

# 1 Einleitung

Seit der Entdeckung der Antibiotika in den 40er Jahren dieses Jahrhunderts galten die bakteriellen Infektionskrankheiten über viele Jahre hinweg als besiegt; 1969 behauptete W. Stewart, der Leiter der amerikanischen Gesundheitsbehörde NIH: "*Das Buch der Infektionskrankheiten kann geschlossen werden.*". Gleichwohl waren auch 1996 noch weltweit 33% aller Todesfälle auf Infektionskrankheiten zurückzuführen, die damit - noch vor Herz-Kreislaufkrankungen - die häufigste Todesursache darstellen (Domann, 1997). Die Entwicklung von Resistenzen und Multiresistenzen gegen herkömmliche Antibiotika führt dazu, daß längst kontrolliert geglaubte Erreger wie *Mycobacterium tuberculosis* oder *Streptococcus pneumoniae* wieder eine erhebliche Gefahr für den Menschen darstellen (Neu, 1992; Cohen, 1994). Damit steht die Wissenschaft vor der Aufgabe, neue Mittel zur Behandlung bakterieller Infektionen zu entwickeln.

Die Zellwand der Bakterien stellt die erste Hürde auf dem Weg eines Antibiotikums zu seinem Angriffspunkt innerhalb des Bakteriums dar (Nikaido & Vaara, 1985; Hancock & Bell, 1988, McManus, 1997), zudem rufen die bakteriellen Oberflächenstrukturen spezifische Immunreaktionen hervor. Ihre Struktur ist daher für das Verständnis der pathogenen Wirkung und für die Bekämpfung von Bakterien von besonderem Interesse. Nach dem Verhalten bei dem von C. Gram entwickelten Färbeverfahren (Gram, 1884) unterscheidet man Gram-positive und Gram-negative Bakterien. Die Cytoplasmamembran der ersteren ist von einer mehrschichtigen Mureinkomponente umgeben, die auch als Peptidoglykannetzwerk bezeichnet wird. Demgegenüber besitzen die Gram-negativen Bakterien, wie in Abbildung 1.1 gezeigt, zwei Zellmembranen, zwischen denen - im Periplasma - eine dünne Peptidoglykanschicht eingebettet ist (Brandis, 1988). Die Zellmembranen bestehen aus Lipiden und Proteinen. Die äußere Membran Gram-negativer Bakterien ist asymmetrisch: das innere Blatt wird von Phospholipiden gebildet, während Lipopolysaccharide (LPS) die Hauptkomponente der äußeren Hälfte der äußeren Membran darstellen (Lugtenberg & van Alphen, 1983). Ein Bakterium enthält insgesamt etwa  $2 \cdot 10^7$  Phospholipid-Moleküle und ca.  $2 \cdot 10^6$  LPS-Moleküle (Raetz et al., 1991). Die LPS-Moleküle nehmen etwa zwei Drittel der Oberfläche von *E. coli* ein, die verbleibende Fläche ist von Proteinen belegt (Lugtenberg & van Alphen, 1983).

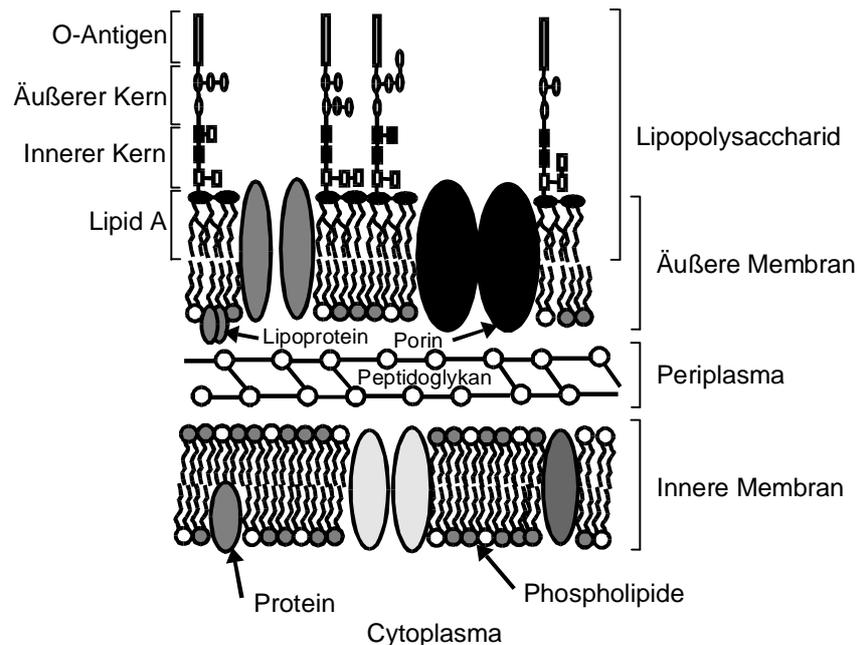


Abbildung 1.1: Schema des Aufbaus der Zellwand Gram-negativer Bakterien. Die Lipopolysaccharide finden sich ausschließlich im äußeren Blatt der Äußeren Membran, alle anderen Membranen werden von Phospholipiden gebildet. In die Membranen sind Proteine integriert bzw. angelagert. Zwischen Innerer und Äußerer Membran befindet sich im Periplasma eine dünne Peptidoglykanschicht (Mureinsacculus). Die Zeichnung ist nicht maßstabsgetreu. (Abbildung modifiziert nach Rietschel & Brade, 1993).

