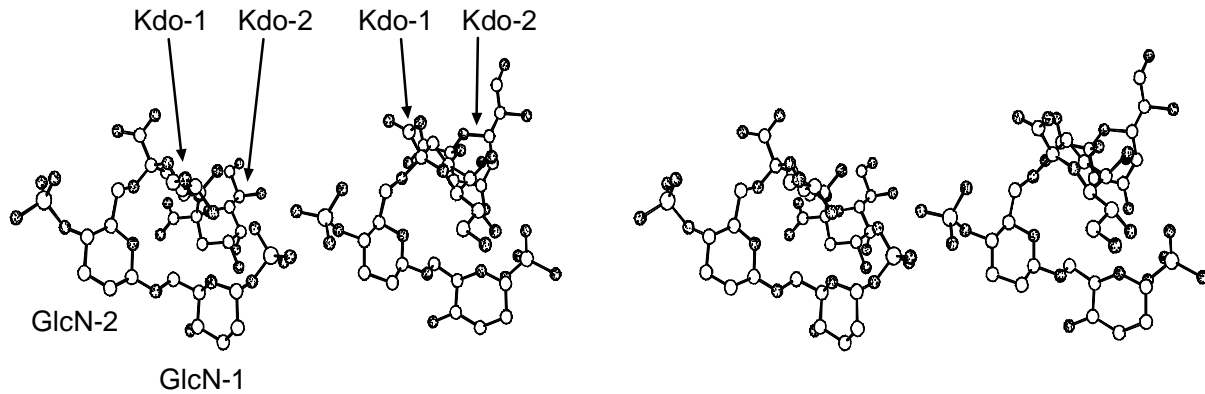


Abbildung 4.34: Stereoabbildung von zwei verschiedenen Konformationen der Kopfgruppe von *E. coli* ReLPS. Links: Nach der Vakuum-Simulation ist Kdo-2 zum GlcN-Backbone zurückgefaltet. Rechts: Nach der Simulation im Wasser ist Kdo-2 aufgerichtet und weist von der Membranoberfläche weg. Die Moleküle sind so orientiert, daß die Membranebene senkrecht auf der Papierebene steht und die Fettsäuren nach unten weisen.

Die Mittelung der Flächenwerte über alle LPS-Moleküle eines Aggregates führt zur Glättung des Verlaufes der SAS-Kurven. Veränderungen der Konformation einzelner Moleküle fallen dadurch weniger stark ins Gewicht. Betrachtet man nur das mittlere LPS-Molekül der  $3 \times 3$ -LPS-Packung (Abbildung 4.35), so fällt auf, daß die anfänglich deutlich größere exponierte Oberfläche des Kdo-2 im Laufe der Simulation abnahm und sich dem Wert für Kdo-1 annäherte.

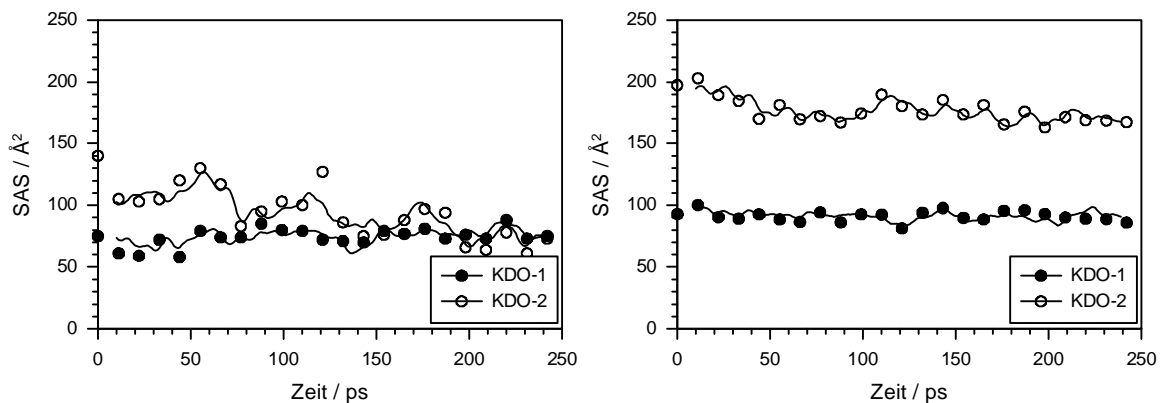


Abbildung 4.35: Exponierte Oberfläche der Kernzuckerreste von *E. coli* Re-LPS in Wasser. Links:  $3 \cdot 3$ -Packung, ein Molekül ausgewertet; rechts:  $4 \cdot 4$ -Packung, vier Moleküle ausgewertet.

Offensichtlich kam es während der Simulation zu einer Umlagerung von Kdo-2 von einer aufgerichteten in eine flach liegende Position, so wie es im Vakuum der Fall war (Abbildung 4.34).



In Abbildung 4.36 ist eine Ansicht der Monolayer-Oberfläche des  $3 \times 3$ -Aggregates dargestellt. Deutlich ist die unterschiedliche Zugänglichkeit einzelner Gruppen zu erkennen.

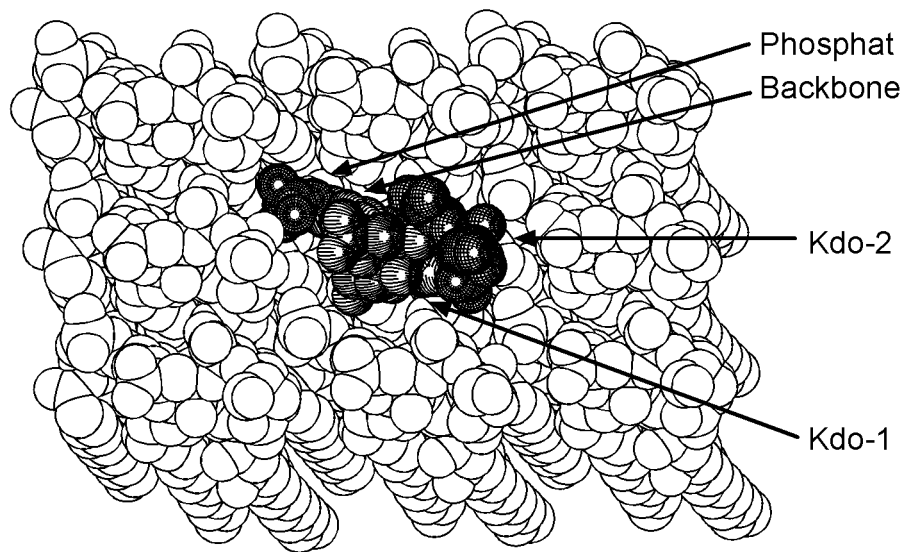


Abbildung 4.36: Ansicht der  $3 \times 3$ -Packung von *E. coli* ReLPS von oben auf die Kopfgruppen. Einzelne Gruppen des innenliegenden LPS-Moleküls sind hervorgehoben. Schnappschuß zu Beginn der Simulationsphase. Die Schraffuren wurden wie in Abbildung 3.2 den einzelnen Gruppen des LPS zugeordnet. Wasserstoffatome sind nicht dargestellt.

Im Gegensatz dazu blieb bei der  $4 \times 4$ -Packung während der gesamten Simulationsdauer der deutliche Unterschied in der SAS zwischen Kdo-1 und Kdo-2 erhalten. Diese Flächenwerte entsprechen den für  $2 \times 2$  LPS-Moleküle in reinem Wasser beobachteten. Durch die Mittelung der Flächenwerte bleiben Konformationsänderungen an einzelnen Molekülen leicht verborgen.

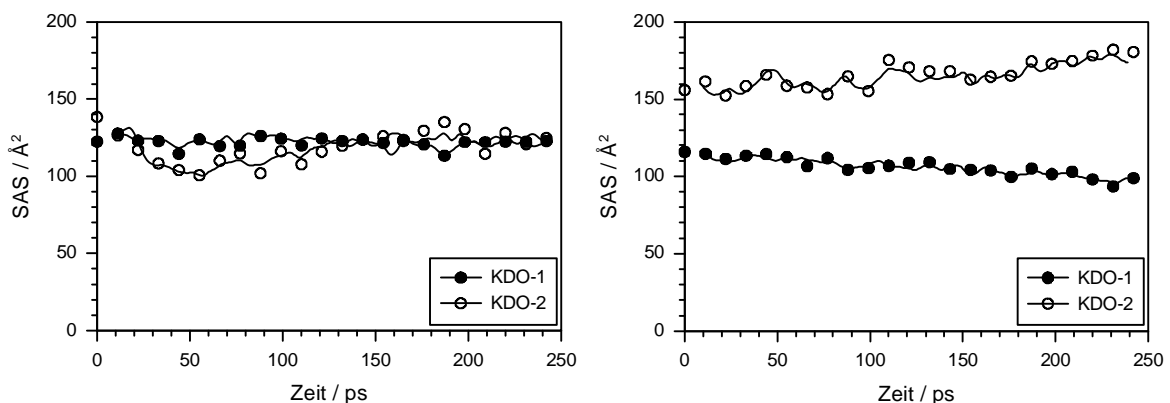


Abbildung 4.37: Exponierte Oberfläche der Kdo-Reste von *E. coli*-ReLPS in Gegenwart von Wasser und Kationen. Auswertung einer Simulation von  $2 \times 2$ -ReLPS in Wasser in Anwesenheit von Natrium- (links) bzw. Calcium-Ionen (rechts).

Das bei der Packung aus neun LPS-Molekülen beobachtete Verhalten war nicht repräsentativ für *E. coli*-ReLPS, sondern stellte einen möglichen Grenzfall dar. Auf der anderen Seite bedeuten diese Unterschiede aber auch, daß von gleichen Startkonformationen aus im Laufe der Simulationen unterschiedliche Zielzustände erreicht werden konnten.

In Anwesenheit von Gegenionen war die exponierte Fläche von Kdo-1 im Vergleich zu reinen LPS-Wasser-Simulationen etwas vergrößert. Allerdings unterschieden sich die Effekte von Natrium- und Calcium-Ionen deutlich: Natrium-Ionen führten zu einer gleichmäßigen Exposition beider Kdo-Reste, während die Anwesenheit von Calcium-Ionen eine stärkere Exposition von Kdo-2 zur Folge hatte (s. Abbildung 4.37). Ein Zusammenhang zwischen den beobachteten Unterschieden in der Kdo-Exposition und den bevorzugten Bindungsstellen der beiden Ionenspezies liegt nahe: zwischen der Carboxylatgruppe von Kdo-2 und der Phosphatgruppe wurde durch ein Natrium-Ion eine Brücke gebildet, die Kdo-2 in einer flach liegenden Stellung fixierte.

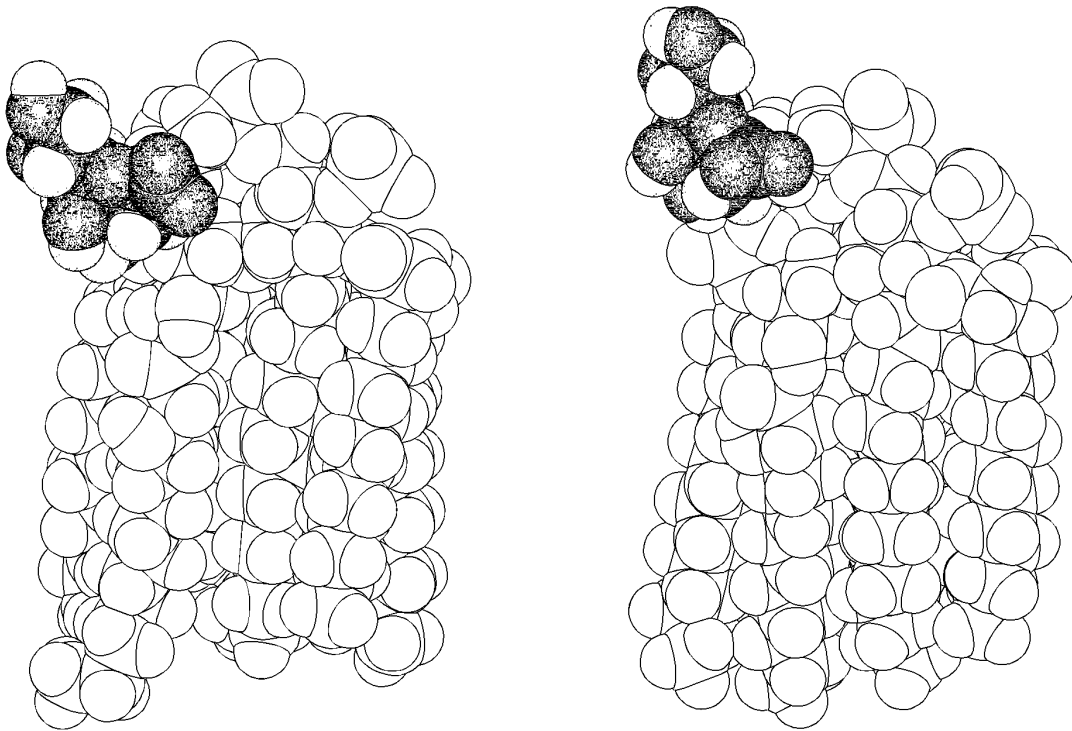


Abbildung 4.38: Zwei Konformationen des ReLPS von *E. coli*. Kohlenstoffatome von Kdo-2 sind durch Schattierung hervorgehoben. In Anwesenheit von Natrium-Ionen ist Kdo-2 in einer liegenden Position (links), während mit Calcium eine aufgerichtete Stellung auftritt (rechts).

