

Received: 28.03.2018
Accepted: 25.05.2018
Published: 06.07.2018

Biosynteza lipopolisacharydów o zmiennej długości części O-swoistej jako czynnik wirulencji bakterii Gram-ujemnych*

Biosynthesis of lipopolysaccharides with different length of the O-specific region as a virulence factor of Gram-negative bacteria

Eva Krzyżewska, Jacek Rybka

Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych, Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu

Streszczenie

Błona zewnętrzna bakterii Gram-ujemnych jest strukturą biologiczną o unikalnej budowie, która w znacznym stopniu przyczynia się do przeżycia bakterii w niesprzyjających warunkach organizmu gospodarza. Lipopolisacharyd buduje około 70% ekspozowanej do środowiska powierzchni błony zewnętrznej i jest zbudowany z trzech, różniących się pod względem strukturalnym części: lipidu A, oligocukru rdzenia oraz antygeny O. Część O-swoista lipopolisacharydu tworzy jedną z najintensywniej badanych struktur powierzchniowych polisacharydów bakteryjnych. Jednak wiele pytań dotyczących mechanizmu biosyntezy antygeny O i jego transportu na powierzchnię komórki wciąż pozostaje bez odpowiedzi. W pracy opisano biosyntezę cząsteczki LPS, ze szczególnym uwzględnieniem biosyntezy łańcucha O-swoistego, sposobu regulacji długości cząsteczek LPS oraz wpływu typu syntetyzowanego łańcucha O-swoistego na przeżywalność bakterii w niesprzyjającym środowisku organizmu gospodarza.

Słowa kluczowe:

lipopolisacharyd • antygen O • regulacja długości

Summary

The outer membrane of Gram-negative bacteria is a biological structure with a unique composition that significantly contributes to the survival of bacteria in the unfavorable conditions of the host organism. The lipopolysaccharide constitutes about 70% of the external part of the outer membrane. The LPS molecule is composed of three different parts: lipid A, core oligosaccharide and O antigen. Despite the O-specific antigen being one of the most intensely studied surface structures of bacterial polysaccharides, a number of questions regarding the mechanism of the O antigen biosynthesis and its transport to the cell surface are still unanswered. The paper describes the biosynthesis of the lipopolysaccharide molecule, with particular emphasis on the O-specific chain biosynthesis, the mechanism of lipopolysaccharide length regulation and the influence of the type of synthesized O-specific chains on bacterial survival in adverse host organisms.

Keywords:

lipopolysaccharide • O antigen • chain regulation

*Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego nr 2017/25/N/NZ6/o2295, finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

GICID	01.3001.0012.1735
DOI:	10.5604/01.3001.0012.1735
Word count:	9519
Tables:	–
Figures:	2
References:	138

Adres autorki: mgr Eva Krzyżewska, Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych, Laboratorium Mikrobiologii Le-karskiej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: eva.krzyzewska@iitd.pan.wroc.pl

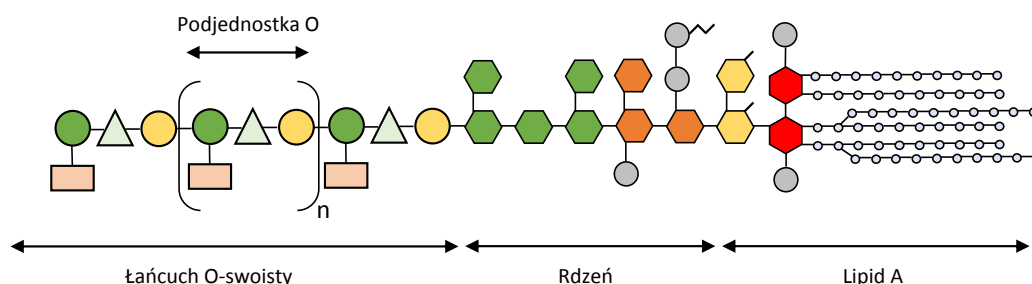
Wykaz skrótów: **AFM** – mikroskopia sił atomowych (atomic force microscopy), **ATR-IR** – spektroskopia osłabio-nego całkowitego odbicia w podczerwieni (attenuated total reflectance infrared spectroscopy), **ECA** – wspólny enterobakteryjny antygen, antygen Kunina (enterobacterial common antigen), **ESI** – elektrorozpylanie (electrospray ionization), **ESR** – elektronowy rezonans spinowy (electron spin resonance), **FAB** – bombardowanie szybkimi atomami (fast atom bombardment), **Kdo** – kwas 3-deoksy-D-manno-oktulozonowy (3-deoxy-D-manno-octulosonic acid), **LMW-OAg LPS** – lipopolisacharyd zawierający antygen O o niskiej masie cząsteczkowej (low molecular weight O antigen LPS), **L-OAg LPS** – lipopolisacharyd zawierający długi łańcuch O-swoisty (long O antigen LPS), **LOS** – lipooligosacharyd (lipooligosaccharide), **LPS** – lipopolisacharyd (lipopolysaccharide), **MAC** – kompleks atakujący błonę (membrane attack complex), **MALDI** – desorpcja laserowa z udziałem matrycy (matrix assisted laser desorption/ionization), **PCP** – kopolimery wielocukrów (polysaccharide co-polimers), **PD** – desorpcja za pomocą plazmy (plasma desorption), **PHPT** – heksozo-1-fosforanowa transferaza poliizoprenylofosforanu (polyisoprenyl-phosphate hexose-1-phosphate transferases), **PNPT** – N-acetyloheksosamino-1-fosforanowa transferaza poliizoprenylofosforanu, (polyisoprenyl-phosphate N-acetylhexosamine-1-phosphate transferase), **SDS-PAGE** – elektrofo-reza w warunkach denaturujących w środowisku SDS (sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis), **VL-OAg LPS** – lipopolisacharyd zawierający bardzo długi łańcuch O-swoisty (very long O antigen LPS).

WPROWADZENIE

Lipopolisacharyd (lipopolysaccharide, LPS) tworzy około 70% powierzchni błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych i jest niezbędny do funkcjonowania drobnoustroju. Cząsteczka LPS chroni bakterię przed mechanizmami obronnymi gospodarza i działaniem antybiotyków [50, 72] oraz jest jednym z najważniejszych czynników wirulencji u bakterii Gram-ujemnych. W budowie lipopolisacharydu można wyróżnić trzy domeny strukturalne: lipid A, rdzeń oraz łańcuch O-swoisty (antygen O) zbudowany z powtarzających się jednostek polisacharydowych, tzw. podjednostek O-swoistych (ryc. 1). Lipid A jest kowalencyjnie związany z rdzeniem i odpowiada za kotwiczenie LPS w błonie zewnętrznej. Ta część LPS była powszechnie uważana za najbardziej konserwatywną, jednak w latach 90 ub.w. wykazano, że lipid A po syntezie może ulegać znacznym modyfikacjom [41, 42, 43], co wpływa na heterogenność jego struktury u różnych gatunków bakterii [84]. W lipidzie A można wyróżnić składnik sacharydowy, kwasy tłuszczowe oraz hydrofilowe podstawniki (m.in. grupy fosforanowe, etanolamina). Najbardziej konserwatywną częścią lipidu A jest część cukrowa, najczęściej zbudowana z dwóch cząsteczek glukozaminy połączonych wiązaniem $\beta(1\rightarrow6)$ glikozydowym, podstawionych nierozgałęzionymi, nasyconymi kwasami tłuszczowymi (2-hydrokwykwasy, 3-hydroksykwykwasy), które nadają cząsteczce

charakter amfifilowy [72]. Ze względu na unikatową budowę lipid A determinuje aktywność biologiczną LPS i stanowi centrum toksyczności cząsteczki.

Rdzeń oligosacharydowy jest połączony z lipidem A wiązaniem ketozydowym. W obrębie rdzenia można wyróżnić dwa umowne regiony: zewnętrzny - w skład którego wchodzi głównie heksozy oraz region wewnętrzny - zbudowany z heptoz oraz kwasu 3-deoksy-D-manno-oktulozonowego (Kdo). Najbardziej eksponowaną do środowiska zewnętrznego częścią LPS jest łańcuch O-swoisty zbudowany z kilkunastu do kilkudziesięciu powtarzających się podjednostek polisacharydowych, zawierających 1-8 reszt cukrowych. Polimery te wykazują się dużą zmiennością ze względu na charakter chemiczny poszczególnych podjednostek węglowodanowych. Antygeny O różnią się od siebie składem chemicznym, sekwencją ułożenia cukrów, typem wiązań, odgałęzieniami bocznymi lub zawartością niecukrowych podstawników [60, 72, 105]. Powyższe modyfikacje wpływają na ogromną różnorodność łańcuchów O-swoistych, dotychczas opisano 186 różnych antygenów O dla *Escherichia coli* (w tym *Shigella* sp.), 54 dla *Salmonella enterica*, 193 dla *Vibrio cholerae* i około 20 dla *Pseudomonas aeruginosa* [99, 105, 108]. Łańcuch O-swoisty, jako najbardziej eksponowana na powierzchni błony zewnętrznej struktura, jest jednym z podstawowych składników, niezbędnym do przetrwania bakterii w tkankach gospodarza



Ryc. 1. Schemat budowy cząsteczki lipopolisacharydu

rza. Bakterie wykorzystują antygen O m.in. do unikania fagocytozy oraz litycznego działania układu dopełniacza [38, 40, 81, 82]. Natomiast z klinicznego punktu widzenia antygeny O są niezwykle ważnym czynnikiem różnicującym bakterie w obrębie gatunku, pozwalającym na określenie przynależności do konkretnego serowaru.

Precyzyjne poznanie szlaków zaangażowanych w syntezę antygenów O ma zasadnicze znaczenie dla rozwoju następnej generacji środków leczniczych. Odkrycie molekularnych mechanizmów leżących u podstaw syntezy łańcucha O-swoistego i kontrolowania jego długości przez bakterie ma podstawowe znaczenie biomedyczne. Antygen O jest jedną z najintensywniej badanych struktur powierzchniowych polisacharydów bakteryjnych. Jednak wiele pytań dotyczących mechanizmu biosyntezy antygeny O i jego transportu na powierzchnię komórki bakteryjnej pozostaje jeszcze bez odpowiedzi.