Die Lipopolysaccharide werden aufgrund ihrer pathophysiologischen Wirkung auf den Organismus auch als Endotoxine bezeichnet (Doran, 1992; Rietschel et al., 1994). Dabei übt das LPS seine Wirkung nicht durch direkte Hemmung oder Schädigung von Geweben oder Organen aus, sondern aktiviert das Immunsystem. In der Folge kommt es zur Steigerung der Produktion von entzündungsfördernden Botenstoffen und zur Stimulation von Abwehrmechanismen. Die überschießende Immunreaktion führt zu einer Reihe von pathophysiologischen Akutreaktionen von Fieber über Blutdruckabfall bis hin zum septischen Schock (Rietschel et al., 1993). Die Wirkung des LPS auf den menschlichen Körper ist häufig verheerend: In den USA kommt es jedes Jahr zu ca. 400.000 Fällen von Sepsis, die etwa zur Hälfte von Gram-negativen Bakterien verursacht wird. Dabei liegt die Mortalität je nach Patientengruppe zwischen 20 und 60% (CDC, 1990; Ziegler et al., 1991). Die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze ist daher von herausragender Bedeutung (Stone, 1994).

Lipopolysaccharide bestehen aus zwei kovalent miteinander verknüpften Komponenten: Das Lipid A bildet den Lipid-Anker, der in die äußere Membran eingebettet ist. Daran schließt sich ein Polysaccharid an, welches wiederum in die drei Regionen Innerer Kern, Äußerer Kern und

O-spezifische Seitenkette unterteilt werden kann (Abbildung 1.1). Struktur und Größe des Polysaccharids variieren stark mit der Bakterienspezies, während das Lipid A hoch konserviert ist (Wilkinson, 1996).

Eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis biochemischer Prozesse und für die Entwicklung neuer Wirkstoffe ist die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur der beteiligten Substanzen (Kuntz, 1992; Böhm & Klebe, 1996). Da es bisher nicht gelungen ist, die räumliche Struktur eines kompletten Lipopolysaccharid-Moleküls durch eine Einkristall-Röntgenstrukturanalyse zu bestimmen, besteht ein Bedarf nach theoretischen Modellen zur Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen bei der Pathogenese der Gram-negativen Sepsis.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Generierung eines Modells der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, welches Aussagen über die Zugänglichkeit einzelner Teilstrukturen des bakteriellen Lipopolysaccharids für die Bindung und Erkennung durch LPS-bindende Proteine ermöglicht. Gleichzeitig sollte - im Hinblick auf experimentell beobachtete Kreuzreaktivitäten - durch die Verwendung unterschiedlicher LPS-Strukturen ein Vergleich der Exposition von LPS-Epitopen bei verschiedenen Bakterienstämmen ermöglicht werden. Das Fernziel liegt in der Entwicklung neuer Wirkstoffe zur Eindämmung der negativen Effekte des LPS auf den menschlichen Körper.

Zu diesem Zweck wurden Modelle von drei LPS-Varianten erzeugt und zu Monoschicht-Aggregaten zusammengefügt. Zunächst wurden durch Molekulardynamik-Simulationen im Vakuum die erzeugten Modelle und die gewählten Simulationsbedingungen überprüft. Anschließend wurden die Modelle um Wasser und Kationen erweitert, um den Bezug der Modellsysteme zur Realität zu verbessern. Mit diesen erweiterten Modellsystemen wurden erneut MD-Simulationen durchgeführt. Durch den Vergleich von Parametern, die sowohl experimentell als auch in Simulationen ermittelt werden können, wurden die Modelle validiert. Schließlich wurde die Zugänglichkeit einzelner Bereiche (Epitope) der LPS-Moleküle anhand der exponierten Oberfläche bestimmt.

Die Arbeit gliedert sich in folgende Abschnitte:

In Kapitel 2 wird der medizinisch-biochemische Hintergrund der Lipopolysaccharide erläutert sowie ein Überblick über die Technik der Molekulardynamik-Simulation gegeben.

Kapitel 3 enthält Informationen über die untersuchten Strukturen und die Simulations- und Auswertungsverfahren.

Den Schwerpunkt der Arbeit bildet Kapitel 4 - Ergebnisse und Diskussion -, welches in vier Abschnitte untergliedert ist: Zunächst wird die Erzeugung und Überprüfung der LPS-Aggregate im Vakuum beschrieben. Dann folgen die Ergebnisse der MD-Simulationen hydratisierter LPS-Aggregate. Im dritten Abschnitt werden die exponierten Oberflächen der drei untersuchten LPS-Varianten besprochen. Den Abschluß bildet die Diskussion der Konsequenzen, die sich aus der vorliegenden Arbeit für molekulare Modelle der Wechselwirkung zwischen LPS und LPS-Bindeproteinen ergeben.

In Kapitel 5 sind die wichtigsten Ergebnisse der Untersuchung zusammengefaßt.

Der Anhang bildet das letzte Kapitel der Arbeit.

In der vorliegenden Arbeit wurde, in Übereinstimmung mit kristallographischen Konventionen, die Längeneinheit Ångstrom (Å) an Stelle der SI-Basiseinheit Meter (m) verwendet, 1 Å entspricht  $10^{-10}$  m bzw. 0,1 nm.