In Anwesenheit von Calcium-Ionen war die Situation mit der in reinem Wasser vergleichbar, d.h. Kdo-2 war aufgerichtet und hatte eine deutlich größere SAS als Kdo-1. Das Auseinander-

laufen der Flächenwerte im Verlauf der Simulation wurde durch eine zunehmende Aufrichtung von Kdo-2 verursacht. In Abbildung 4.38 sind die beiden Stellungen von Kdo-2 dargestellt.

In Tabelle 4-2 sind die mittleren Oberflächenwerte aus den einzelnen ReLPS-Simulationen noch einmal zusammengefaßt.

*Tabelle 4-2: Mittlere exponierte Oberfläche der Kernzuckerresiduen von E. coli ReLPS in Å<sup>2</sup>. Mittelwert ± Standardabweichung wurden über 250 ps Simulationsdauer berechnet. Bei den Vakuumrechnungen sind in Klammern die Achsskalierungen der Packungen angegeben.*

Packung	Kdo-1	Kdo-2
2 × 2 LPS, Vakuum (95%)	91 ± 4	69 ± 5
2 × 2 LPS, Vakuum (100%)	102 ± 7	96 ± 9
2 × 2 LPS, Wasser	98 ± 4	186 ± 8
3 × 3 LPS, Wasser	75 ± 7	94 ± 17
4 × 4 LPS, Wasser	91 ± 5	176 ± 10
2 × 2 LPS, Wasser, 16 Na <sup>+</sup>	122 ± 4	118 ± 10
2 × 2 LPS, Wasser, 8 Ca <sup>2+</sup>	106 ± 6	165 ± 8

#### 4.3.2.2 E. coli J5-LPS

Bei *E. coli* J5-LPS waren die Unterschiede bei den Flächenwerten (und damit bei der Zugänglichkeit) zwischen einzelnen Zuckerresten sehr viel größer als beim ReLPS. Durch die vergleichsweise hohe Anzahl von sieben Saccharid-Einheiten im Kernzuckerbereich wurden innenliegende Zucker gegenüber dem Wasser intra- und intermolekular abgeschirmt, wie es bereits beim Monomer des J5-LPS diskutiert wurde (Kapitel 4.3.1). Diese Abschirmung wird verständlich, wenn man Abbildung 4.39 betrachtet: Viele Gruppen (Backbone, Phosphat, Kdo-1, Hep-3) liegen so tief im Monolayer verborgen, daß sie von der Oberfläche her kaum erreicht werden können.

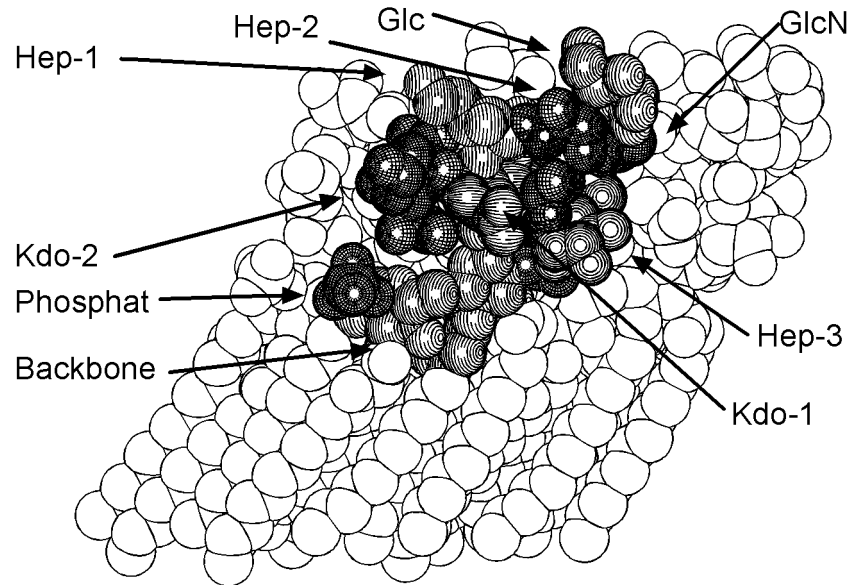


Abbildung 4.39: Schnitt durch einen Monolayer aus *E. coli* J5-LPS-Molekülen. Schnappschuß zu Beginn der Simulation von vier LPS-Molekülen mit Wasser. Wasserstoffatome sind nicht abgebildet. Die Schraffuren sind wie in Abbildung 3.4 den einzelnen Gruppen des LPS zugeordnet.

Im Vakuum (Abbildung 4.40) und auch in Anwesenheit von Wasser (Abbildung 4.41) war Glc mit einer SAS von 110 bis 150 Å<sup>2</sup> der am besten zugängliche Zucker des Kernzuckerbereiches von J5-LPS. Eine deutlich kleinere exponierte Oberfläche hatte Hep-1 mit 40 bis 100 Å<sup>2</sup> und GlcN mit ca. 30 Å<sup>2</sup>, während die restlichen Residuen nur Werte unter 30 Å<sup>2</sup> erzielten. Durch seine Lage im Inneren des Kopfgruppenbereichs war GlcN besonders sensitiv für die Verkürzung der Packungsvektoren: Bei der mit 95% skalierten Packung wurde im Vakuum nur noch ein Oberflächenwert von 10 Å<sup>2</sup> (statt 30 Å<sup>2</sup>) gemessen.

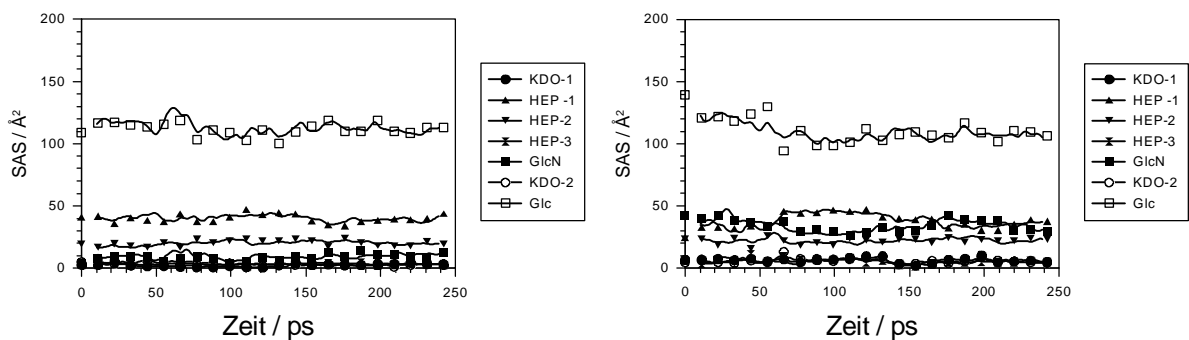


Abbildung 4.40: Exponierte Oberfläche der Kernzuckerreste von *E. coli* J5-LPS im Vakuum. Auswertung von Simulationen von 2 · 2-LPS im Vakuum bei 95% (links) bzw. 100% (rechts) Skalierung der Packungsvektoren.

Im Vakuum ergaben sich für Glc kleinere SAS-Werte als bei Simulationen unter Einbeziehung von Wasser. Der Verdacht liegt nahe, daß - wie beim ReLPS - die Vakuum-Simulationen die Exponierung der Monoschichtoberfläche nicht richtig wiedergeben.

Bei den größeren LPS-Ensembles mit neun bzw. 16 Molekülen war die Exponierung von Hep-1 und Kdo-2 stärker als bei den kleinen Packungen mit vier LPS-Molekülen (Tabelle 4-3). Dies ist bemerkenswert, da allen Simulationen die gleichen Ausgangsstrukturen (Konformationen) zugrunde lagen.

Die Zunahme der exponierten Oberfläche von Hep-1 von ca.  $50 \text{ \AA}^2$  auf mehr als  $100 \text{ \AA}^2$  bei der Simulation mit neun LPS-Molekülen wurde durch eine Umorientierung im Kopfgruppenbereich des J5-LPS verursacht. Diese Beobachtung illustriert, daß die Moleküle in der Lage waren, innerhalb der Simulationszeit von 250 ps ihre Konformation deutlich zu ändern.

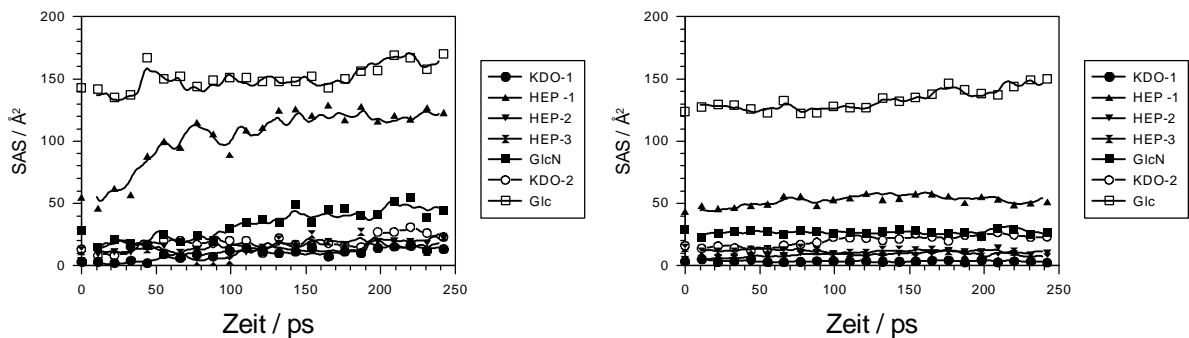


Abbildung 4.41: Exponierte Oberfläche der Kernzuckerreste von *E. coli*-J5-LPS in Wasser. Links: 3 · 3-Packung, ein Molekül ausgewertet; rechts: 4 · 4-Packung, vier Moleküle ausgewertet.

In Abbildung 4.42 ist der intermolekulare Abschirmungseffekt deutlich zu erkennen: Bei den Simulationen von LPS-Aggregaten waren nur wenige Gruppen des Kernzuckerbereiches von *E. coli* J5-LPS von der Monolayer-Oberfläche her zugänglich.