BIOSYNTeza LIPOPOLISACHARYDU – ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM BIOSYNTETY ŁAŃCUCHA O-SWOISTEGO

Biosynteza LPS jest złożonym procesem, który wymaga przestrzennej i czasowej koordynacji kilku niezależnych od siebie szlaków. Synteza poszczególnych składników LPS odbywa się w trzech różnych przedziałach komórkowych: cytoplazmie, błonie cytoplazmatycznej oraz peryplazmie. Większość enzymów i genów kodujących białka odpowiedzialne za biosyntezę i eksport LPS zidentyfikowano u *E. coli* [94, 95, 134], jednak na podstawie analizy sekwencji genetycznych wykazano, że geny zaangażowane w biosyntezę LPS są podobne u większości bakterii Gram-ujemnych [96, 127]. Biosyntezę cząsteczki LPS można podzielić na 2 podstawowe etapy: biosyntezę części lipidowo-rdzeniowej oraz biosyntezę antygeny O.

Biosynteza części lipidowo-rdzeniowej LPS

Pierwszym etapem biosyntezy pełnej cząsteczki LPS jest synteza lipidu A, która zachodzi po cytoplazmatycznej stronie błony wewnętrznej. Do syntezy cząsteczki Kdo₂-lipid A, będącej akceptorem części oligosacharydowego rdzenia, potrzebne jest zaangażowanie dziewięciu enzymów [30, 96]. Biosynteza LPS u *E. coli* rozpoczyna się od

małej cząsteczki, UDP-N-acetyloglukozaminy (UDP-GlcNAc), w której grupa OH przy atomie węgla 3C w pierwszym etapie biosyntezy podstawiona zostaje resztą 3-hydroksylowego kwasu tłuszczowego przez acylotransferazę LpxA. Enzym LpxA do tego procesu wykorzystuje białkowy przenośnik grup acylowych – białko acyl-ACP, które jest donorem reszt kwasów tłuszczowych. Acylotransferazy LpxA są bardzo selektywne dla przyłączanych reszt hydroksykwasów o różnej długości np. u *Helicobacter pylori* są podstawiane 16-węglowe łańcuchy hydroksyacylowe, podczas gdy u *P. aeruginosa* są podstawiane reszty 10-węglowe [130, 134]. U *E. coli* są przyłączane reszty kwasu mirystynowego [31]. Następnym etapem syntezy cząsteczki Kdo₂-lipid A jest przekształcenie powstałego produktu UDP-3-O-(β-hydroksymirystol)-GlcNAc przez metaloamidazę LpxC w UDP-3-O-(β-hydroksymirystol)-D-glukozaminę [107, 131]. Przyłączenie drugiego łańcucha acylowego przez acylotransferazę LpxD prowadzi do powstania UDP-2,3-bis(β-hydroksymirystol)-D-glukozaminy [65]. Ze względu na brak odpowiedników enzymów Lpx u ssaków, enzymy te stanowią obiecujące cele działania dla nowych środków przeciwbakteryjnych [9, 56, 132]. W kolejnym etapie biosyntezy pirofosfataza LpxH hydrolyzuje UDP-2,3-bis(β-hydroksymirystol)-D-glukozaminę do monofosforanu urydyny (UMP) oraz lipidu X [5].

W przypadku lipidu A u większości gatunków bakterii następnym etapem biosyntezy jest połączenie powstałego lipidu X z cząsteczką UDP-2,3-diacyl-GlcNAc i wytworzenie charakterystycznego wiązania β(1→6) glikozydowego. Reakcja ta jest katalizowana przez syntazę disacharydową lipidu A LpxB, która kondensuje jedną cząsteczkę UDP-2,3-diacyl-GlcNAc z jedną cząsteczką lipidu X, uwalniając UDP [26]. Następne etapy biosyntezy lipidu A są katalizowane przez integralne białka błony wewnętrznej, które do aktywacji wymagają obecności czynników cytozolowych (LpxK, KdtA, LpxM, LpxL). Białko LpxK katalizuje ATP-zależną fosforylację powstałego wcześniej disacharydu, powodując powstanie lipidu IV_A [37]. Do powstałej cząsteczki lipidu IV_A transferaza KdtA (WaaA) dołącza dwie cząsteczki Kdo wykorzystując cząsteczkę CMP-Kdo jako donor. Prekursorem dojrzałej cząsteczki Kdo jest rybulozo-5-fosforan, który ulega przekształceniu przez

izomerazę yrbH do arabinozo-5-fosforanu, a następnie przez syntazę KdsCA do kwasu 3-deoksy-D-manno-oktulozonowego-8-fosforanu. Fosfataza 8-fosforanu kwasu 3-deoksy-D-manno-oktulozonowego – KdsC – przez usunięcie grupy fosforanowej doprowadza do powstania cząsteczki Kdo, do której syntaza CMP-Kdo KdsB przyłącza CMP. Dojrzała cząsteczka Kdo może zostać przyłączona do cząsteczki lipidu IV_A [13, 69, 98]. Powstała cząsteczka Kdo₂-lipid IV_A ulega dalszym modyfikacjom, które prowadzą do powstania cząsteczki Kdo₂-lipid A. Reakcje są katalizowane przez ACP-zależne acylotransferazy LpxL oraz LpxM, odpowiedzialne za przyłączenie kolejnych łańcuchów kwasów tłuszczowych [14, 22].

W skład części wewnętrznej rdzenia oprócz Kdo wchodzi również heptozy (zazwyczaj L-glicero-D-manno-heptopiranozy), natomiast część zewnętrzna rdzenia wykazuje znacznie większą różnorodność strukturalną w porównaniu do części wewnętrznej i można w niej wyróżnić przeważnie sześciowęglowe reszty cukrowe np. galaktozy, glukozy, kwasy uronowe czy glukozaminy [75]. Biosynteza regionu rdzeniowego obejmuje podstawienie cząsteczki Kdo₂-lipid A kolejnymi resztami cukrowymi w reakcjach katalizowanych przez glikozylotransferazy.

Geny odpowiedzialne za biosyntezę części rdzeniowej LPS *E. coli* są zgromadzone w trzech operonach: *gmhD* (geny odpowiedzialne za biosyntezę oligosacharydów rdzenia wewnętrznego), *waaQ* (geny odpowiedzialne za biosyntezę oligosacharydów rdzenia zewnętrznego) oraz *kdtA*, w którym są zgromadzone geny odpowiedzialne za biosyntezę i przyłączanie cząsteczek Kdo [13, 101].

Transport części lipidowo-rdzeniowej LPS do błony wewnętrznej

Prekursory LPS (cząsteczki lipid A-rzeń, podjednostki O) są składane w cytoplazmie, natomiast ligacja poszczególnych fragmentów LPS w kompletną cząsteczkę zachodzi w peryplazmie, w związku z tym niezbędny jest mechanizm umożliwiający przetransportowanie poszczególnych składowych LPS do przestrzeni peryplazmatycznej. Mechanizm, dzięki któremu odbywa się transport powstałego kompleksu lipidowo-rdzeniowego przez błonę cytoplazmatyczną, wymaga obecności transportera ABC, białka MsbA. Białko MsbA *E. coli* jest zbudowane z sześciu transbłonowych helis i cytoplazmatycznej domeny wiążącej ATP [20]. Mechanizm transportu wykorzystujący białko MsbA nazwano mechanizmem typu „chwycić i przerzucić” (trap and flip). W tym procesie po związaniu cząsteczki ADP, białko MsbA otwiera się od strony cytoplazmy, dzięki czemu część lipidowo-rdzeniowa LPS może wejść do utworzonego kanału. Następnie białko MsbA zamyka się wokół części lipidowo-rdzeniowej LPS, następuje hydroliza ATP i zmiana konformacji białka, dzięki czemu transportowana cząsteczka jest uwalniana po stronie peryplazmatycznej. Po opuszczeniu białka MsbA przez część lipidowo-rdzeniową LPS, układ ponownie zmienia konformację i kolejna cząsteczka może zostać przetransportowana przez błonę cytoplazmatyczną [78, 126].

Organizacja genów odpowiedzialnych za biosyntezę łańcucha O-swoistego

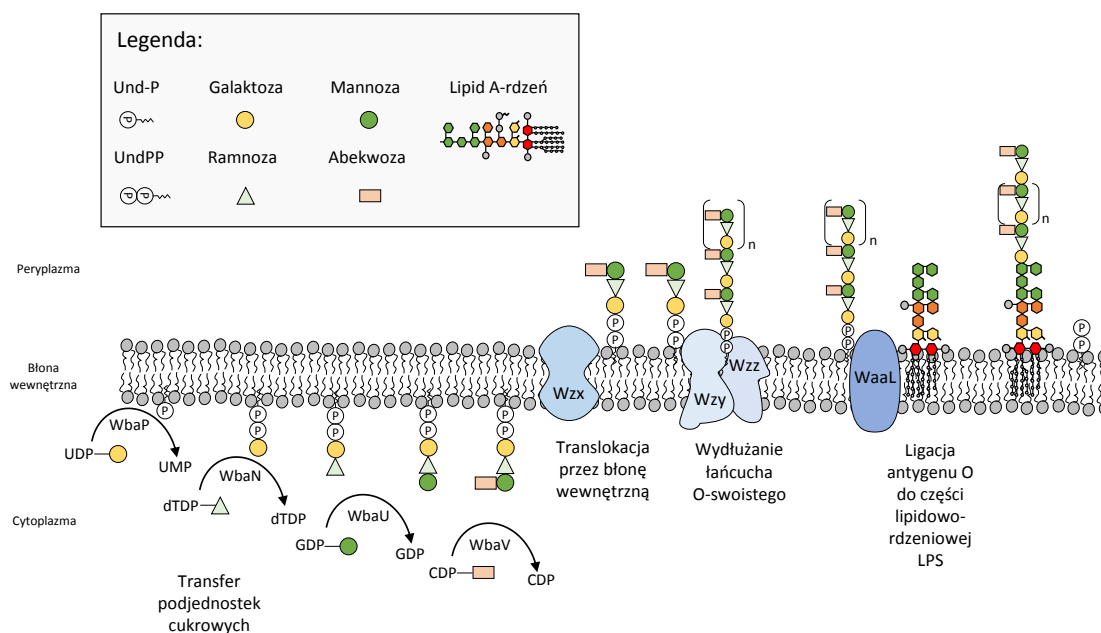
W zależności od gatunku bakterii, powtarzająca się podjednostka łańcucha O-swoistego składa się z 1-8 reszt cukrowych, ułożonych w sposób liniowy lub rozgałęziony [127]. Pojedyncza podjednostka O powstaje na lipidowym nośniku, osadzonym po cytoplazmatycznej stronie błony wewnętrznej, natomiast montaż kompletnej antygeny O odbywa się w peryplazmie.

Geny odpowiedzialne za syntezę antygeny O można podzielić na trzy główne grupy. W pierwszej wyróżnia się geny odpowiedzialne za syntezę białek uczestniczących w biosyntezie prekursorów cukrowych, wchodzących w skład podjednostki O-swoistej. W drugiej grupie znajdują się geny kodujące białkowe transferazy glikozylowe, odpowiedzialne za przeniesienie prekursorów cukrowych na błonowy nośnik lipidowy, w celu wytworzenia oligosacharydu. Ostatnia grupa genów koduje białka odpowiedzialne za translokację powstałego antygeny O przez błonę wewnętrzną i polimeryzację z wcześniej powstałą cząsteczką lipidowo-rdzeniową [105, 127]. Geny zaangażowane w biosyntezę antygeny O są umiejscowione na chromosomie i tworzą tzw. klaster genów antygeny O. Do najdokładniej zbadanych należą klaster *E. coli* oraz *S. enterica*, gdzie geny odpowiedzialne za syntezę łańcucha O-swoistego leżą między genem *galF* oraz *gnd* [100]. U niektórych bakterii klaster genów odpowiedzialnych za biosyntezę antygeny O są umiejscowione między genami *himD* a *tyrB* (*P. aeruginosa*) [99], *gmhD* a *rjg* (*V. cholerae*) [108] czy *hemH* oraz *gsk* (*Yersinia* sp.) [138]. Uważa się, że geny odpowiedzialne za syntezę antygeny O leżą blisko siebie, są transkrybowane jako jedna jednostka i zawierają mniej GC w stosunku do pozostałej części genomu. Niewielka zawartość GC może wskazywać na międzygatunkowy transfer genów odpowiedzialnych za biosyntezę części O-swoistej z różnych gatunków bakterii [105]. Przenoszeniem genów między różnymi gatunkami bakterii można przynajmniej częściowo wyjaśnić tak dużą różnorodność struktur antygenów O wśród bakterii Gram-ujemnych.

Biosynteza części O-swoistej cząsteczki LPS

Podczas procesu biosyntezy antygeny O można wyróżnić następujące etapy: reakcję inicjacji, wydłużanie i translokację powtarzających się podjednostek O lub kompletnej antygeny O, ligację powstałego antygeny O do części lipidowo-rdzeniowej oraz recykling nośnika Und-P.

Inicjacja reakcji biosyntezy antygeny O rozpoczyna się w cytoplazmie, gdzie są zgromadzone reszty cukrowe (w postaci: UDP-cukier), które wejdą w skład podjednostki O-swoistej. Przyjmuje się, że każdy klaster genów odpowiedzialny za syntezę antygeny O zawiera geny odpowiedzialne za biosyntezę prekursora nukleotydowego poszczególnych cukrów, wchodzących w skład kompletnej powtarzającej się podjednostki antygeny O. Należy jednak zaznaczyć, że geny odpo-



Ryc. 2. Schemat biosyntezy antygeny O na przykładzie *S. enterica* grupy B1

wiedzialne za syntezę cukrów, zaangażowanych w inne, niezbędne komórce do życia szlaki (UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-GlcNAc) nie są duplikowane w klastrze genów antygeny O [105]. Niezależnie od rodzaju wykorzystywanej reszty cukrowej reakcja inicjacji biosyntezy antygeny O rozpoczyna się od utworzenia wiązania pomiędzy fosforanem undekaprenyłu (Und-P) a wybraną resztą cukrową z uwolnieniem cząsteczki UMP (powstaje Und-PP-związany cukier). Fosforan undekaprenyłu jest wbudowanym w błonę wewnętrzną lipidowym nośnikiem z „główką” fosforanową wyeksponowaną do przestrzeni cytoplazmatycznej. W zależności od rodzaju mikroorganizmu reakcja inicjacji jest katalizowana przez enzym należący do jednej z dwóch grup transferaz poliizoprenylofosforanu: N-acetyloheksosamino-1-fosforanowych (polyisoprenyl-phosphate N-acetylhexosamine-1-phosphate transferase, PNPT) lub heksozo-1-fosforanowych (polyisoprenyl-phosphate hexose-1-phosphate transferases, PHPT) [105]. Białka z rodziny PNPT występują zarówno u organizmów eukariotycznych jak i prokariotycznych, natomiast białka z rodziny PHPT nie mają swoich homologów w komórkach eukariotycznych.

Bakteryjne PNPT (np. WecA, MraY, WbpL) są odpowiedzialne za przenoszenie na błonowy nośnik Und-P różnych substratów N-acetyloheksosaminy. Białkiem reprezentującym grupę PNPT jest białko WecA inicjujące biosyntezę antygeny O u szczepów charakteryzujących się łańcuchem O-swoistym, w którego skład wchodzi GalNAc czy GlcNAc [1, 3]. U *Enterobacteriaceae* gen *wecA* jest umiejscowiony poza klastrzem genów odpowiedzialnym za syntezę antygeny O i tworzy część klastra odpowiedzialnego za syntezę wspólnego antygeny

powierzchniowego pałeczek rodziny *Enterobacteriaceae* (enterobacterial common antigen, ECA).

Przedstawicielem rodziny PHPT jest białko WbaP, po raz pierwszy zidentyfikowane u *S. enterica*, pełniące funkcję pierwotnej transferazy galaktozy [57]. Innymi transferazami inicjującymi reakcję biosyntezy antygeny O grupy PHPT są np. WbgY i WbIG, odpowiedzialne za przyłączanie odpowiednio 4-n-D-Fuc2NAc-P u *Shigella sonnei* i *Bordetella pertussis* [2, 135].

Po zakończeniu reakcji inicjacji konieczne jest przyłączenie dodatkowych reszt cukrowych do stworzenia kompletnej podjednostki O-swoistej. Reakcje elongacji są katalizowane przez swoiste glikozylotransferazy, stanowiące grupę enzymów rozpuszczalnych lub bezpośrednio związanych z błoną plazmatyczną przez oddziaływania jonowe [17]. W przypadku *S. enterica* grupy B1 wyróżnia się 3 białka odpowiedzialne za przyłączanie kolejnych cukrów i wytworzenie pełnej podjednostki O: białko WbaN odpowiedzialne za przyłączanie cząsteczki ramnozy, WbaU za przyłączanie cząsteczki mannozy oraz WbaV odpowiedzialne za przyłączanie cząsteczki abekwozy [51]. Powstaje gotowa podjednostka O, która na etapie biosyntezy może zostać przetransportowana przez błonę w celu połączenia jej z częścią lipidowo-rdzeniową cząsteczki LPS (ryc.2).

TRANSPORT POWTARZAJĄCEJ SIĘ PODJEDNOSTKI O PRZEZ BŁONĘ WEWNĘTRZNĄ

Dotychczas opisano co najmniej trzy różne mechanizmy składania i translokacji podjednostek O: drogę Wzx/

Wzy-zależną, drogę zależną od transportera ABC oraz drogę syntazozależną.

Droga Wzx/Wzy-zależna

Droga Wzx/Wzy-zależna występuje podczas syntezy większości antygenów O, szczególnie w czasie syntezy heteropolisacharydów. Co najmniej trzy białka (Wzx, Wzy i Wzz) są zaangażowane w tę ścieżkę eksportu, jednak brak jest szczegółowych informacji dotyczących sposobu ich wzajemnego oddziaływania.

Po syntezie poszczególnych podjednostek O związanych z lipidowym przenośnikiem Und-P w cytoplazmie, muszą one zostać przetransportowane do przestrzeni peryplazmatycznej. Wszystkie dotychczas przebadane klastry genów odpowiedzialnych za Wzx/Wzy-zależny transport podjednostek O zawierają geny kodujące flipazę Wzx odpowiedzialną za translokację podjednostek cukrowych przez błonę wewnętrzną do przestrzeni peryplazmatycznej [71]. Białka Wzx charakteryzują się bardzo małym podobieństwem w sekwencji aminokwasów, dlatego też obecność genów *wzx* jest często uważana za cechę swoistą serotypu, a geny *wzx* mogą być wykorzystywane jako markery genetyczne do rozróżniania między poszczególnymi serotypami [33, 34, 52]. Zmienność sekwencji genów *wzx* łączono z różnorodnością struktur antygeny O, w licznych badaniach wykazano jednak, że u *E. coli* flipaza Wzx jest swoista tylko dla pierwszego cukru wchodzącego w skład powtarzającej się podjednostki O-swoistej [32, 76]. Przeczą temu jednak wyniki badań Honga i wsp. [51], którzy wykazali, że u *S. enterica* z grup B, D2 i E, flipaza Wzx wykazuje znaczną swoistość do całej powtarzającej się podjednostki O. Badacze wykazali, że warianty podjednostek O różniące się pojedynczymi resztami cukrowymi są transportowane z mniejszą wydajnością i wytwarzany jest krótszy antygen O [51]. Drugim składnikiem ścieżki Wzx/Wzy-zależnej jest białko Wzy, które bierze udział w polimeryzacji kolejnych podjednostek O do końca wcześniej przetransportowanej cząsteczki Und-PP-podjednostka O-swoista. Po przyłączeniu powtarzającej się podjednostki uwolniony Und-PP jest przekształcany do aktywnej postaci monofosforylowanej poprzez reakcję defosforylacji. Wykazano, że mutanty z defektem genu *wzy* wytwarzają LPS zbudowany z jednej podjednostki O-swoistej [23]. Dotychczas przeprowadzono niewiele badań *in vitro* w związku z czym białko Wzy nie zostało dobrze scharakteryzowane. Trzecim białkiem wchodzącym w skład drogi Wzx/Wzy-zależnej jest białko Wzz, które ze względu na pełnioną funkcję regulacyjną długości O-swoistych polisacharydów zostało scharakteryzowane w osobnym rozdziale.