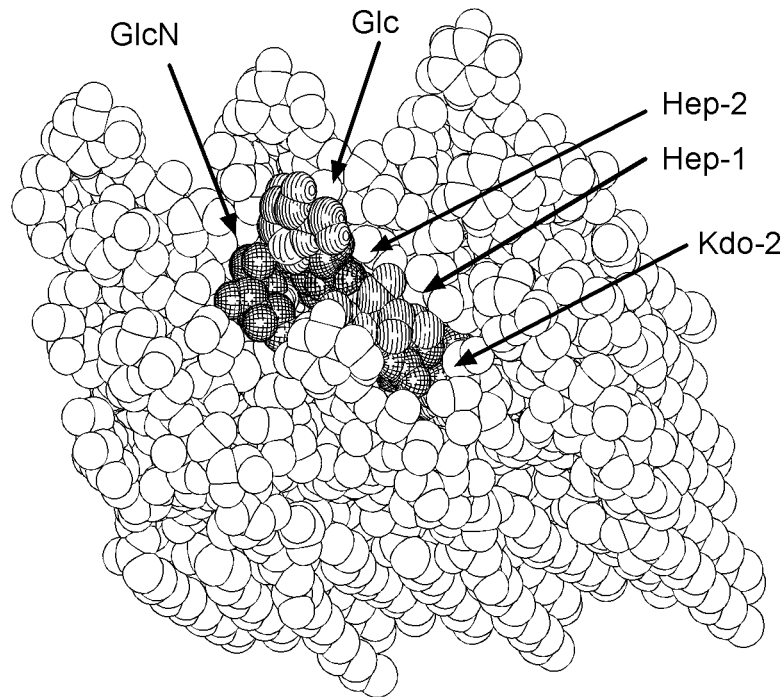


Abbildung 4.42: Ansicht der 3 × 3-Packung von *E. coli* J5-LPS. Schnappschuß zu Beginn der Simulationsphase. Die Schraffuren sind wie in Abbildung 3.4 einzelnen Gruppen des zentralen LPS-Moleküls zugeordnet. Wasserstoffatome sind nicht dargestellt.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei der Simulation von *E. coli* ReLPS beeinflusste die Anwesenheit von Kationen die Oberflächenwerte beim J5-LPS nur geringfügig. In Anwesenheit von Calcium-Ionen wurde für Glc ein etwas geringerer Wert erreicht als in Gegenwart von Natrium-Ionen, beide Werte lagen aber im Bereich der in reinem Wasser ermittelten SAS-Werte. Die Rangfolge der Exposition der verschiedenen Elemente des Kernzuckerbereiches entsprach der im Vakuum bzw. mit vier LPS-Molekülen in Wasser ermittelten. Der Grund für den geringen Effekt der Kationen auf die Exposition der Kernzucker beim J5-LPS liegt in der hohen Packungsdichte im Kopfgruppenbereich des LPS: Für eine drastische Umorientierung der Saccharideinheiten nach Bindung von Kationen ist wenig Platz (Abbildungen 4.39 und 4.42).

In Tabelle 4-3 sind die mittleren zugänglichen Oberflächen für die einzelnen Zucker des *E. coli* J5-LPS zusammengefaßt.

Tabelle 4-3: Mittlere exponierte Oberfläche der Kernzuckerresiduen von *E. coli* J5-LPS in  $\text{\AA}^2$ . Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung sind über 250 ps Simulationsdauer berechnet. Bei den Vakuumrechnungen (Vak.) sind in Klammern die Skalierungsfaktoren der Packungsparameter angegeben. \*: Für Hep-1 sind zwei verschiedene Werte für die Zeitintervalle 0 bis 30 ps und 50 bis 250 ps angegeben, da die Fläche zwischen 30 und 50 ps stark anstieg (Abbildung 4.41).

	Glc	GlcN	Hep-1	Hep-2	Hep-3	Kdo-1	Kdo-2
$2 \times 2$ LPS, Vak. (95%)	$113 \pm 7$	$9 \pm 3$	$40 \pm 3$	$20 \pm 2$	$3 \pm 1$	$2 \pm 1$	$4 \pm 2$
$2 \times 2$ LPS, Vak. (100%)	$110 \pm 9$	$34 \pm 5$	$38 \pm 6$	$22 \pm 3$	$5 \pm 2$	$6 \pm 2$	$6 \pm 2$
$2 \times 2$ LPS, H <sub>2</sub> O	$133 \pm 8$	$27 \pm 2$	$52 \pm 4$	$9 \pm 2$	$11 \pm 2$	$3 \pm 1$	$20 \pm 4$
$3 \times 3$ LPS, H <sub>2</sub> O*	$150 \pm 11$	$33 \pm 12$	$58 \pm 8$	$15 \pm 5$	$15 \pm 6$	$10 \pm 5$	$19 \pm 6$
			$115 \pm 8$				
$4 \times 4$ LPS, H <sub>2</sub> O	$130 \pm 5$	$13 \pm 2$	$78 \pm 5$	$6 \pm 1$	$13 \pm 2$	$3 \pm 1$	$28 \pm 3$
$2 \times 2$ LPS, H <sub>2</sub> O, 16 Na <sup>+</sup>	$141 \pm 9$	$30 \pm 3$	$35 \pm 2$	$13 \pm 2$	$2 \pm 1$	$3 \pm 1$	$4 \pm 1$
$2 \times 2$ LPS, H <sub>2</sub> O, 8 Ca <sup>2+</sup>	$123 \pm 4$	$27 \pm 3$	$40 \pm 3$	$21 \pm 1$	$0 \pm 0$	$2 \pm 1$	$2 \pm 1$

#### 4.3.2.3 Chlamydia-LPS

Auch bei *Chlamydia*-LPS beeinflusste der vorgegebene Flächenwert der Packung im Vakuum deutlich die Exponierung einzelner Residuen des Kernzuckerbereiches. Bei der engeren Packung (95% Achsskalierung) wurden Kdo-1 und Kdo-3 von Kdo-2 gegenüber der Monolayer-Oberfläche abgeschirmt, während die SAS-Werte bei dem mit 100% skalierten Aggregat für Kdo-1 und Kdo-2 nahezu identisch waren (s. Abbildung 4.43). Eine sehr hohe Packungsdichte verringerte folglich - ebenso wie beim ReLPS und beim J5-LPS von *E. coli* - die Zugänglichkeit tiefer im Monolayer liegender Zucker.

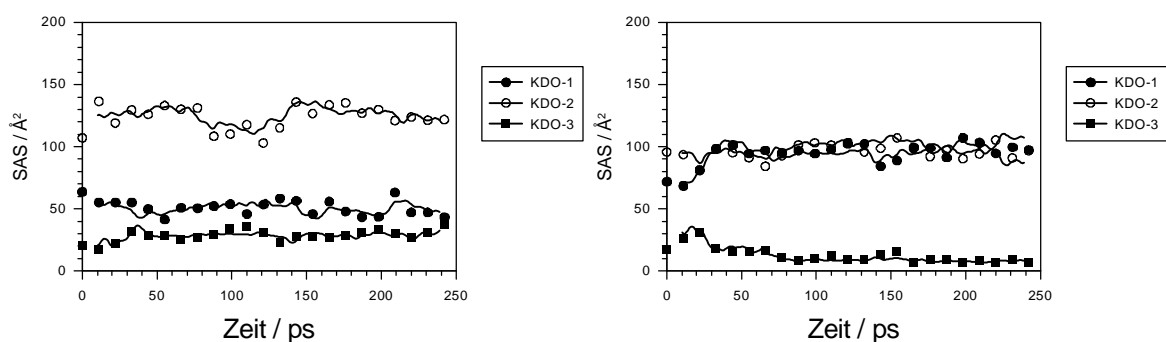


Abbildung 4.43: Exponierte Oberfläche der Kernzuckerreste von *Chlamydia*-LPS im Vakuum. Auswertung von Simulationen von  $2 \times 2$ -LPS im Vakuum bei 95% (links) bzw. 100% (rechts) Achsskalierung.

Dieser Effekt wird verständlich, wenn man Abbildung 4.44 betrachtet: Die dichte Packung der Kernzucker führt zur Verdeckung von Gruppen, die tiefer im Monolayer liegen.

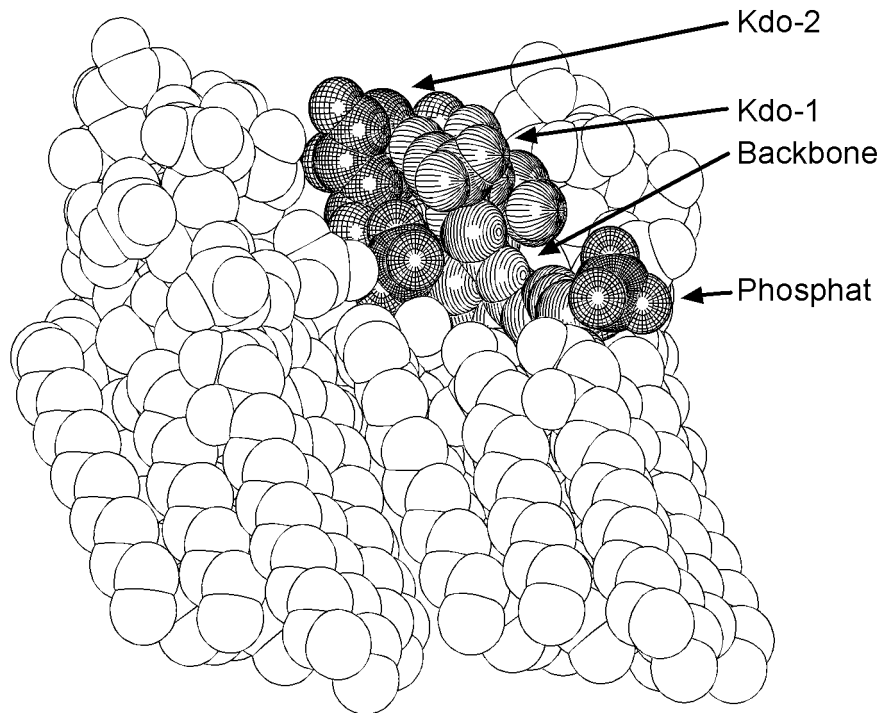


Abbildung 4.44: Schnitt durch einen Monolayer aus *Chlamydia*-LPS. Schnappschuß zu Beginn der Simulationsphase von vier LPS-Molekülen im Vakuum (100 % Achsskalierung). Kdo-3 ist hinter Kdo-1 und dem Backbone verborgen (vgl. Abbildung 3.7). Wasserstoffatome sind nicht dargestellt. Die Schraffuren sind wie in Abbildung 3.7 den einzelnen Gruppen des LPS zugeordnet.

Im Vergleich zu den Vakuum-Rechnungen war in Anwesenheit von Wasser die exponierte Oberfläche von Kdo-2 gegenüber der von Kdo-1 deutlich vergrößert; Kdo-3 wies in allen Fällen die kleinsten SAS-Werte auf (Abbildung 4.45). Dies liegt in der Konformation des *Chlamydia*-LPS-Modells begründet: Kdo-3 ist in Richtung des Lipid A zurückgefaltet (Abbildung 3.7), so daß Kdo-2 der am stärksten exponierte Rest im Kernzuckerbereich ist.

Am Beispiel des  $3 \times 3$ -Aggregates von *Chlamydia*-LPS konnte der Einfluß der Integrität der Membran auf die Exposition einzelner Gruppen des LPS untersucht werden. Der Monolayer aus neun *Chlamydia*-LPS-Molekülen blieb nicht über die gesamte Simulationsdauer stabil (s. Kapitel 4.3.1). Deshalb war das zentrale LPS-Molekül im  $3 \times 3$ -Aggregat in der Membranebene nicht während der gesamten Simulationsdauer vollständig und lückenlos von anderen LPS-Molekülen umgeben, d.h. die intramolekulare Abschirmung wurde in diesem Fall nicht ausreichend berücksichtigt. Folgerichtig traten für die einzelnen Zucker deutlich höhere Flächenwerte auf als bei allen anderen Simulationen (Abbildung 4.45). Der allmähliche Anstieg der Exponierung von Kdo-3 war auf den beginnenden Zerfall der Packung zurückzuführen, der



bei der visuellen Inspektion der Trajektorie beobachtet werden konnte. Dies führte zu hohen Oberflächenwerten, die nicht den Gegebenheiten in einer intakten Membran entsprechen.

Demgegenüber stimmten die SAS-Werte der Packungen mit vier und mit 16 *Chlamydia*-LPS-Molekülen überein (Abbildung 4.45).