Droga zależna od transportera ABC

Droga zależna od transportera ABC jest wykorzystywana w antygenach O zbudowanych z powtarzających się podjednostek tego samego cukru (tzw. homopolimeryczne antygeny O). Przykładem mogą być polimannozowe

antygeny *E. coli* O8, O9 i O9a [128]. W tym szlaku zsyntezowany polimer jest transportowany z cytoplazmy do przestrzeni peryplazmatycznej z wykorzystaniem białek wiążących ATP (tzw. transporter ABC). Transporter ABC odpowiedzialny za eksport antygeny O składa się z dwóch domen transmembranowych, kodowanych przez gen *wzm* oraz dwóch domen wiążących nukleotydy kodowanych przez gen *wzt*. Po utworzeniu prekursora, którym jest Und-PP-GlcNAc następuje przyłączenie przez glikozylotransferazy adaptora, którym jest cząsteczka cukru. Dopiero po przyłączeniu adaptora następuje przyłączenie następnych podjednostek cukrowych i transport powstałej cząsteczki do przestrzeni peryplazmatycznej przez utworzony przez białka Wzt i Wzm kanał [27].

Droga syntazozależna

Trzeci mechanizm transportu podjednostek O przez błonę wewnętrzną został dotychczas opisany tylko w przypadku antygeny O *S. enterica* serowar Borreze [62, 63]. Antygen O *S. Borreze* jest homopolimerem utworzonym z N-acetylomannozaminy (ManNAc). Droga syntazozależna w podobny sposób jak droga ABC-zależna rozpoczyna się od białka WecA [62], a pierwsza reszta cukrowa ManNAc jest przenoszona na cząsteczkę Und-PP z udziałem transferazy WbbE [61]. Następnie syntaza WbbF katalizuje reakcje polimeryzacji, jednocześnie eksportując polisacharydowy łańcuch przez błonę wewnętrzną [28, 64]. Dokładny mechanizm transportu podjednostek O przez syntazę WbbF nie jest w pełni wyjaśniony.

Ligacja antygeny O (powstałego w jednej z trzech wcześniej omówionych dróg) do części lipidowo-rdzeniowej zachodzi po peryplazmatycznej stronie błony wewnętrznej, jednak jej mechanizm nie został w pełni wyjaśniony. Produkt genu *waaL* wydaje się obecnie jedynym białkiem niezbędnym bakterii do przeprowadzenia ligacji. Reakcja ligacji nie jest jednak unikalna i poza biosyntezą LPS zachodzi również w czasie glikozylacji białek w bakteriach i eukariontach [102].

Wytwarzanie nośnika Und-P w komórce bakteryjnej w bardzo małych ilościach jest czynnikiem ograniczającym biosyntezę antygenów O. Izoprenoidowy nośnik lipidowy jest niezbędny nie tylko do biosyntezy LPS, ale i do biosyntezy peptydoglikanu oraz innych polimerów węglowodanowych. Po procesach inicjacji, wydłużania i translokacji powtarzających się podjednostek O następuje uwolnienie Und-PP po stronie peryplazmatycznej błony komórkowej i przekształcenie do Und-P przez pirofosfatazę [124]. Niektóre bakterie (*Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*) są zdolne do wytwarzania antybiotyków peptydowych (bacytracyna), które wiążąc się z Und-PP hamują jego defosforylację, blokując recykling Und-PP do Und-P [113, 114]. W przypadku polisacharydów, które wykorzystują do transportu szlak zależny od Wzy/Wzx, działanie bacytracyny może poważnie zaburzyć biosyntezę LPS, ponieważ ta droga transportu wykorzystuje

jedną cząsteczkę Und-PP do transportu jednej podjednostki O-swoistej. W przypadku drogi syntezozależnej oraz drogi zależnej od transportera ATP jest wykorzystywana tylko jedna cząsteczka Und-P do transportu całego cukrowego polimeru, w związku z czym recykling Und-PP nie jest czynnikiem ograniczającym biosyntezę LPS i sam proces biosyntezy LPS jest bardziej odporny na działanie antybiotyków peptydowych [55].

TRANSPORT LPS Z PRZESTRZENI PERYPLAZMATYCZNEJ DO BŁONY ZEWNĘTRZNEJ

Dopiero stosunkowo niedawno zidentyfikowano białka odpowiedzialne za transport kompletnych cząsteczek LPS przez przestrzeń peryplazmatyczną na powierzchnię błony zewnętrznej [104]. Transport cząsteczki LPS wymaga współdziałania kompleksu białek Lpt [21]. Sugeruje się, że do transportu LPS przez powstały „mostek białkowy” jest niezbędna hydroliza cząsteczek ATP [87]. W licznych badaniach wykazano, że białkowe mutanty *E. coli* z niedoborami białek Lpt charakteryzowały się akumulacją cząsteczek LPS w peryplazmie [74, 103, 109]. W skład kompleksu białkowego odpowiedzialnego za transport cząsteczek LPS wchodzi: LptA, LptB, LptC, LptD, LptE, LptF oraz LptG [127]. Uważa się, że ABC transporter LptBFG inicjuje uwolnienie cząsteczek LPS z błony wewnętrznej w celu ułatwienia wejścia cząsteczek w przestrzeń peryplazmatyczną [103, 110]. W następnym etapie LPS jest transportowany przez peryplazmę z udziałem białek LptC, LptA, LptD. Transport cząsteczki LPS przez przestrzeń peryplazmatyczną umożliwia prawdopodobnie charakterystyczne domeny OstA, zidentyfikowane w grupie białek odpowiedzialnych za jego transport [11, 35, 111, 125, 130]. Białko LptA pełni funkcję łącznika między kompleksami LptBFGC a kompleksem LptDE, natomiast białka LptD i LptE odpowiadają za wbudowanie cząsteczki LPS w błonę zewnętrzną [10, 74, 109, 110]. Mechanizm transportu cząsteczek LPS został opisany dla *E. coli*, jednak wykazano, że system białek Lpt nie jest konserwatywny dla wszystkich bakterii [44, 117]. Dokładne poznanie mechanizmu transportu cząsteczek LPS do błony zewnętrznej u różnych gatunków bakterii wymaga dalszych, systematycznych badań wykraczających poza badania przeprowadzone dotychczas dla *E. coli*.

KONTROLA DŁUGOŚCI CZĄSTECZKI LIPOPOLISACHARYDU

Antygeny O różnią się nie tylko składem chemicznym, ale także liczbą powtarzających się podjednostek w łańcuchu polisacharydowym. Przeprowadzona analiza rozkładu długości poprzez elektroforezę w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) [16, 38, 54, 118] wykazuje, że lipopolisacharyd wyizolowany z tego samego szczepu bakterii składa się z populacji cząsteczek o bardzo zróżnicowanej masie cząsteczkowej, związanej z różną liczbą podjednostek polisacharydu O-swoistego. Uznano, że taki rozkład długości cząsteczek LPS jest spowodowany obecnością genów odpowiedzialnych za kontrolę długości antygeny O. We wstępnym okresie badań nad mecha-

nizmami biosyntezy lipopolisacharydu tym samym genomem homologicznym przypisano różne nazwy. Gen *rol* (regulator of O-antigen length) po raz pierwszy zidentyfikowali Batchelor i wsp. [8]; Bastin i wsp. [6] nazwali gen odpowiedzialny za kontrolę długości O-antygeny *cl*d (chain length determinant). Opisany w latach 90 ub.w. gen odpowiedzialny za regulację długości łańcucha O-swoistego jest obecnie znany jako *wzzB*. Stevenson i wsp. zidentyfikowali inny gen odpowiedzialny za syntezę bardzo długiego antygeny O u *S. flexneri* [112]. Zidentyfikowany gen wykazywał duże podobieństwo sekwencji do genu *fepE* *E. coli* K12, kodującego system wychwytu żelaza ze środowiska. Również Murray i wsp. zidentyfikowali białko odpowiedzialne za kontrolę długości łańcucha O-swoistego, np. złożonego z ponad 100 powtarzających się podjednostek w lipopolisacharydzie *Salmonella* Typhimurium. I w tym przypadku wykazano, że gen *wzz_{fepE}* znajduje się w obrębie klastra genów odpowiedzialnych za wychwyt żelaza [81].

Cząsteczki LPS mogą się charakteryzować występowaniem trzech wyraźnie odrębnych frakcji, różniących się liczbą powtarzających się podjednostek O. W szczepach *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* można wyróżnić frakcję cząsteczek LPS o małej masie cząsteczkowej (low molecular weight O-antigen LPS, LMW-OAg LPS) – zawierających antygen O zbudowany z mniej niż 15 powtarzających się podjednostek, frakcję LPS z długim łańcuchem O swoistym (long O antigen LPS, L-OAg LPS) zbudowanym z 16-35 powtarzających się podjednostek oraz frakcję LPS z bardzo długim łańcuchem O-swoistym (very long O antigen LPS, VL-OAg LPS) – zbudowanym z ponad 100 powtarzających się podjednostek. Wykazano, że za syntezę L-OAg LPS odpowiada gen *wzz_{ST}*, natomiast za syntezę VL-OAg LPS odpowiedzialny jest gen *wzz_{fepE}* [81]. Homologi białka *Wzz_{fepE}* zidentyfikowano m.in. u *E. coli* O157:H7, *E. coli* K-12, *S. flexneri* i *S. Typhi* [81, 88, 90, 106]. Wskazuje to, że cząsteczki LPS występujące w trzech wyraźnie zróżnicowanych frakcjach długościowych są powszechne u *Enterobacteriaceae*, jednak często – prawdopodobnie ze względu na trudności w detekcji – VL-OAg LPS nie zostają rozpoznane w izolowanych preparatach LPS.

Wkrótce po odkryciu genów *wzz* (*wzz_{ST}*, *wzz_{fepE}*) postawiono pytanie, w jaki sposób białka *Wzz* kontrolują długość antygeny O? Obserwacja, że blisko spokrewnione regulatory długości łańcucha O-swoistego mogą być ekspresjonowane u pokrewnych bakterii i narzucać charakterystykę rozkładu długości antygeny O sprawiła, że poznanie sposobu ich działania stało się jeszcze bardziej istotne [7, 80]. Ustalono, że regulacja długości łańcucha O-swoistego jest wewnętrznie określona przez sam regulator (*WzzB*, *Wzz_{fepE}*) niezależnie od ogromnych różnic w strukturze chemicznej poszczególnych substratów, z których zbudowany jest antygen O u różnych gatunków bakterii.

Białka regulujące długość antygeny O należą do rodziny białek bakteryjnych, znanych jako kopolimery

wielocukrów (polysaccharide co-polimers, PCP) [27, 79, 121]. PCP są odpowiedzialne za eksport złożonych polisacharydów, zarówno u bakterii Gram-ujemnych jak i Gram-dodatnich. W obrębie PCP można wyróżnić trzy klasy: PCP-1 – PCP-3. Białka odpowiedzialne za procesowanie antygeny O należą do grupy PCP-1 i są zbudowane z dwóch transmembranowych helis oraz jednej domeny peryplazmatycznej. Analiza strukturalna przebadanych PCP (WzzB z *S. Typhimurium*, FepE z *E. coli*) wykazała, że regulatory długości łańcucha są montowane w oligomery o różnym składzie (WzzB - pentamer, FepE - nonamer), jednocześnie przyjmując podobne trójwymiarowe struktury mimo niewielkiej identyczności w sekwencji (około 23%). Obserwacje te mogą wskazywać na wspólny molekularny mechanizm wykorzystywany przez te cząsteczki do kontrolowania długości łańcucha polisacharydowego [121].

Dotychczas zaproponowano kilka modeli interakcji między regulatorami długości łańcucha O-swoistego i polimerazą Wzy. Carter i wsp. [19] w swoim modelu zakładali, że białko Wzz łączy się w kompleks wielobiałkowy, zbudowany z flipazy Wzx, polimerazy Wzy oraz ligazy Waal. Uzyskane dane eksperymentalne z testów immunoprecypitacji i chemicznego linkowania nie wskazały jednak jednoznacznie na interakcje między regulatorem długości WzzB a polimerazą Wzy [19]. Alternatywne badania *in vitro* przeprowadzone przez Woodwarda i wsp., polegające na „rekonstrukcji” ścieżki biosyntezy antygeny O z użyciem oczyszczonych białek, wskazały wprawdzie, że długość dojrzałego antygeny O zależy wyłącznie od obecności polimerazy Wzy i regulatora długości Wzz, ale również w tym przypadku nie zaobserwowano wyraźnej interakcji między tymi białkami [133]. Uważa się, że powstający antygen O jest wydłużany przez dołączanie przez polimerazę Wzy kolejnych podjednostek O do nieredukującego końca wzrastającej cząsteczki. Kalynych i wsp. [59] proponują model regulacji długości łańcuchów O-swoistych, który zakłada, że białka Wzz regulują długość dojrzałego antygeny O przez utrzymywanie wzrastającego łańcucha O-swoistego w konformacji umożliwiającej dalszą polimeryzację, zapobiegając przedwczesnemu uwolnieniu rosnącego polisacharydu. W chwili gdy antygen O osiągnie liczbę powtarzających się podjednostek, które nie mogą już być dłużej związane przez białka Wzz, dochodzi do zmiany konformacji i białka regulujące długość dysocjują. W następnej kolejności dojrzały antygen O może zostać przyłączony do części lipidowo-rdzeniowej przez ligazę Waal [59].

Mechanizm funkcjonowania systemu kontroli, odpowiedzialnego za powstanie cząsteczek LPS o określonej długości nie jest jeszcze wyjaśniony. Dwie hipotezy dotyczące regulacji procesu syntezy cząsteczki lipopolisacharydu obejmują koncepcję „zegara molekularnego” (molecular clock), regulującego polimeryzację poprzez czas trwania reakcji [6] oraz „molekularnej linijki” (molecular ruler), gdzie proces powstawania nowego łańcucha zatrzymuje się wraz z osiągnięciem jego zadanej długości [121]. Najnowsze badania doty-

czące syntezy polisacharydu O-swoistego u *E. coli* O9a [66] wskazują jednak, że na długość powstającego łańcucha ma wpływ proporcja ilościowa ekspresji dwu enzymów zaangażowanych w biosyntezę O-antygeny: WbdA odpowiedzialnego za wydłużanie polisacharydu oraz WbdD odpowiedzialnego za terminację procesu syntezy.

Istnieją doniesienia, które sugerują, że na długość łańcucha O-swoistego, oprócz genów wzz, wpływają również czynniki środowiskowe. McConnell i Wright wykazali, że długość i rozkład antygeny O *S. Anatum* są zależne od temperatury wzrostu. Podczas gdy komórki *S. Anatum* syntetyzują LPS gładki w 37°C, w niższej temperaturze (20-25°C) dochodzi również do syntezy półszorstkiego LPS [77]. Delgado i wsp. udowodnili, że u *S. Typhimurium* ekspresja genu wzz_{ST} jest indukowana w medium hodowlanym zawierającym jony Mg²⁺ i Fe³⁺ [29]. Według Bravo i wsp. u *S. Typhimurium* i *S. Enteritidis* synteza części O-swoistej lipopolisacharydu jest zależna od fazy wzrostu [12]. Pawlak i wsp. wykazali, że przedłużona ekspozycja na surowicę ludzką szczepów *Salmonella* O48 wpływa na długość powstającego antygeny O, a także że testowane szczepy różniły się wrażliwością na surowicę przed i po długotrwałej ekspozycji na surowicę ludzką (u trzech z czterech testowanych szczepów zaobserwowano wzrost oporności na bakteriobójcze działanie surowicy ludzkiej po przedłużonej ekspozycji) [91]. Pomimo licznych doniesień na temat wpływu czynników środowiskowych na regulację długości lipopolisacharydu, niewiele wiadomo w jaki sposób warunki hodowli drobnoustrojów modulują długość powstających łańcuchów O-swoistych.

Mimo że istnieją pewne przesłanki na temat mechanizmów regulacji długości łańcuchów O-swoistych, niewiele jest informacji na temat proporcji łańcuchów LPS o różnej długości na powierzchni komórki bakteryjnej. Palva i Mäkälä wykazali, że u *S. Typhimurium* rozkład cząsteczek LPS na powierzchni komórki bakteryjnej jest nierówny i charakteryzuje się tylko niewielkim procentem cząsteczek z 2-18 powtarzającymi się podjednostkami O-swoistymi, podczas gdy 77% LPS ma 19-34 powtarzających się podjednostek O [89].

TECHNIKI POMIARU DŁUGOŚCI CZĄSTECZKI LIPOPOLISACHARYDU

Lipopolisacharyd cechuje wysoki stopień zmienności strukturalnej, jak również zmienna liczba powtarzających się podjednostek polisacharydu O-swoistego. Różnice te przyczyniają się do znacznej niejednorodności uzyskiwanych eksperymentalnie preparatów LPS. Ponieważ cząsteczki LPS w komórce są wysoce heterogenne i mają skłonność do tworzenia agregatów o różnych rozmiarach, dokładny pomiar długości lipopolisacharydu jest trudny. Metodą najpowszechniej wykorzystywaną do pomiaru długości LPS jest SDS-PAGE. Wykorzystanie znakowania LPS izotopami promieniotwórczymi, umożliwiło analizę rozkładu populacji cząsteczek lipopolisacharydu za pomocą radiografii i densytometrii [38, 89,

112]. Opracowanie czulej metody barwienia LPS w żelu za pomocą metalicznego srebra [48, 123], będącą modyfikacją podobnego protokołu, stosowanego do barwienia elektroforegramów białkowych [118], umożliwiło uproszczenie procedury i zaczęło być powszechnie wykorzystywane do analizy rozkładu długościowego cząsteczek LPS [16, 25, 129]. Elektroforeza wciąż pozostaje podstawową metodą tej analizy, wykorzystywaną współcześnie zarówno w połączeniu z autoradiografią [66] jak i barwieniem metodą srebrową [45]. Opracowano także rzadziej stosowane modyfikacje tej metody (elektroforeza dwuwymiarowa, wstępny rozdział LPS w chromatografii kolumnowej lub elektroforezie preparatywnej, użycie deoksycholenu zamiast SDS [93, 97]). Ponieważ dokładniejsza ocena masy cząsteczkowej LPS z wykorzystaniem PAGE jest utrudniona – dostępne są jedynie białkowe markery masy cząsteczkowej – do analizy rozkładu wielkości cząsteczek LPS w próbce stosowano także rozdział cząsteczek w polu elektrycznym wykorzystujący technikę elektroforezy kapilarnej, również z użyciem mikroukładów elektroforetycznych [67, 120].