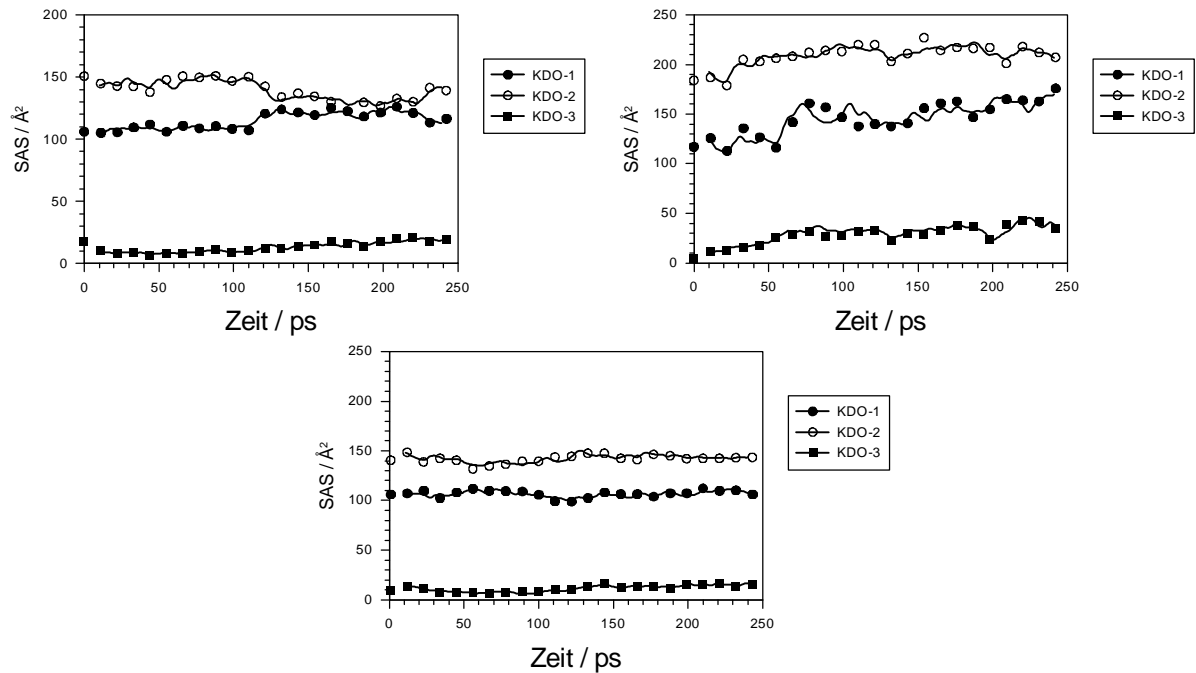


Abbildung 4.45: Exponierte Oberfläche der Kernzuckerreste von *Chlamydia*-LPS in Wasser bei unterschiedlichen Aggregatgrößen. Oben links: 2 · 2-Packung, vier Moleküle ausgewertet; oben rechts: 3 · 3-Packung, ein Molekül ausgewertet; unten: 4 · 4-Packung, ein Molekül ausgewertet.

Der Abschirmungseffekt eines intakten Monolayers ist in Abbildung 4.46 ersichtlich: Am stärksten sind Kdo-2 und Kdo-1 exponiert, Kdo-3 liegt tief im Inneren der Monoschicht verborgen.

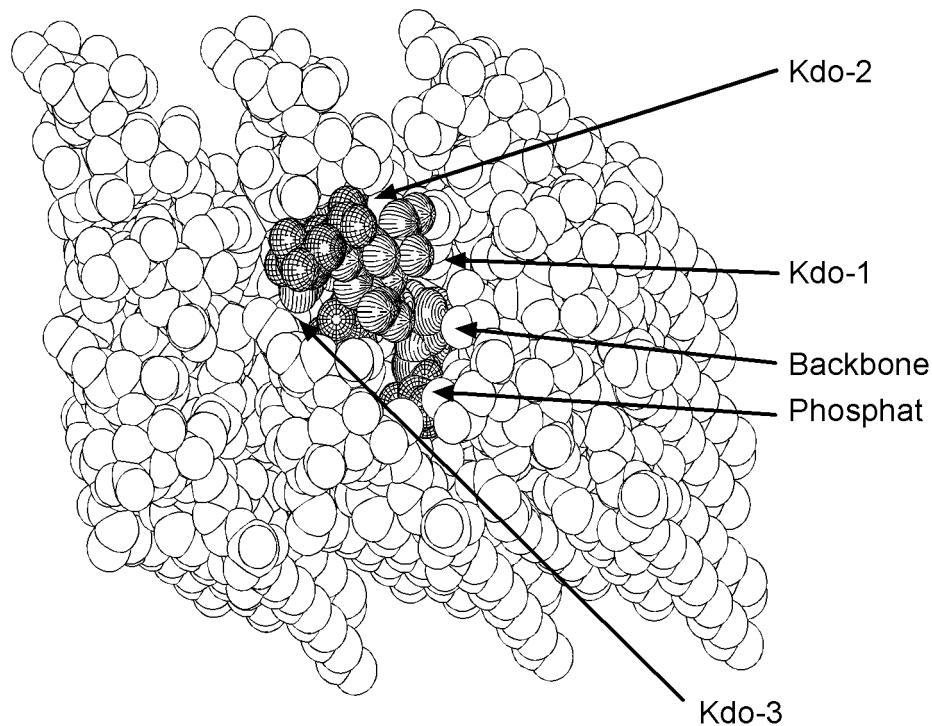


Abbildung 4.46: Ansicht der Oberfläche eines Monolayers aus 3-Chlamydia-LPS-Molekülen. Schnappschuß zu Beginn der Simulationsphase. Die Schraffuren wurden wie in Abbildung 3.7 den einzelnen Gruppen des LPS zugeordnet. Wasserstoffatome sind nicht abgebildet.

Die Anwesenheit von Kationen beeinflusste die SAS-Werte bei *Chlamydia*-LPS nur geringfügig (Abbildung 4.47). Allerdings kam es in Gegenwart von Calcium-Ionen zur nahezu vollständigen Verdeckung von Kdo-3 (Rückgang der Fläche von ca.  $15 \text{ \AA}^2$  auf  $2 \text{ \AA}^2$ ). Dies ist darauf zurückzuführen, daß sich zwischen dem Lipid A und Kdo-3 Calcium-Brücken bildeten, die durch die Phosphatgruppen des Lipid A und die Carboxylatgruppen des Kdo-3 vermittelt wurden.

Die mittleren Oberflächenwerte für *Chlamydia*-LPS sind in Tabelle 4-4 zusammengefaßt.

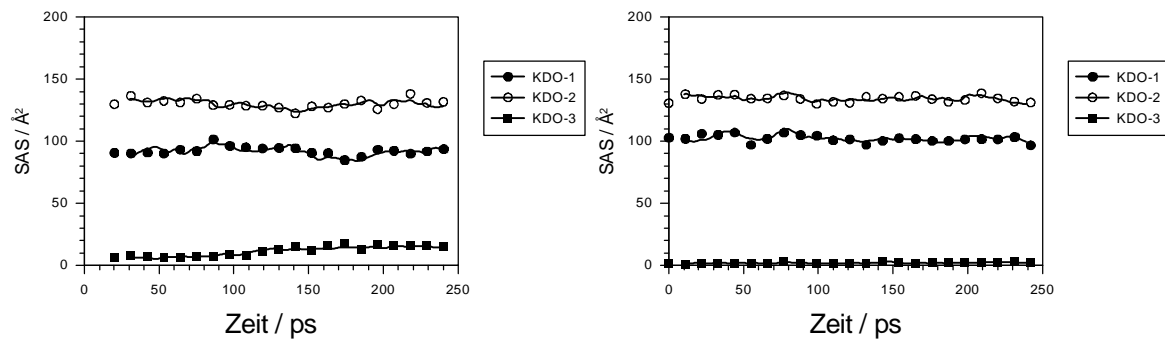


Abbildung 4.47: Exponierte Oberfläche der Kernzuckerreste von *Chlamydia*-LPS in Gegenwart von Wasser und Kationen. Auswertung einer Simulation von  $2 \times 2$ -LPS in Wasser in Anwesenheit von Natrium- (links) bzw. Calcium-Ionen (rechts).

Tabelle 4-4: Mittlere exponierte Oberfläche der Kernzuckerresiduen von *Chlamydia*-LPS in  $\text{\AA}^2$ . Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung beziehen sich auf die Auswertung von 250 ps MD-Simulation. Bei den Vakuumrechnungen sind in Klammern die Skalierungsfaktoren der Packungsvektoren angegeben. \*: Der Monolayer mit neun LPS-Molekülen blieb nicht über die gesamte Simulationsdauer stabil, die SAS-Werte sind deshalb überhöht.

	Kdo-1	Kdo-2	Kdo-3
$2 \times 2$ LPS, Vakuum (95%)	$51 \pm 6$	$125 \pm 9$	$29 \pm 5$
$2 \times 2$ LPS, Vakuum (100%)	$95 \pm 11$	$98 \pm 7$	$13 \pm 8$
$2 \times 2$ LPS, Wasser	$114 \pm 7$	$139 \pm 8$	$13 \pm 4$
$3 \times 3$ LPS, Wasser*	$205 \pm 14$	$219 \pm 7$	$52 \pm 12$
$4 \times 4$ LPS, Wasser	$107 \pm 4$	$143 \pm 4$	$12 \pm 3$
$2 \times 2$ LPS, Wasser, 16 $\text{Na}^+$	$92 \pm 4$	$130 \pm 4$	$12 \pm 4$
$2 \times 2$ LPS, Wasser, 8 $\text{Ca}^{2+}$	$103 \pm 3$	$134 \pm 3$	$2 \pm 1$

### 4.3.3 Die Exposition des Lipid A

Angesichts der Vielzahl an Berichten über Antikörper, die Bestandteile des Lipid A erkennen (s. z.B. Galanos et al., 1971, 1984; Mattsby-Baltzer & Alving, 1984; Kuhn et al., 1992), ist eine Analyse der exponierten Oberfläche des Lipid A von besonderem Interesse. Im folgenden sind sowohl die Simulationsergebnisse in Wasser als auch die der Vakuum-Rechnungen dargestellt, um den Einfluß der Rahmenbedingungen auf die berechneten Oberflächenwerte vergleichen zu können.

Wie in den Abbildungen 4.48, 4.49 und 4.50 dargestellt, nahm bei allen drei LPS-Varianten im Vakuum die Zugänglichkeit der Lipid A-Epitope mit steigendem Skalierungsfaktor der Packung zu. Dies zeigt, daß die intermolekulare Abschirmung tieferliegender Bereiche des LPS

mit der Packungsdichte korrelierte. Die stärkste Exposition von Lipid A-Epitopen wurde - wie erwartet - bei der Untersuchung der freien LPS-Monomere beobachtet. Bei monomerem LPS sind alle Elemente gut zugänglich, während aufgrund der intermolekularen Abschirmung im LPS-Aggregat dort nur noch ein Bruchteil der Oberfläche des Lipid A exponiert ist.

Die weitere Diskussion beschränkt sich auf die hydratisierten LPS-Aggregate in An- bzw. Abwesenheit von Kationen.

Die exponierten Oberflächen der hydratisierten LPS-Aggregate betragen beim *E. coli* ReLPS maximal  $35 \text{ \AA}^2$ , während für *Chlamydia* und *E. coli* J5-LPS SAS-Werte von weniger als  $20 \text{ \AA}^2$  gemessen wurden. Dies zeigt den deutlichen Einfluß der Kopfgruppengröße auf die Zugänglichkeit des Lipid A: ReLPS hatte den kleinsten Kernzuckerbereich (zwei Kdo-Zucker) und zeigte die stärkste Lipid A-Exponierung, *E. coli* J5-LPS mit dem größten Kernzuckerbereich (Heptasaccharid) wies die geringste Exponierung von Lipid A-Epitopen auf.

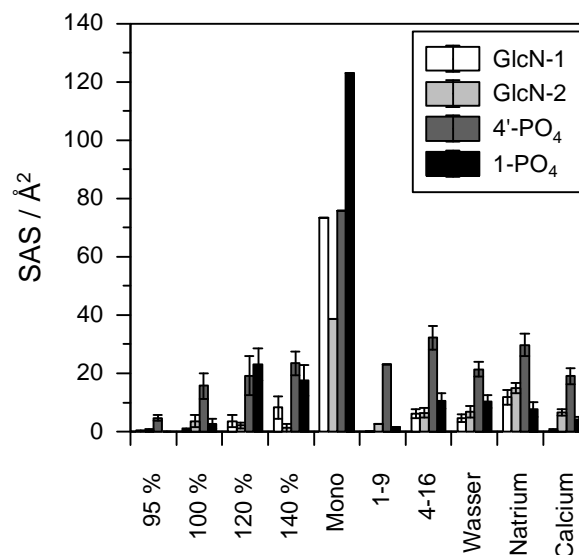


Abbildung 4.48: Mittlere Exposition (SAS) einzelner Gruppen des Lipid A von *E. coli* Re in Abhängigkeit von der Umgebung und den Simulationsbedingungen. Mittelwert und Standardabweichung beziehen sich auf 250 ps MD-Simulation. 95% bis 140% bezeichnet die Skalierungsfaktoren der Vakuum-Rechnungen; Mono: Monomer; 1-9: ein LPS aus der 3 × 3-Packung, 4-16: vier LPS-Moleküle aus der 4 × 4-Packung.

Während bei *E. coli* ReLPS vor allem die 4'-Phosphatgruppe zugänglich war, wurde bei *E. coli* J5-LPS das GlcN-1 des Backbones am stärksten exponiert. Die Epitope des Lipid A von *Chlamydia*-LPS waren alle in vergleichbarem Ausmaß zugänglich. Diese Unterschiede sind bemerkenswert, da allen untersuchten LPS-Varianten dieselbe Struktur des Lipid A zugrunde lag.

Offensichtlich beeinflussten die Kernzuckerbereiche nicht nur das gesamte Ausmaß der Exponierung des Lipid A sondern auch, welche Bereiche des Lipid A mehr oder weniger gut zugänglich waren. Bei *E. coli* ReLPS verdeckten die beiden Kdo-Zucker des Core das Backbone und die 1-Phosphatgruppe, während die 4'-Phosphatgruppe relativ gut zugänglich blieb (vgl. Abbildung 3.2). Die voluminöse Kopfgruppe des *E. coli* J5-LPS (Abbildung 3.4) behinderte den Zugang zu den Lipid A-Epitopen deutlich. Lediglich GlcN-1 blieb erreichbar, da der Kernzuckerbereich stärker über GlcN-2 zentriert war, so daß ein schmaler Zugang für die Probenkugel erhalten blieb. Demgegenüber wurde die an GlcN-1 gebundene Phosphatgruppe nahezu vollständig intermolekular abgeschirmt.

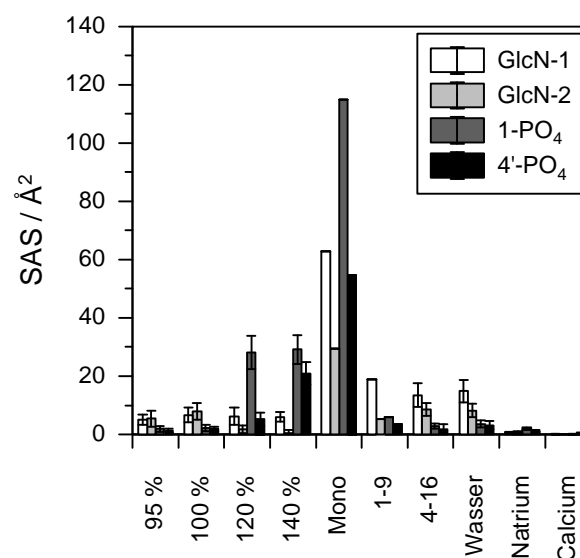


Abbildung 4.49: Mittlere Exposition (SAS) einzelner Gruppen des Lipid A von *E. coli* J5 in Abhängigkeit von der Umgebung und den Simulationsbedingungen. Mittelwert und Standardabweichung beziehen sich auf 250 ps MD-Simulation. 95% bis 140% bezeichnet die Skalierungsfaktoren der Vakuum-Rechnungen; Mono: Monomer; 1-9: ein LPS aus der 3 × 3-Packung, 4-16: vier LPS-Moleküle aus der 4 × 4-Packung.

Bei *Chlamydia*-LPS bewirkte die Rückfaltung von Kdo-3 (Abbildung 3.7), daß die 4'-Phosphatgruppe - verglichen mit *E. coli* ReLPS - eine deutlich geringere exponierte Oberfläche aufwies. Auffällig war der deutliche Effekt der Kationen auf die Exponierung der Lipid A-Epitope bei *E. coli* J5-LPS: In Anwesenheit der Kationen war das Lipid A von der Membranoberfläche her praktisch nicht mehr zugänglich, die Flächenwerte betragen weniger als 5 Å<sup>2</sup>. Demgegenüber konnte bei *E. coli* ReLPS und *Chlamydia*-LPS kein Effekt von Kationen auf die Erreichbarkeit der Lipid A-Epitope festgestellt werden.

Die sehr geringe Exposition von Bestandteilen des Lipid A, die sich in kleinen SAS-Werten ausdrückte, macht eine spezifische Erkennung von Lipid A-Epitopen in den untersuchten LPS-Aggregaten durch Antikörper unwahrscheinlich, wenn man die Dimensionen eines Antikörpers ( $M_r(\text{IgG}) \approx 150 \text{ kDa}$  vs.  $M_r(\text{ReLPS}) \approx 2 \text{ kDa}$ ) bedenkt. Die Konsequenzen dieser Erkenntnis für die Bindung von LPS durch Proteine werden gesondert in Abschnitt 4.4 diskutiert.

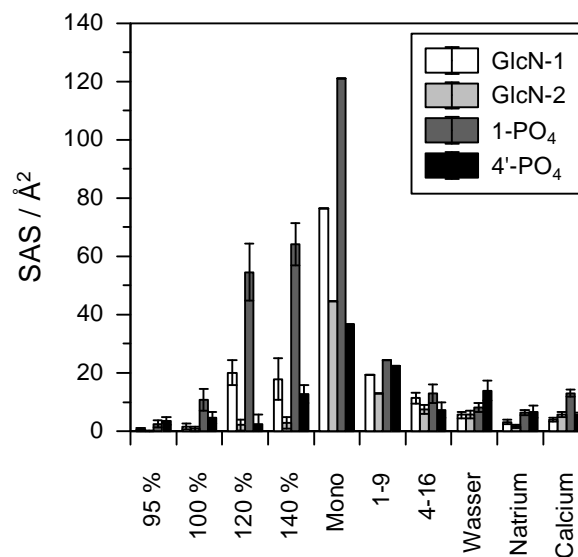


Abbildung 4.50: Mittlere Exposition (SAS) einzelner Gruppen des Lipid A von *Chlamydia*-LPS in Abhängigkeit von der Umgebung und den Simulationsbedingungen. Mittelwert und Standardabweichung beziehen sich auf 250 ps MD-Simulation. 95% bis 140% bezeichnet die Skalierungsfaktoren der Vakuum-Rechnungen; Mono: Monomer; 1-9: ein LPS aus der 3 × 3-Packung, 4-16: vier LPS-Moleküle aus der 4 × 4-Packung.

#### 4.3.4 Vergleich der exponierten Oberflächen der drei LPS-Modelle

Der Absolutwert der exponierten Oberfläche war bei *E. coli* ReLPS mit  $284 \text{ \AA}^2$  am größten und bei *E. coli* J5-LPS mit  $255 \text{ \AA}^2$  am kleinsten. Dazwischen lag *Chlamydia*-LPS mit einer exponierten Gesamtoberfläche von  $266 \text{ \AA}^2$ . Dies ist auf den ersten Blick erstaunlich, da das ReLPS den kleinsten und das RcLPS von *E. coli* J5 den größten Kernzuckerbereich besitzt. Zudem stand allen Molekülen die gleiche Fläche in der Membranebene ( $134 \text{ \AA}^2$ ) zur Verfügung. Die Erklärung für diese Diskrepanz liegt in der Unebenheit der Monolayer, die zur Vergrößerung der zugänglichen Oberfläche führte. Dabei ist festzuhalten, daß die Unebenheit der Monolayer nicht auf einer Verschiebung der Moleküle gegeneinander beruhte; Phosphatgrup-

pen und Backbone befanden sich bei allen Molekülen auf gleicher Höhe. Stattdessen handelt es sich um einen Effekt der Gestalt der Kopfgruppen, wie in Abbildung 4.51 illustriert.

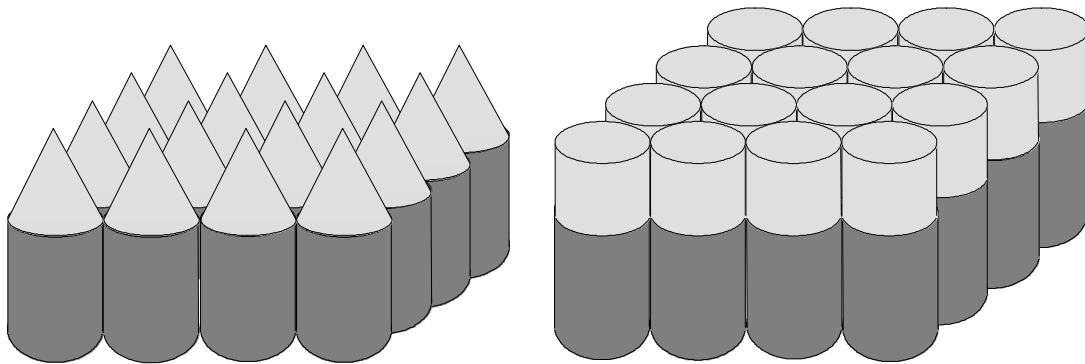


Abbildung 4.51: Bei gleicher Grundfläche beeinflusst die Gestalt der Moleküle die zugängliche Oberfläche. Hellgraue Körper symbolisieren die Kopfgruppen, dunkelgrau ist der hydrophobe Bereich dargestellt. Links: Große Unebenheiten der Membranoberfläche entstehen durch die besondere Form der Moleküle und resultieren in hohen Oberflächenwerten. Rechts: Kompakte Moleküle bilden eine nahezu geschlossene Ebene, die Oberfläche entspricht ungefähr der Grundfläche.

Bei näherer Betrachtung der Oberflächenstruktur der Monolayer der drei verschiedenen LPS-Varianten wird die Reihenfolge der Oberflächenwerte verständlich: In Abbildung 4.52 ist an der gleichförmigen Schwärzung deutlich zu erkennen, daß die Oberfläche des *E. coli* J5-LPS-Monolayers ebener war als die des ReLPS oder des *Chlamydia*-LPS. Helle Bereiche in der Grafik repräsentieren Vertiefungen in der Monolayer-Oberfläche. Das J5-LPS bildete eine geschlossene Oberfläche, bei der nur die äußersten Oligosaccharide des Kernzuckerbereiches von der Membranoberfläche her zugänglich waren. Demgegenüber füllte der kleine, aus nur zwei Kdo-Zuckern bestehende Core des ReLPS das zur Verfügung stehende Volumen nicht vollständig aus, so daß einzelne Wassermoleküle (die bei der Oberflächenberechnung als Probe verwendet werden) tiefer in den Monolayer eindringen konnten; die Oberfläche war zerklüftet.

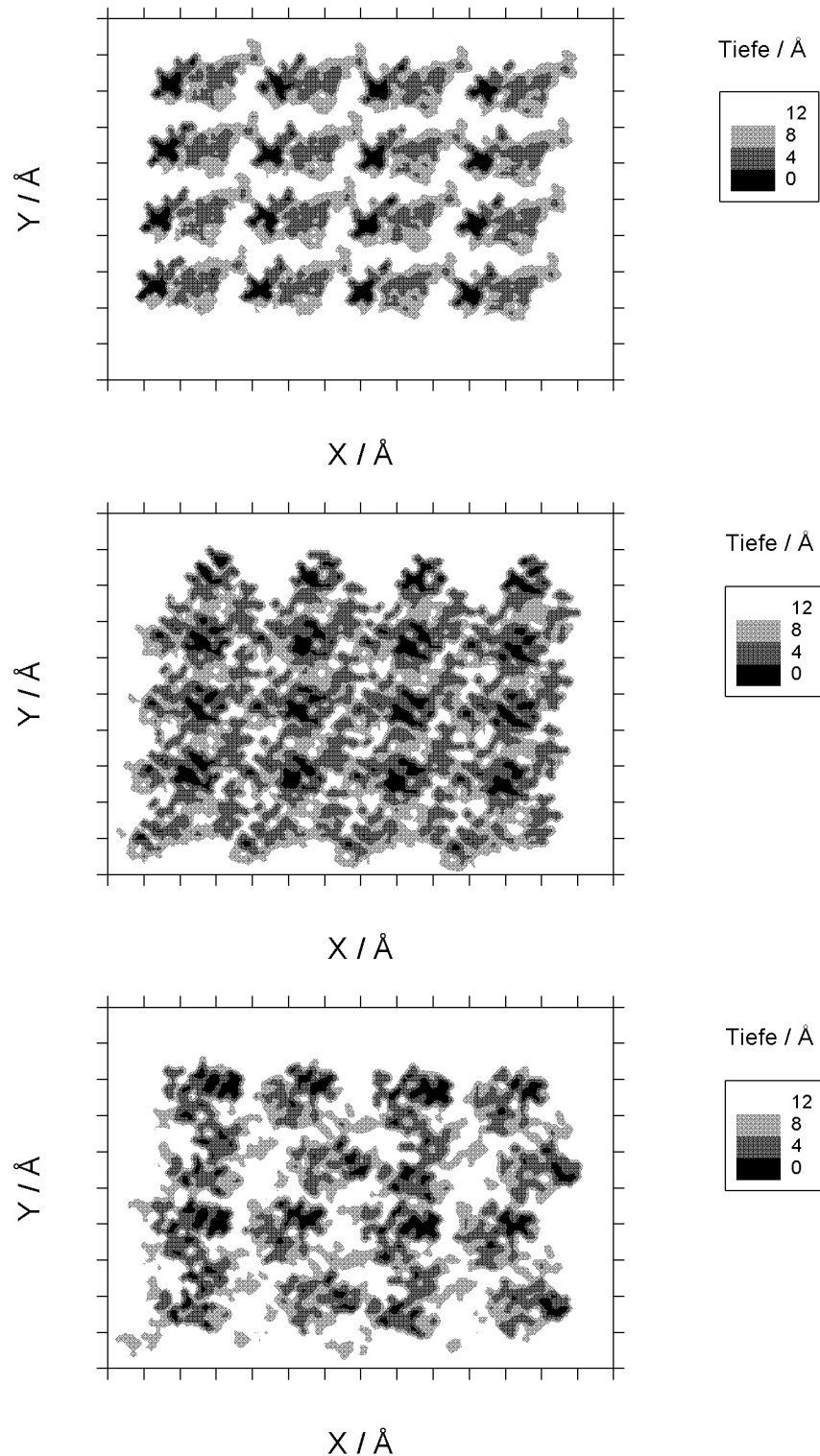


Abbildung 4.52: Oberflächenkontur von drei LPS-Aggregaten bestehend aus jeweils 16 LPS-Molekülen von *E. coli* Re (oben), *E. coli* J5 (Mitte) bzw. *Chlamydia* (unten). X- und Y-Achse liegen in der Membranebene und sind in 5 Å-Schritten geteilt; die Schwärzung (Z-Achse) gibt an, in welcher Höhe - bezogen auf das am weitesten in das Wasser reichende Atom des LPS - Atome des LPS angetroffen werden. Die Schwärzung nimmt mit dem Abstand von der Membranoberfläche ab.