Inną stosowaną metodą oceny długości części O-swoistej lipopolisacharydu była analiza proporcji między składnikiem cukrowym, występującym w powtarzających się podjednostkach części O-swoistej, a jednym z elementów rdzenia LPS. Pomiar proporcji realizowano testami kolorymetrycznymi (np. proporcji występowania kolitozy do Kdo w LPS *E. coli* O111 [38]), ale również zastosowano analizę spektrometryczną (proporcje między kwasem sjałowym i Kdo w LPS różnorodnych szczepów *Salmonella* O48 [15, 91]). Metoda ta jest jednak ograniczona do szczepów, w których w podjednostce O-swoistej obecny jest charakterystyczny składnik, niewystępujący w pozostałej części cząsteczki LPS (kolitoza, kwas sjałowy, abekwoza czy inne). Metoda pozwala na określenie średniej długości polisacharydu O-swoistego w całej populacji cząsteczek LPS w próbce, jednak nie umożliwia określenia wprost proporcji ilościowych między poszczególnymi formami cząsteczek LPS.

Wiele innych nietypowych metod wykorzystywanych jest do analizy strukturalnej i oceny długości lipopolisacharydu m.in. spektroskopia elektronowego rezonansu spinowego (electron spin resonance, ESR) [92] oraz spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (attenuated total reflectance infrared spectroscopy, ATR-IR) [136]. Rozwijające się techniki analizy mikroskopii sił atomowych (atomic force microscopy, AFM) pozwalają obrazować strukturalne właściwości powierzchni komórki, związane z różnicami długości lipopolisacharydu [39]. Informację dotyczącą postaci LPS uzyskiwano także za pomocą mikroskopii elektronowej, analizując zarówno izolowane preparaty lipopolisacharydowe [73] jak i powierzchnię całej komórki bakteryjnej [36, 39].

Metody spektrometryczne analizy strukturalnej lipopolisacharydów i ich fragmentów obejmują metody związane z łagodną jonizacją analizowanych substan-

cji, przez bombardowanie szybkimi atomami (fast atom bombardment, FAB), elektrorozpylanie (electrospray ionization, ESI), desorpcję za pomocą plazmy (plasma desorption, PD), pirolizy, lasera bądź lasera z udziałem matrycy (matrix assisted laser desorption/ionization, MALDI) [18, 46, 47, 119]. Techniki wykorzystujące PD-MS pozwalały uzyskiwać widma cząsteczek LPS o stosunkowo wysokich masach cząsteczkowych, rzędu 6 000 Da, podczas gdy użycie MALDI pozwalało na analizę cząsteczek do 8 000-14 000 Da [4, 53, 137]. Ze względu jednak na heterogenność cząsteczki lipopolisacharydu oraz jego amfifilowy charakter techniki MALDI mają raczej zastosowanie do analizy całych cząsteczek lipooligosacharydów lub LPS typu szorstkiego, czasem z zastosowaniem dodatkowych technik wstępnego rozdziału w celu zmniejszenia heterogenności próbki [70, 115, 116, 119]. W przypadku lipopolisacharydów typu gładkiego, dopiero po de-O-acetylacji uzyskiwano widma cząsteczek o masach rzędu 10 000-14 000 Da, a dla izolowanego polisacharydu O-swoistego do 16 000 Da [53, 70].

WPLYW DŁUGOŚCI CZĄSTECZKI LIPOPOLISACHARYDU NA INTERAKCJE Z UKŁADEM ODPORNOŚCIOWYM

Lipopolisacharyd, jako jeden z głównych składników błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych, odgrywa główną rolę w interakcji z układem odpornościowym. Podczas infekcji bakterie są bezpośrednio narażone na środowisko organizmu gospodarza, które jest kontrolowane przez komórki odpornościowe. Drobnoustroje wykształciły wiele mechanizmów obronnych, w tym zdolność modulacji syntezy i struktury LPS, umożliwiającą skuteczną ochronę przed działaniem czynników układu immunologicznego.

W odniesieniu do bakterii Gram-ujemnych przyjmuje się, że szczepy gładkie (smooth, S) syntetyzują LPS składający się z trzech odrębnych regionów: lipidu A, rdzenia oraz łańcucha O-swoistego, zbudowanego z powtarzających się podjednostek cukrowych. W odróżnieniu od szczepów gładkich, LPS szczepów półszorstkich (semi-rough, SR) jest zbudowany z lipidu A, rdzenia oraz jednej powtarzającej się podjednostki cukrowej w łańcuchu O-swoistym. Natomiast szczepy szorstkie (rough, R) syntetyzują tzw. lipooligosacharyd (LOS) zbudowany jedynie z lipidu A i części rdzeniowej. Badania porównujące bakterie z rodzaju *Salmonella* o różnych postaciach LPS (S, R) wykazały, że łańcuch O-swoisty odgrywa podstawową rolę w kolonizacji jelita grubego myszy [85], oporności bakterii na mechanizmy zabijania w neutrofilach [86] oraz w procesach unikania lizy przez kaskadę białek układu dopełniacza [40, 58, 122]. Badania przeprowadzone na szczepie dzikim *S. Typhimurium* oraz szorstkich mutantach pozbawionych łańcuchów O-swoistych w cząsteczce LPS wykazały, że zdolność szczepu *S. Typhimurium* do kolonizacji mysiego jelita grubego zmniejsza się, gdy LPS ulega skróceniu [85]. W badaniach porównywano jednak tylko szczepy dzikie, wytwarzające łańcuch O-swoisty, nie charakteryzując jego dokładnej długości oraz szczepy pozbawione całkowicie antygeny

O (mutant rfb) i głębsze mutanty części rdzeniowej LPS (mutanty rfaJ, rfa-990) [85].

Późniejsze badania Grossmana i wsp. [40] powiązały obecność długich łańcuchów O-swoistych w LPS z opornością na bakteriobójcze działanie surowicy ludzkiej. Grossman i wsp. [40] wykazali, że w szczepach *S. Montevideo* przeżywalność bakterii w surowicy jest ściśle związana z liczbą powtarzających się podjednostek w cząsteczce LPS. Do testów wykorzystano zmutowany szczep *S. Montevideo*, w którym synteza O antygeny, którego składnikiem była m.in. mannoza, następowała tylko wtedy gdy bakterie hodowano w pożywkę z dodatkiem tego cukru. W celu modulowania długości powstającego antygeny O bakterie hodowano w pożywkach z różną zawartością mannozy. Analizę profili cząsteczek LPS przeprowadzono z wykorzystaniem SDS-PAGE. W badaniach porównywano trzy parametry składu LPS (średnią liczbę powtarzających się podjednostek przypadającą na cząsteczkę LPS, procent cząsteczek LPS zawierających więcej niż 14 powtarzających podjednostek w cząsteczce LPS oraz procent szorstkich LPS) i korelowano z bakteriobójczym działaniem surowicy ludzkiej. Wykazano, że przeżycie bakterii *S. Montevideo* w surowicy było związane z lipopolisacharydem, który zawierał więcej niż 14 powtarzających się podjednostek w części O-swoistej. Na podstawie uzyskanych danych Grossmann i wsp. wysnuli wnioski, że na powierzchni komórki bakteryjnej konieczna jest odpowiednia gęstość długich łańcuchów O-swoistych, które zapewnią komórce bakteryjnej ochronę przed działaniem układu dopełniacza przez przestrzenne utrudnianie depozycji kompleksu MAC (membrane attack complex, MAC) na powierzchni błony zewnętrznej [40]. Tomas i wsp. również wykazali, że szczepy *S. Typhimurium* z wysokocząsteczkowym LPS są odporne na bakteriobójczą aktywność surowicy, w przeciwieństwie do szczepów z niskocząsteczkowym LPS [122]. Joiner i wsp. natomiast dowiedli, że składnik C3 układu dopełniacza preferencyjnie wiąże cząsteczki LPS *S. Montevideo* składające się z ponad 60 powtarzających się podjednostek O, wobec LPS z 20-21 powtarzającymi się podjednostkami [58].

Mimo licznych badań wskazujących na udział długich łańcuchów O-swoistych na przeżywanie bakterii w surowicy, udział genów wzz w tym procesie nie został definitywnie potwierdzony. Murray i wsp. przeprowadzili badania nad rolą regulacji długości łańcucha O-swoistego w zjadliwości bakterii z rodzaju *Salmonella* [81]. Wykazali, że u szczepów *S. Typhimurium* występuje tzw. modalny rozkład długości cząsteczek lipopolisacharydu, z wyraźnie wyodrębnionymi trzema frakcjami,

różniącymi się liczbą powtarzających się podjednostek polisacharydu O-swoistego: LMW-OAg LPS, L-OAg LPS, VL-OAg LPS. W badaniach potwierdzono znaczenie długości łańcuchów O-swoistych u *S. Typhimurium* w procesie patogenezy [81]. Udział LPS o różnej długości w procesie generowania oporności na surowicę zbadano przez porównanie wrażliwości na surowicę różnych mutantów długościowych LPS w stosunku do szczepu dzikiego *S. Typhimurium*. Wykazano, że szczep dziki był bardzo odporny na działanie układu dopełniacza, szczep z usuniętym genem wzz_{ST} (szczep nie wytwarzał L-OAg LPS) lub wzz_{repE} (szczep nie wytwarzał VL-OAg LPS) nie wykazał istotnej statystycznie różnicy we wrażliwości na działanie układu dopełniacza, natomiast mutant z dwoma wyłączonymi genami wzz (szczep nie wytwarzał ani L-OAg LPS ani VL-OAg LPS) charakteryzował się dużą wrażliwością na działanie białek układu dopełniacza [81]. Bugła-Płoskońska i wsp. testując 21 szczepów *Salmonella* O48 o różnej średniej długości łańcucha O-swoistego nie znaleźli korelacji między długością łańcucha O-swoistego a poziomem przeżywalności bakterii w surowicy ludzkiej [15]. Według Crawforda i wsp. bardzo długie łańcuchy O-swoiste wpływają na przeżywalność *S. Typhimurium* w żółci [24]. Murray i wsp. uważają, że długość antygeny O u *S. Typhimurium* odgrywa również główną rolę w procesie fagocytozy [83]. Holzer i wsp. badając wpływ długości LPS na inwazję i wewnątrzkomórkową replikację *S. Typhimurium* udowodnili, że długość antygeny O jest kluczowa dla funkcjonowania systemu sekrecji typu III oraz dla procesu inwazji bakterii [49].