*Chlamydia*-LPS nahm demgegenüber sowohl bei der exponierten Oberfläche als auch bei der Größe des Kernzuckerbereiches eine Stellung zwischen den beiden *E. coli*-LPS-Varianten ein.

Die drei untersuchten LPS-Varianten unterschieden sich aber nicht nur in der exponierten Gesamtoberfläche voneinander, wie Abbildung 4.53 zeigt.

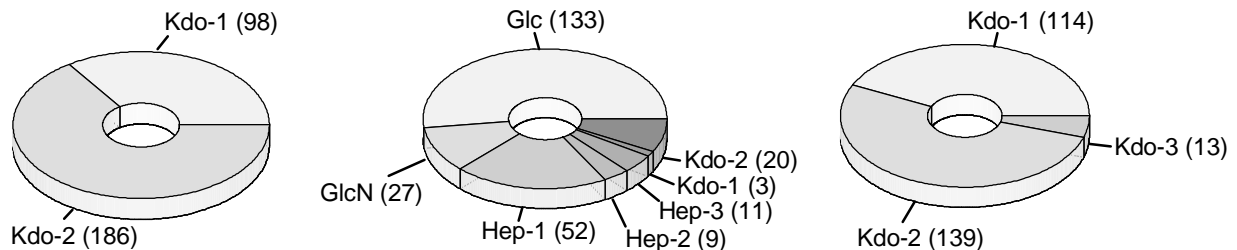


Abbildung 4.53: Relative Exponierung der Kernzucker von *E. coli* ReLPS (links), *E. coli* J5-LPS (Mitte) und *Chlamydia*-LPS (rechts). In Klammern sind jeweils die absoluten Flächenwerte in Å<sup>2</sup> angegeben. Die Daten beziehen sich auf die Simulationen von vier LPS-Molekülen in Wasser.

Beim Vergleich von *Chlamydia*-LPS mit dem ReLPS von *E. coli*, welche sich nur durch die Anwesenheit eines zusätzlichen Kdo-Zuckers bei *Chlamydia* voneinander unterscheiden, fällt auf, daß dieses zusätzliche Element (Kdo-3) nur eine sehr geringe exponierte Oberfläche hat, obwohl er in der Oligosaccharid-Sequenz die äußerste (letzte) Einheit darstellt. Dieser zunächst paradox erscheinende Befund liegt in der Konformation des Kernzuckerbereiches von *Chlamydia* begründet, die aus der NMR-Studie von Bock et al. (1992) übernommen wurde: Kdo-3 war gegenüber Kdo-2 in Richtung des Lipid A zurückgefaltet und lag damit im Inneren der Kopfgruppe verborgen. Bei *E. coli* ReLPS ragte das terminale Kdo-2 am weitesten aus der Membranebene heraus und wies deshalb eine nahezu doppelt so große exponierte Oberfläche wie Kdo-1 auf. Auch bei *E. coli* J5-LPS gab es eine Beziehung zwischen der Lage bezüglich der Membrannormalen und dem Exponierungsgrad: Die am stärksten exponierten Oligosaccharide (Glc und Hep-1) lagen auch der Monolayer-Oberfläche am nächsten. Alle anderen Elemente des Kernzuckerbereiches wiesen deutlich geringere exponierte Oberflächen auf, da sie von diesen beiden Zuckern abgeschirmt wurden. Allerdings war auch beim *E. coli* J5-LPS kein direkter Zusammenhang zwischen exponierter Fläche eines Zuckers und seiner Position in der Sequenz der Kernzuckerresiduen zu beobachten: Glc und Hep-1, zwei Einheiten des Kernzuckerbereiches, die in der Sequenz der Oligosaccharideinheiten nicht an exponiertester Stelle stehen, wiesen die größte zugängliche Fläche auf. Beim J5-LPS waren einige Zucker (Hep-2, Hep-3 und GlcN) - ähnlich wie beim *Chlamydia*-LPS das Kdo-3 - in Richtung des Lipid A

zurückgefaltet und wurden deshalb von der Membranoberfläche aus kaum erkannt. In Abbildung 5.54 ist dieser Sachverhalt anhand der Verteilung verschiedener Gruppen der Lipopolysaccharide entlang der Membrannormalen illustriert.

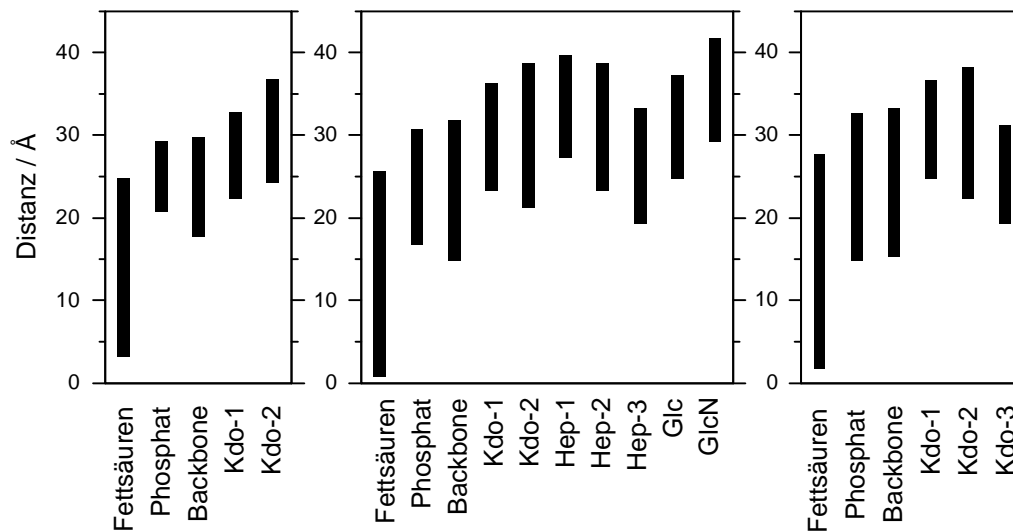


Abbildung 4.54: Aufenthaltsort einzelner Bestandteile des LPS von *E. coli* Re (links), *E. coli* J5 (Mitte) und *Chlamydia* (rechts) bezüglich der Membrannormalen.

Die Modelle zeigen also, daß sowohl bei *Chlamydia*-LPS als auch beim *E. coli* J5-LPS konformationelle und nicht sequentielle Epitope exponiert wurden. Sie bestätigen damit Vermutungen, die für LPS aufgrund von experimentellen Untersuchungen wiederholt geäußert wurden (s. z.B. Brade et al., 1996) und die bei Proteinen als gesichert gelten (Laver et al., 1990).

Die Konsequenzen, die sich aus diesen Beobachtungen für die Erkennung der verschiedenen LPS-Varianten ergeben, werden im folgenden Kapitel diskutiert.

#### **4.4 Konsequenzen für die Erkennung von LPS durch LPS-Bindeproteine und Antikörper**

*In diesem Abschnitt werden die berechneten Oberflächenexponierungen zu den experimentellen Befunden zur spezifischen Erkennung von LPS und anderen Molekülen in Beziehung gesetzt. Zunächst wird die Exponierung von Lipid A-Epitopen diskutiert, anschließend werden experimentelle Erkenntnisse zur Spezifität bzw. Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen *E. coli* J5-LPS bzw. *Chlamydia*-LPS besprochen. Den Abschluß bilden Überlegungen zur Erkennung von LPS durch LPS-bindende Proteine (BPI, LBP, CD14) und Antibiotika wie Polymyxin B.*

##### **4.4.1 Antikörper gegen Lipid A**

Einige Antikörper, z.B. HA-1A (Fujihara et al., 1993a; 1993b; Bogard et al., 1993), erkennen die Lipid A-Region des Lipopolysaccharids und reagieren mit verschiedenen rauhen LPS-Formen (Siegel et al., 1993). Über eine solche Kreuzreaktivität wird seit vielen Jahren immer wieder berichtet (Galanos et al., 1971; Seifert et al., 1996), sie wird aber kontrovers diskutiert (Rietschel et al., 1994). Mit den berechneten Oberflächenexponierungen in Monolayern ist diese Kreuzreaktivität nur schwer vereinbar, da das Lipid A in allen untersuchten LPS-Aggregaten kaum von der Oberfläche her zugänglich ist (Kapitel 4.3.3). Andererseits werden in monomerem LPS auch Lipid A-Epitope exponiert (Kapitel 4.3.2). Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Diskrepanz zwischen den Monolayer-Simulationen und den experimentellen Befunden zu erklären:

- Die bekannte strukturelle Heterogenität (Munford et al., 1980; Evans et al., 1992; Wilkinson, 1996) des LPS hat zur Folge, daß in der Zellmembran *in vivo* verschiedene LPS-Formen vom ReLPS über RcLPS bis hin zu S-LPS vorliegen. Ob auch freies Lipid A in der Membran lebender Bakterien auftritt, ist allerdings noch unklar (Munford et al., 1980; Galanos et al., 1984; Baumgartner et al., 1991). Die Struktur des von einem Bakterienstamm produzierten LPS hängt unter anderem von der Geschwindigkeit des Wachstums, dem Medium und der Expression von Enzymen der LPS-Synthese ab (Ziegler et al., 1982; Evans et al., 1992).
- Lipid A entsteht als Abbauprodukt bei der Verteidigung des Wirtsorganismus aus kompletten LPS-Strukturen und ruft dann eine Lipid A-spezifische Immunantwort hervor

(Chedid et al., 1968; Galanos et al., 1984; Kuhn, 1993; Siegel et al., 1993; Buttenschoen et al., 1996).

- Durch Wechselwirkung mit Antikörpern wird LPS aus der Membran entfernt (Birkelund et al., 1989) und weist dann eine größere zugängliche Oberfläche auf, bei der auch Lipid A-Epitope exponiert werden könnten. Genauso kann die Bindung von LPS an Proteine wie z.B. Hämoglobin zu einer Exposition ansonsten kryptischer (verborgener) LPS-Epitope führen (Roth et al., 1996).
- In der Nachbarschaft von membrangebundenen Proteinen ist die Struktur der Membran verändert (Lugtenberg & van Alphen, 1983), so daß andere Oberflächenstrukturen des LPS als in einem reinen LPS-Monolayer exponiert werden könnten. Bereits im Fluid-Mosaic-Modell der Zellmembran von Singer & Nicolson (1972) wird über eine besondere Interaktion zwischen Membranproteinen und Lipiden spekuliert.
- Großflächige Aggregate des LPS und Membranen können Unebenheiten aufweisen, in deren Folge Lipid A-Epitope auch von R-LPS exponiert werden könnten. Für Phospholipide wird neben der kollektiven Undulation auch ein Herausragen (Protrusion) einzelner Moleküle aus einem Bilayer um wenige Ångstrom diskutiert (Israelachvili & Wennerström, 1990, 1992; König et al., 1995).
- Die Konformation des LPS und damit die exponierte Oberfläche hängt von der Umgebung und dem physikalischen Zustand ab (Brade et al., 1987a; Tesh & Morrison, 1988), d.h. davon, ob das LPS in einer Membran gebunden ist oder sich als Aggregat oder als Monomer in Lösung befindet (Alving & Richardson, 1984). Es muß deshalb stets berücksichtigt werden, welches Assay-System zu den jeweiligen Resultaten führt (Kuhn, 1993; Kuhn et al., 1993, Shnyra et al., 1993; Bailat et al., 1997). Rietschel et al. (1994) berichten, daß sie unter kontrollierten serologischen Bedingungen keine Kreuzreaktivität zwischen Anti-Lipid A-Antikörpern und LPS, welches einen Oligosaccharidanteil enthält, beobachten konnten, d.h. die Lipid A-Epitope im LPS kryptisch bleiben.

Welche dieser Erklärungen für die Diskrepanz zwischen den Simulationsergebnissen und den - in der Literatur kontrovers diskutierten - Bindungseigenschaften von Antikörpern gegen Lipid A-Strukturen zutreffen, müssen weitere Studien klären. Allerdings lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit den Schluß zu, daß vorrangig nur bei LPS-Monomeren Epitope des Lipid A stark exponiert werden. Demzufolge steht ein Modell, welches von der Wechsel-

wirkung zwischen LPS-Monomeren und LPS-bindenden Molekülen ausgeht (Morrison, 1989), in guter Übereinstimmung mit den Simulationsergebnissen.

#### 4.4.2 Antikörper gegen LPS

Aus experimentellen Untersuchungen ist bekannt, daß es eine Kreuzreaktivität zwischen Antikörpern gegen das J5-LPS von *E. coli* und dem Rc-LPS von *S. minnesota* R5 gibt (Schwartz et al., 1989). Vergleicht man den Aufbau der Kernzuckerregionen der LPS dieser beiden Spezies (Tabelle 4-5), so stellt man fest, daß die ersten fünf Zucker des Kernzuckerbereichs identisch sind. Der weitere Aufbau des Cores beider LPS unterscheidet sich aber, so daß auf der Basis eines reinen Sequenzvergleiches die Kreuzreaktivität nicht zu erklären ist.

Tabelle 4-5: Aufbau der Rc-Kernzuckerregionen von *E. coli* J5-LPS und *S. minnesota* R5-LPS. Die chemische Struktur des R5-LPS wurde aus der Arbeit von Brandenburg & Seydel (1984) übernommen.

Spezies	Mutante	Kernzuckersequenz
<i>E. coli</i>	J5	GlcN—Hep <sub>3</sub> —Hep <sub>2</sub> —Hep <sub>1</sub> —Kdo <sub>1</sub> —Lipid A <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> <div style="text-align: center;">  Glc</div> <div style="text-align: center;">  Kdo<sub>2</sub></div> </div>
<i>S. minnesota</i>	R5	Glc—Hep <sub>2</sub> —Hep <sub>1</sub> —Kdo <sub>1</sub> —Lipid A <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> <div></div> <div style="text-align: center;">  Kdo<sub>2</sub></div> </div>

Berücksichtigt man den Exponierungsgrad einzelner Residuen des Kernzuckerbereiches von *E. coli* J5, so kann die experimentell beobachtete Kreuzreaktivität leicht interpretiert werden: Beim J5-LPS sind Glc und Hep-1 die am stärksten exponierten Zucker; diese Zucker sind auch Bestandteil des *S. minnesota*-LPS. Nimmt man an, daß diese beiden Saccharideinheiten das von einem Antikörper erkannte Epitop repräsentieren, dann ist die Kreuzreaktivität der Antikörper gut zu erklären. Das bedeutet, daß in diesem Fall ein konformationelles und nicht ein sequentielles Epitop erkannt wird, wie es auch bei anderen Anti-LPS-Antikörpern vermutet wird (Singh et al., 1996; Brade et al., 1996) oder vermutet werden kann (Lugowski et al., 1996a).

Bei den besser untersuchten Antikörpern gegen Proteine, von denen es auch eine Reihe von Kristallstrukturen mit atomarer Auflösung gibt, sind sowohl sequentielle (z.B. beim Myoglobin; Kuby, 1992) als auch konformationelle oder diskontinuierliche Epitope bekannt (z.B.

Hühnereiweiß-Lysozym, Laver et al., 1990). Bei der Verwendung der Begriffe sequentielles bzw. konformationelles Epitop ist zu beachten, daß alle Epitope nur aufgrund ihrer Konformation von Antikörpern hochaffin gebunden werden (Atassi & Lee, 1978). Bei Proteinen wird im einen Fall diese Konformation aber durch sequentiell aufeinanderfolgende Aminosäuren gebildet, während sie im anderen Fall verschiedene diskrete Aminosäuresequenzen beinhaltet (Laver et al., 1990).

Im Fall des *E. coli* J5-LPS wird die Diskussion der Epitop-Exponierung dadurch kompliziert, daß in experimentellen Studien mindestens vier verschiedene Stämme von *E. coli* J5 eingesetzt werden, die sich in der Expression des Polysaccharidanteils des LPS stark unterscheiden. Die Größe des Saccharids reicht von Rc über R3 (kompletter Core) bis hin zu Strukturen inklusive O-Antigen. Zudem hängt die Expression der Epitope auch von den Wachstumsbedingungen ab (Evans et al., 1992; Appelmelk et al., 1993).

Experimente belegen, daß die immunodominante Komponente von *Chlamydia*-LPS das Kdo-Trisaccharid ist (Holst et al., 1991; Fu et al., 1992; Brade et al., 1994). Für *Chlamydia* ist der terminale Kdo-Rest mit seiner  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 8) Anknüpfung spezifisch, während das  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 4) verknüpfte Kdo-Disaccharid auch in anderen Lipopolysacchariden, z.B. beim *E. coli* ReLPS, auftritt und so zur Kreuzreaktivität einiger Antikörper führt (Caldwell & Hitchcock, 1984; Brade et al., 1985; Fu et al., 1992; Brade et al., 1995). Allerdings wurde experimentell auch eine Kreuzreaktivität zwischen Antikörpern gegen das  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 8)-verknüpfte Kdo-Dimer und dem  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 4)-verknüpften Kdo-Dimer gefunden (Rozalski et al., 1989).

Angesichts der geringen exponierten Oberfläche von Kdo-3 stellt sich die Frage, wie sich das in der Literatur (Caldwell & Hitchcock, 1984; Fu et al., 1992) berichtete Auftreten *Chlamydia*-spezifischer (d.h. Kdo-3-spezifischer) Antikörper mit den Simulationsergebnissen in Einklang bringen läßt.

Man könnte vermuten, daß die Anwesenheit von Kdo-3 eine besondere Konformation des verbleibenden Kdo-Disaccharids zur Folge hat, so daß die Antikörper gar nicht Kdo-3 selbst, sondern Kdo-2 und Kdo-1 in einer spezifischen, durch Kdo-3 erzwungenen Konformation bzw. Exposition erkennen. Allerdings sind mit dieser Hypothese die Spezifitäten eines Antikörpers, der selektiv nur Kdo-3 erkennt (Fu et al., 1992), nicht zu erklären. Zudem zeigen

Konformationsanalysen, daß der konformationelle Spielraum von Kdo-Dimeren stark eingeschränkt ist und nur zwei verschiedene Anordnungen zuläßt (Sabisch, 1988).

Andererseits könnte aber auch die geringe exponierte Fläche von Kdo-3 ausreichen, um an einer spezifischen Erkennung teilzunehmen. Insbesondere, wenn für die Erkennung nicht das gesamte Kdo-3 sondern nur die (2@8)-Verknüpfung zu Kdo-2 essentiell ist, sind die Oberflächenwerte mit den experimentellen Befunden vereinbar, da in diesem Fall der erkannte Bereich aus nur wenigen Atomen besteht. Dies steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß die Größe einer Antigenbindungsstelle in Antikörpern begrenzt ist, so daß gerade bei größeren Kernzuckerregionen nicht alle Zuckerreste an der Erkennung beteiligt sein können (Brade et al., 1996). Allerdings ist bereits seit vielen Jahren bekannt, daß Antikörper ein Epitop von der Größe eines Tetra- bis Hexasaccharids erkennen können (Kabat, 1954), bei Proteinen ist das Epitop häufig noch größer und besteht aus 15 bis 22 Aminosäuren (Laver et al., 1990). In der Kristallstruktur eines *Salmonella*-Oligosaccharidfragmentes im Komplex mit einem Fab-Fragment (Cygler et al., 1991; Bundle et al., 1994a) wird ein Trisaccharid-Epitop in einer 7 Å weiten und 8 Å tiefen Tasche gebunden. Die Kontaktfläche in Antigen-Antikörper-Komplexen liegt je nach Größe des gebundenen Moleküls zwischen 140 Å<sup>2</sup> und 900 Å<sup>2</sup>. Für Phosphocholin ist die Kontaktfläche 137 Å<sup>2</sup> groß, beim Fluorescein sind es 266 Å<sup>2</sup> (Davies et al., 1990). Diese Werte liegen im Bereich der in dieser Arbeit ermittelten SAS-Werte für LPS, so daß die Antikörper vermutlich einzelne LPS-Moleküle erkennen und binden. Die genannten Flächenwerte sprechen allerdings gegen eine ausschließliche Erkennung der Kdo-(2@8)-Verknüpfungsregion, da diese hierfür eine zu geringe Fläche aufweist.

Die Annäherung eines Antikörpers könnte auch eine Konformationsänderung im LPS induzieren, ähnlich wie es von Koshland mit dem Modell des *induced fit* für das Reaktionszentrum von Enzymen postuliert wurde (Levitzki & Koshland, 1972), so daß die Konformation des Antikörper-gebundenen LPS von der des freien LPS abweicht. Die Induktion von konformationellen Änderungen des Liganden im Zuge der Bindung eines Kohlenhydrat-Antigens an den Antikörper ist experimentell nachgewiesen (Glaudemans et al., 1990). Der Vergleich zwischen der NMR-Struktur eines *Salmonella*-Trisaccharids in Lösung und der Kristallstruktur eines Komplexes mit einem Fab-Fragment zeigt, daß das Protein eine Veränderung der Torsionswinkel einer glykosidischen Bindung des Trisaccharids induziert (Bundle et al., 1994b).

Theoretisch könnte das Kdo-Trisaccharid von *Chlamydia* in der Natur auch eine andere Konformation einnehmen als die hier berechnete. Allerdings beruht die Ausgangskonformation des Kdo-Trisaccharids von *Chlamydia* auf einer Lösungsmittel-NMR-Studie (Bock et al., 1992), d.h. einer Strukturbestimmung in einer dem nativen System ähnlichen Umgebung. Zudem wurde die Äquivalenz von LPS-gebundenen Trisacchariden und BSA-gekoppelten synthetischen Trisacchariden in der Antikörper-Bindung experimentell nachgewiesen (Holst et al., 1991; Fu et al., 1992), so daß die Verwendung der Trisaccharid-Struktur mit der Konformation aus dem NMR-Experiment als Ausgangspunkt für den Aufbau des *Chlamydia*-Modells offensichtlich gerechtfertigt ist.

Die Exponierung der Oberflächenantigene von LPS wird außerdem von ihrer physikalisch-chemischen Umgebung stark beeinflusst (Brade et al., 1987a). So wurde z.B. ein deutlicher Einfluß von Magnesium-Ionen auf die Exposition von *Chlamydia*-Oberflächenepitopen von Vretou et al. (1992) festgestellt. In Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  war die Bindung eines IgM-Antikörpers blockiert, während das Fab-Fragment weiter binden konnte. Calcium hatte demgegenüber keinen Effekt. In den Modellsystemen sind derartig deutliche Auswirkungen von Kationen auf die Oberflächenexponierung nicht beobachtet worden.