PODSUMOWANIE

Mimo znacznego postępu w zrozumieniu genetycznych, biochemicznych i strukturalnych podstaw biosyntezy antygenów O, dokładny mechanizm regulujący długość łańcucha O-swoistego pozostaje niewyjaśniony. Niezbędne wydaje się poznanie dokładnych interakcji zachodzących między białkami Wzz, a rosnącym łańcuchem O-swoistym oraz dalsza charakterystyka biochemiczna interakcji białko-białko, aby uzyskać pełny wgląd w organizację komórkowego aparatu biosyntezy antygenów O. Wyjaśnienie mechanizmu unikania przez bakterie Gram-ujemne działania układu odpornościowego gospodarza przez regulację długości cząsteczki lipopolisacharydu również się przyczyni do lepszego zrozumienia mechanizmów patogenności tych bakterii. Poznanie dokładnego szlaku biosyntezy cząsteczki LPS, mechanizmów regulujących długość powstającego łańcucha O-swoistego oraz ich wpływu na oporność bakterii będzie także istotnym krokiem w kierunku tworzenia nowych, skutecznych leków przeciwbakteryjnych.

PIŚMIENICTWO

- [1] Alexander D.C., Valvano M.A.: Role of the *rfe* gene in the biosynthesis of the *Escherichia coli* O7-specific lipopolysaccharide and other O-specific polysaccharides containing N-acetylglucosamine. *J. Bacteriol.*, 1994; 176: 7079-7084
- [2] Allen A., Maskell D.: The identification, cloning and mutagenesis of a genetic locus required for lipopolysaccharide biosynthesis in *Bordetella pertussis*. *Mol. Microbiol.*, 1996; 19: 37-52
- [3] Amor P.A., Yethon J.A., Monteiro M.A., Whitfield C.: Assembly of the K40 antigen in *Escherichia coli*: identification of a novel enzyme responsible for addition of L-serine residues to the glycan backbone and its requirement for K40 polymerization. *J. Bacteriol.*, 1999; 181: 772-780
- [4] Aussel L., Chaby R., Le Blay K., Kelly J., Thibault P., Perry M.B., Caroff M.: Chemical and serological characterization of the *Bordetella hinzii* lipopolysaccharides. *FEBS Lett.*, 2000; 485: 40-46
- [5] Babinski K.J., Ribeiro A.A., Raetz C.R.: The *Escherichia coli* gene encoding the UDP-2,3-diacetylglucosamine pyrophosphatase of lipid A biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 25937-25946
- [6] Bastin D.A., Stevenson G., Brown P.K., Haase A., Reeves P.R.: Repeat unit polysaccharides of bacteria: a model for polymerization resembling that of ribosomes and fatty acid synthetase, with a novel mechanism for determining chain length. *Mol. Microbiol.*, 1993; 7: 725-734
- [7] Batchelor R.A., Alifano P., Biffali E., Hull S.I., Hull R.A.: Nucleotide sequences of the genes regulating O-polysaccharide antigen chain length (*rol*) from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: protein homology and functional complementation. *J. Bacteriol.*, 1992; 174: 5228-5236
- [8] Batchelor R.A., Haraguchi G.E., Hull R.A., Hull S.I.: Regulation by a novel protein of the bimodal distribution of lipopolysaccharide in the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1991; 173: 5699-5704
- [9] Benson R.E., Gottlin E.B., Christensen D.J., Hamilton P.T.: Intracellular expression of peptide fusions for demonstration of protein essentiality in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003; 47: 2875-2881
- [10] Bos M.P., Tefsen B., Geurtsen J., Tommassen J.: Identification of an outer membrane protein required for the transport of lipopolysaccharide to the bacterial cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 9417-9422
- [11] Bowyer A., Baardsnes J., Ajamian E., Zhang L., Cygler M.: Characterization of interactions between LPS transport proteins of the Lpt system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011; 404: 1093-1098
- [12] Bravo D., Silva C., Carter J.A., Hoare A., Alvarez S.A., Blondel C.J., Zaldívar M., Valvano M.A., Contreras I.: Growth-phase regulation of lipopolysaccharide O-antigen chain length influences serum resistance in serovars of *Salmonella*. *J. Med. Microbiol.*, 2008; 57: 938-946
- [13] Brozek K.A., Hosaka K., Robertson A.D., Raetz C.R.: Biosynthesis of lipopolysaccharide in *Escherichia coli*. Cytoplasmic enzymes that attach 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid to lipid A. *J. Biol. Chem.*, 1989; 264: 6956-6966
- [14] Brozek K.A., Raetz C.R.: Biosynthesis of lipid A in *Escherichia coli*. Acyl carrier protein-dependent incorporation of laurate and myristate. *J. Biol. Chem.*, 1990; 265: 15410-15417
- [15] Bugła-Płoskońska G., Rybka J., Futoma-Kołoch B., Cisowska A., Gamian A., Doroszkiewicz W.: Sialic acid-containing lipopolysaccharides of *Salmonella* O48 strains - potential role in camouflage and susceptibility to the bactericidal effect of normal human serum. *Microb. Ecol.*, 2010; 59: 601-613
- [16] Burns S.M., Hull S.I.: Comparison of loss of serum resistance by defined lipopolysaccharide mutants and an acapsular mutant of uropathogenic *Escherichia coli* O75:K5. *Infect. Immun.*, 1998; 66: 4244-4253
- [17] Campbell J.A., Davies G.J., Bulone V., Henrissat B.: A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, 1997; 326: 929-939
- [18] Caroff M., Deprun C., Karibian D.: 252Cf plasma desorption mass spectrometry applied to the analysis of underivatized rough-type endotoxin preparations. *J. Biol. Chem.*, 1993; 268: 12321-12324
- [19] Carter J.A., Jiménez J.C., Zaldívar M., Álvarez S.A., Marolda C.L., Valvano M.A., Contreras I.: The cellular level of O-antigen polymerase Wzy determines chain length regulation by WzzB and WzzpHS-2 in *Shigella flexneri* 2a. *Microbiology*, 2009; 155: 3260-3269
- [20] Chang G., Roth C.B.: Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science*, 2001; 293: 1793-1800
- [21] Chang S.S., Gronenberg L.S., Kahne D.: Proteins required for lipopolysaccharide assembly in *Escherichia coli* form a transenvelope complex. *Biochemistry*, 2010; 49: 4565-4567
- [22] Clementz T., Bednarski J.J., Raetz C.R.: Function of the *htrB* high temperature requirement gene of *Escherichia coli* in the acylation of lipid A: HtrB catalyzed incorporation of laurate. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 12095-12102
- [23] Collins L.V., Attridge S., Hackett J.: Mutations at *rfc* or *pmi* attenuate *Salmonella typhimurium* virulence for mice. *Infect. Immun.*, 1991; 59: 1079-1085
- [24] Crawford R.W., Keestra A.M., Winter S.E., Xavier M.N., Tsois R.M., Tolstikov V., Bäuml A.J.: Very long O-antigen chains enhance fitness during *Salmonella*-induced colitis by increasing bile resistance. *PLoS Pathog.*, 2012; 8: e1002918
- [25] Crawford R.W., Wangdi T., Spees A.M., Xavier M.N., Tsois R.M., Bäuml A.J.: Loss of very-long O-antigen chains optimizes capsule-mediated immune evasion by *Salmonella enterica* serovar Typhi. *MBio*. 2013; 4: e00232-13
- [26] Crowell D.N., Anderson M.S., Raetz C.R.: Molecular cloning of the genes for lipid A disaccharide synthase and UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1986; 168: 152-159
- [27] Cuthbertson L., Kos V., Whitfield C.: ABC transporters involved in export of cell surface glycoconjugates. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2010; 74: 341-362
- [28] DeAngelis P.L.: Microbial glycosaminoglycan glycosyltransferases. *Glycobiology*, 2002; 12: 9R-16R
- [29] Delgado M.A., Mouslim C., Groisman E.A.: The PmrA/PmrB and RcsC/YojN/RcsB systems control expression of the *Salmonella* O-antigen chain length determinant. *Mol. Microbiol.*, 2006; 60: 39-50
- [30] Doerrler W.T.: Lipid trafficking to the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.*, 2006; 60: 542-552
- [31] Emiola A., George J., Andrews S.S.: A complete pathway model for lipid A biosynthesis in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 2015; 10: e0121216
- [32] Feldman M.F., Marolda C.L., Monteiro M.A., Perry M.B., Parodi A.J., Valvano M.A.: The activity of a putative polyisoprenol-linked sugar translocase (Wzx) involved in *Escherichia coli* O antigen assembly is independent of the chemical structure of the O repeat. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 35129-35138
- [33] Feng L., Senchenkova S.N., Tao J., Shashkov A.S., Liu B., Shevelev S.D., Reeves P.R., Xu J., Knirel Y.A., Wang L.: Structural and genetic characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 O antigen and development of an O145 serogroup-specific PCR assay. *J. Bacteriol.*, 2005; 187: 758-764