#### 4.4.3 LPS-bindende Proteine

Die Kristallstruktur des LPS-bindenden Proteins BPI (bactericidal/permeability-increasing protein; Gray et al., 1989; Elsbach & Weiss, 1993) im Komplex mit zwei Phospholipid-Molekülen legt nahe, daß die Bindung von LPS an dieses Lipid-Transportprotein über den hydrophoben Bereich, d.h. die Acylketten des LPS, vermittelt wird und die Kopfgruppen nur eine geringe Rolle spielen (Beamer et al., 1997; PDB-ID: 1BP1). Ungeklärt bleibt dabei noch, wie das LPS aus der Membran herausgelöst und vom BPI gebunden wird, da die modellierten LPS-Aggregate keine Tendenz zeigen, den Fettsäurebereich des LPS zu exponieren. Allerdings gibt es experimentelle Hinweise auf eine Integration von BPI in LPS-Aggregate, die eine Wechselwirkung zwischen BPI und den hydrophoben Regionen des LPS ermöglichen würde (Tobias et al., 1997; Wiese et al., 1997). In experimentellen Untersuchungen zeigte sich, daß S-Form-LPS, welches über einen ausgedehnten Kernzuckerbereich verfügt, deutlich schlechter von BPI gebunden wird als LPS von Rauh-Mutanten (R-LPS), da die Polysaccharidketten den Lipid A-Bereich in bakteriellen Zellmembranen abschirmen (Capodici et al., 1994). Demgegenüber wirkt sich bei isoliertem LPS die Größe des Polysaccharids nicht auf die Bindung durch BPI



aus (Gazzano-Santoro et al., 1992). Damit stellt sich wieder die in der Literatur kontrovers diskutierte Frage (Shnyra et al., 1993; Takayama et al., 1994), welche Form des LPS biologisch aktiv ist: LPS-Aggregate oder LPS-Monomere. Während unbestritten ist, daß LPS aufgrund seiner amphiphilen Struktur eine hohe Tendenz zur Bildung von lamellaren und nicht-lamellaren Aggregaten hat (s. z.B. Seydel et al., 1993; Shnyra et al., 1993), ist unklar, ob nicht die Wechselwirkung zwischen LPS und einem LPS-Rezeptor das Vorliegen von LPS-Monomeren erfordert (Morrison, 1989). Bei experimentellen Untersuchungen wurde festgestellt, daß in LPS-Präparationen ein geringer Anteil ( $< 1\%$ ) in monomerer Form vorliegt (Takayama et al., 1990) und aufgrund von biologischen Wirkungstests wurde postuliert, daß monomeres LPS die biologisch aktive Form darstellt (Takayama et al., 1990, 1994; Din et al., 1993). Die MD-Studien an LPS-Aggregaten legen nahe, daß eine spezifische Wechselwirkung zwischen LPS und einem LPS-bindenden Protein tatsächlich das Vorliegen von LPS-Monomeren voraussetzt, da die Epitop-Exponierung bei den Monomeren sehr viel stärker und umfassender ist als bei den LPS-Aggregaten.

Beim LPS-bindenden Protein CAP18 (Hirata et al., 1994) wird vermutet, daß es sowohl an Monomere als auch an Multimere des Lipid A von *S. minnesota* R595 bindet. Die Sekundärstruktur eines von CAP18 abgeleiteten Peptids (CAP18<sub>106-137</sub>), welches experimentell untersucht wurde, hängt von der Konzentration des Lipid A ab (Chen et al., 1995). Mit steigender Lipid A-Konzentration nimmt der Ordnungsgrad des CAP18<sub>106-137</sub> zu, bis bei hohen Lipid A-Konzentrationen eine helikale Struktur des Peptids auftritt. Die NMR-Struktur des freien CAP18<sub>106-137</sub> (Chen et al., 1995; PDB-ID: 1LYP) in 30% Trifluorethanol (TFE), die der des CAP18<sub>106-137</sub>-Lipid A-Komplexes entsprechen soll, zeigt eine amphipatische Helix. Die positiv geladenen Aminosäuren, die in der Helix einen Bereich von etwa  $260^\circ$  einnehmen, können mit den negativen Ladungen des LPS (Phosphat- und Carboxylatgruppen) wechselwirken, während die hydrophoben Bereiche der Helix an die hydrophoben Teile des LPS, die Fettsäureketten, binden können (Chen et al., 1995). Die Autoren der NMR-Studie vermuten, daß der optimale Abstand zwischen den negativen Ladungen  $10,9 \text{ \AA}$  beträgt. Eine andere, vergleichbare Untersuchung ergab, daß dikationische Moleküle mit höchster Affinität an Lipid A binden, wenn der Abstand zwischen den positiven Ladungen zwischen  $13$  und  $20 \text{ \AA}$  liegt (David et al., 1995). Solche Abstände treten auch in den modellierten LPS-Aggregaten auf, wie anhand der Verteilung der Phosphatgruppen nachgewiesen werden kann (Kapitel 4.1.1). Die beiden experimentellen Studien wurden mit Lipid A und nicht mit LPS durchgeführt, so daß ein direkter

Vergleich mit den hier modellierten LPS-Aggregaten nicht möglich ist. Allerdings wird bereits aus den vorliegenden MD-Simulationen deutlich, daß mit zunehmender Größe des Kernzuckerbereiches Epitope des Lipid A immer stärker verdeckt werden, so daß eine Wechselwirkung zwischen dem hydrophoben Bereich des LPS im Aggregat und den entsprechenden Bereichen der CAP18<sub>106-137</sub>-Helix immer unwahrscheinlicher wird. Eine Wechselwirkung mit Lipid A-Epitopen würde folglich eine Insertion des CAP18<sub>106-137</sub> in die Membran oder das Herauslösen von LPS-Molekülen aus dem Aggregat voraussetzen.

Die Struktur und die biologische Wirkung des LPS-bindenden Proteins LALF (*Limulus* Anti-LPS-Faktor bzw. ENP: Endotoxin-neutralisierendes Protein; Tanaka et al., 1982) wurde in verschiedenen Studien untersucht (Warren et al., 1992; Hoess et al., 1993; Ried et al., 1996). Sowohl die Bindung von glattem LPS (S-LPS) als auch von *E. coli* J5-LPS (Rc-LPS) an LALF wurde experimentell nachgewiesen (Warren et al., 1992), wobei sowohl die Wechselwirkung einzelner LPS-Moleküle mit LALF als auch die Insertion von LALF in LPS-Membranen diskutiert wird (Hoess et al., 1993). Die Kristallstruktur von LALF zeigt eine amphipathische Haarnadel-Schleife, die als LPS-Bindungsregion fungieren soll (Hoess et al., 1993). Die Schleife wird von einer alternierenden Abfolge positiver und hydrophober Aminosäuren gebildet, die aufgrund der beta-Konformation in entgegengesetzte Richtungen zeigen. Gleichzeitig weisen zwei positive Ladungen im Bereich der beta-Kehre in die gleiche Richtung, so daß eine amphipathische Struktur entsteht. Die positiven Ladungen können mit den negativ geladenen Gruppen des LPS wechselwirken. Neben dieser amphipathischen LPS-Bindungsschleife besitzt das Molekül eine negative geladene Region, die durch Protonierung hydrophob werden kann und von der vermutet wird, daß sie an der Insertion des LALF in LPS-Membranen beteiligt ist (Hoess et al., 1993). In weiteren experimentellen Studien konnte die Bindungsregion des LALF von 22 Aminosäuren der amphipathischen Schleife auf ein zyklisches Peptid, bestehend aus 10 Aminosäuren, eingengt werden (Ried et al., 1996). Diese Struktur bindet sowohl an Lipid A als auch an LPS mit ähnlich hoher Affinität wie Polymyxin B. Eine Dockingstudie zwischen LALF-Kristallstruktur und LPS-Aggregaten wird dadurch erschwert, daß sich vermutlich die Konformation im Kristall von der Konformation im LPS-bindenden Zustand unterscheidet (A. Hoess, pers. Mitteilung). Gleichwohl läßt sich anhand der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzeugten LPS-Aggregate vorhersagen, daß die Integration von LALF in die Membran zu einer erheblichen Störung der Integrität dieser Permeations-

barriere führen wird. Dies steht in guter Übereinstimmung mit der experimentell beobachteten antibakteriellen Wirkung von LALF auf Rauh-Mutanten Gram-negativer Bakterien.

Die bakterizide Wirkung des Antibiotikums Polymyxin B (PMB) beruht auf der Störung der Barrierenfunktion der bakteriellen Membranen (Nikaido & Varra, 1985). Die Untersuchung von synthetischen Lipid A-bindenden und vom PMB abgeleiteten Peptiden zeigte, daß die Bindung durch die amphipathische Struktur und die positiven Ladungen der kationischen Aminosäuren des PMB begünstigt wird (Rustici et al., 1993). Später wurde für die Wechselwirkung zwischen dem LPS-bindenden PMB und Lipid A auf der Grundlage von NMR-Studien an Polymyxin B Nonapeptid (PMBN) und MD-Simulationen ein Modell vorgeschlagen (Bhattacharjya et al., 1997), bei dem die negativ geladene Kopfgruppe des Lipid A mit den positiv geladenen Aminosäuren des PMB wechselwirkt, während die Fettsäurekette des PMB in den hydrophoben Bereich der Membran integriert wird. In diesem Modell 'liegt' der Peptidzyklus des PMB über dem Backbone des Lipid A und der lineare, hydrophobe Teil des PMB ist senkrecht dazu und parallel zum Fettsäurebereich des Lipid A ausgerichtet. Nach den vorliegenden MD-Studien an LPS-Aggregaten ist eine solche Wechselwirkung mit Lipid A-Monolayern oder, bestenfalls, mit ReLPS kompatibel, bei LPS mit größeren Kernzuckerbereichen, z.B. dem Rc-LPS von *E. coli*, wird das Lipid A so stark vom Core verdeckt, so daß das PMB eine andere Konformation einnehmen muß. Demgegenüber ist eine dominierende Rolle hydrophober Kräfte bei der Wechselwirkung zwischen PMB und LPS, wie sie durch die kalorimetrischen Untersuchungen von Srimal et al. (1996) belegt wird, mit allen drei untersuchten LPS-Monolayern vereinbar. Detaillierte MD-Studien zur Wechselwirkung zwischen PMB und LPS-Aggregaten werden zur Zeit von Koch (1998) durchgeführt.

Von weiteren bekannten LPS-bindenden Proteinen wie CD14 (Wright et al., 1990, Schütt & Schumann, 1993) und LBP (Tobias et al., 1989; Schumann et al., 1990) liegen zur Zeit noch keine detaillierten Daten über die dreidimensionale Struktur vor, so daß Studien zur Interaktion von molekularen Modellen der Proteine mit den in der vorliegenden Arbeit erzeugten LPS-Aggregaten noch nicht durchgeführt werden können. Gleichwohl sind einige Schlußfolgerungen aus den hier durchgeführten MD-Simulationen von LPS-Aggregaten auf die zur Zeit in der Literatur diskutierten Vorstellungen über die Rolle von CD14 und LBP möglich: Bislang wurde angenommen, daß die Bindung von LPS an CD14 über die Lipid A-Komponente vermittelt wird (Schumann, 1992; Tobias & Ulevitch, 1993). Experimentell wurde aber vor kurzem gezeigt, daß CD14 nicht nur einzelne LPS-Moleküle, sondern auch an intakte *E. coli*-

Bakterien binden kann (Jack et al., 1995). Angesichts der vorliegenden Ergebnisse zur Exposition von LPS-Epitopen in Aggregaten bedeutet dies, daß CD14 Bereiche der LPS-Kernzucker erkennen muß, da die Lipid A-Epitope in den Aggregaten weitgehend maskiert sind.

LBP disaggregiert LPS-Aggregate und transportiert einzelne LPS-Moleküle zu CD14 (Tobias et al., 1995; Yu & Wright, 1996) und in Phospholipid-Membranen (Schromm et al., 1996). Demzufolge muß LBP in der Lage sein, mit LPS-Aggregaten Wechselwirkungen einzugehen (Tobias et al., 1995). Es ist bekannt, daß LBP bevorzugt den Lipid A-Teil des LPS erkennt (Tobias et al., 1989; Taylor et al., 1995). Eine selektive Erkennung der Lipid A-Region von LPS-Aggregaten ist mit den Aggregat-Modellen, die in der vorliegenden Arbeit erzeugt wurden, schwer vereinbar, da die Epitope des Lipid A weitgehend durch den Core verdeckt werden. Andererseits bindet LBP auch LPS mit komplettem Core (Tobias et al., 1989) und andere negativ geladene Amphiphile (Schromm et al., 1996), so daß möglicherweise zunächst eine weniger spezifische Wechselwirkung zwischen LBP und den Kernzuckerbereichen von LPS-Aggregaten stattfindet, die zur Herauslösung einzelner LPS-Moleküle aus der Membran führen könnte. Die Lipid A-Region des LPS-Monomers würde dann anschließend hochspezifisch vom LBP gebunden. Diese Vorstellung steht in guter Übereinstimmung mit der experimentell belegten Funktion des LBP, LPS-Aggregate aufzulösen (Tobias et al., 1997).