- [34] Feng L., Wang W., Tao J., Guo H., Krause G., Beutin L., Wang L.: Identification of *Escherichia coli* O114 O-antigen gene cluster and development of an O114 serogroup-specific PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, 2004; 42: 3799-3804
- [35] Freinkman E., Okuda S., Ruiz N., Kahne D.: Regulated assembly of the transenvelope protein complex required for lipopolysaccharide export. *Biochemistry*, 2012; 51: 4800-4806
- [36] Fujimoto S., Meno Y., Horikawa K.: Heterogeneity in expression of lipopolysaccharide and major outer-membrane proteins by strains of *Escherichia coli* O157 with different H-serotypes. *Microbiol. Immunol.*, 1998; 42: 527-531
- [37] Garrett T.A., Kadmas J.L., Raetz C.R.: Identification of the gene encoding the *Escherichia coli* lipid A 4'-kinase. Facile phosphorylation of endotoxin analogs with recombinant LpxK. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 21855-21864
- [38] Goldman R.C., Joiner K., Leive L.: Serum-resistant mutants of *Escherichia coli* O111 contain increased lipopolysaccharide, lack an O antigen-containing capsule, and cover more of their lipid A core with O antigen. *J. Bacteriol.*, 1984; 159: 877-882
- [39] Greif D., Wesner D., Regtmeier J., Anselmetti D.: High resolution imaging of surface patterns of single bacterial cells. *Ultramicroscopy*, 2010; 110: 1290-1296
- [40] Grossman N., Schmetz M.A., Foulds J., Klima E.N., Jimenez-Lucho V.E., Leive L.L., Joiner K.A.: Lipopolysaccharide size and distribution determine serum resistance in *Salmonella montevideo*. *J. Bacteriol.*, 1987; 169: 856-863
- [41] Gunn J.S., Lim K.B., Krueger J., Kim K., Guo L., Hackett M., Miller S.I.: PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabino-se lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol. Microbiol.*, 1998; 27: 1171-1182
- [42] Guo L., Lim K.B., Gunn J.S., Bainbridge B., Darveau R.P., Hackett M., Miller S.I.: Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes phoP-phoQ. *Science*, 1997; 276: 250-253
- [43] Guo L., Lim K.B., Poduje C.M., Daniel M., Gunn J.S., Hackett M., Miller S.I.: Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell*, 1998; 95: 189-198
- [44] Haarmann R., Ibrahim M., Stevanovic M., Bredemeier R., Schleiff E.: The properties of the outer membrane localized Lipid A transporter LptD. *J. Phys. Condens. Matter*, 2010; 22: 454124
- [45] Hagelueken G., Clarke B.R., Huang H., Tuukkanen A., Danciu I., Svergun D.I., Hussain R., Liu H., Whitfield C., Naismith J.H.: A coiled-coil domain acts as a molecular ruler to regulate O-antigen chain length in lipopolysaccharide. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2015; 22: 50-56
- [46] Harvey D.J.: Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates. *Mass Spectrom. Rev.*, 1999; 18: 349-450
- [47] Helleur R.J., Thibault P., Banoub J.H., Shaw D.H.: Pyrolysis-desorption chemical ionization and high-energy tandem mass spectrometry of the O-specific antigen of *Yersinia ruckeri*. *Org. Mass Spectrom.*, 1992; 27: 967-973
- [48] Hitchcock P.J., Brown T.M.: Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.*, 1983; 154: 269-277
- [49] Hoelzer K., Moreno Switt A.I., Wiedmann M.: Animal contact as a source of human non-typhoidal salmonellosis. *Vet. Res.*, 2011; 42: 34
- [50] Holst O., Ulmer A.J., Brade H., Flad H.D., Rietschel E.T.: Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1996; 16: 83-104
- [51] Hong Y., Cunneen M.M., Reeves P.R.: The Wzx translocases for *Salmonella enterica* O-antigen processing have unexpected serotype specificity. *Mol. Microbiol.*, 2012; 84: 620-630
- [52] Iguchi A., Iyoda S., Seto K., Morita-Ishihara T., Scheutz F., Ohnishi M., Pathogenic E. coli Working Group in Japan: *Escherichia coli* O-genotyping PCR: a comprehensive and practical platform for molecular O serogrouping. *J. Clin. Microbiol.*, 2015; 53: 2427-2432
- [53] Jachmiek W., Petersson C., Helander A., Kenne L., Lugowski C., Niedziela T.: Structural studies of the O-specific chain and a core hexasaccharide of *Hafnia alvei* strain 1192 lipopolysaccharide. *Carbohydr. Res.*, 1995; 269: 125-138
- [54] Jann B., Reske K., Jann K.: Heterogeneity of lipopolysaccharides. Analysis of polysaccharide chain lengths by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Eur. J. Biochem.*, 1975; 60: 239-246
- [55] Jann K., Jann B.: Structure and biosynthesis of O antigens. W: Handbook of Endotoxin, Vol. 1, Chemistry of the endotoxin, red.: Rietschel E., Elsevier, Amsterdam, 1984: 138-186
- [56] Jenkins R.J., Dotson G.D.: Dual targeting antibacterial peptide inhibitor of early Lipid A biosynthesis. *ACS Chem. Biol.*, 2012; 7: 1170-1177
- [57] Jiang X.M., Neal B., Santiago F., Lee S.J., Romana L.K., Reeves P.R.: Structure and sequence of the *rfb* (O antigen) gene cluster of *Salmonella* serovar typhimurium (strain LT2). *Mol. Microbiol.*, 1991; 5: 695-713
- [58] Joiner K.A., Grossman N., Schmetz M., Leive L.: C3 binds preferentially to long-chain lipopolysaccharide during alternative pathway activation by *Salmonella montevideo*. *J. Immunol.*, 1986; 136: 710-715
- [59] Kalynych S., Valvano M.A., Cygler M.: Polysaccharide co-polymerases: the enigmatic conductors of the O-antigen assembly orchestra. *Protein Eng. Des. Sel.*, 2012; 25: 797-802
- [60] Kaszowska M.: Budowa chemiczna i biosynteza lipopolisacharydu - ważnego składnika osłony komórkowej bakterii Gram-ujemnych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2004; 58: 333-342
- [61] Keenleyside W.J., Clarke A.J., Whitfield C.: Identification of residues involved in catalytic activity of the inverting glycosyl transferase WbbE from *Salmonella enterica* Serovar Borreze. *J. Bacteriol.*, 2001; 183: 77-85
- [62] Keenleyside W.J., Perry M., Maclean L., Poppe C., Whitfield C.: A plasmid-encoded *rfbO*:54 gene cluster is required for biosynthesis of the O:54 antigen in *Salmonella enterica* serovar Borreze. *Mol. Microbiol.*, 1994; 11: 437-448
- [63] Keenleyside W.J., Whitfield C.: Lateral transfer of *rfb* genes: a mobilizable ColE1-type plasmid carries the *rfb*_{O:54} (O:54 antigen biosynthesis) gene cluster from *Salmonella enterica* serovar Borreze. *J. Bacteriol.*, 1995; 177: 5247-5253
- [64] Keenleyside W.J., Whitfield C.: A novel pathway for O-polysaccharide biosynthesis in *Salmonella enterica* serovar Borreze. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 28581-28592
- [65] Kelly T.M., Stachula S.A., Raetz C.R., Anderson M.S.: The *firA* gene of *Escherichia coli* encodes UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-glucosamine N-acyltransferase. The third step of endotoxin biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 1993; 268: 19866-19874
- [66] King J.D., Berry S., Clarke B.R., Morris R.J., Whitfield C.: Lipopolysaccharide O antigen size distribution is determined by a chain extension complex of variable stoichiometry in *Escherichia coli* O9a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014; 111: 6407-6412
- [67] Kocsis B., Makszin L., Kilár A., Péterfi Z., Kilár F.: Capillary electrophoresis chips for fingerprinting endotoxin chemotypes and subclasses. *Methods Mol. Biol.*, 2017; 1600: 151-165
- [68] Kong F., Wang W., Tao J., Wang L., Wang Q., Sabananthan A., Gilbert G.L.: A molecular-capsular-type prediction system for 90 *Streptococcus pneumoniae* serotypes using partial *cpsA-cpsB* sequencing and *wzy*- or *wzx*-specific PCR. *J. Med. Microbiol.*, 2005; 54: 351-356
- [69] Krosky D.J., Alm R., Berg M., Carmel G., Tummino P.J., Xu B., Yang W.: *Helicobacter pylori* 3-deoxy-D-manno-octulosonate-8-phosphate

- (KDO-8-P) synthase is a zinc-metalloenzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002; 1594: 297-306
- [70] Lindner B.: Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of lipopolysaccharides. *Methods Mol. Biol.*, 2000; 145: 311-325
- [71] Liu D., Cole R.A., Reeves P.R.: An O-antigen processing function for Wzx (RfbX): a promising candidate for O-unit flippase. *J. Bacteriol.*, 1996; 178: 2102-2107
- [72] Lodowska J., Wolny D., Węglarz L., Dzierżewicz Z.: Heterogeność strukturalna lipidu A bakterii Gram-ujemnych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 106-121
- [73] Lopes J., Inniss W.E.: Electron microscopic study of lipopolysaccharide from an avian strain of *Escherichia coli* O18. *J. Bacteriol.*, 1970; 103: 238-243
- [74] Ma B., Reynolds C.M., Raetz C.R.: Periplasmic orientation of nascent lipid A in the inner membrane of an *Escherichia coli* LptA mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 13823-13828
- [75] Mamat U., Skurnik M., Bengoechea J.A.: Lipopolysaccharide core oligosaccharide biosynthesis and assembly. *W: Bacterial Lipopolysaccharides*. red.: Springer, Vienna 2011: 237-273
- [76] Marolda C.L., Vicarioli J., Valvano M.A.: Wzx proteins involved in biosynthesis of O antigen function in association with the first sugar of the O-specific lipopolysaccharide subunit. *Microbiology*, 2004; 150: 4095-4105
- [77] McConnell M., Wright A.: Variation in the structure and bacteriophage-inactivating capacity of *Salmonella anatum* lipopolysaccharide as a function of growth temperature. *J. Bacteriol.*, 1979; 137: 746-751
- [78] Mi W., Li Y., Yoon S.H., Ernst R.K., Walz T., Liao M.: Structural basis of MsbA-mediated lipopolysaccharide transport. *Nature*, 2017; 549: 233-237
- [79] Morona R., Van Den Bosch L., Daniels C.: Evaluation of Wzz/MPA1/MPA2 proteins based on the presence of coiled-coil regions. *Microbiology*, 2000; 146: 1-4
- [80] Morona R., van den Bosch L., Manning P.A.: Molecular, genetic, and topological characterization of O-antigen chain length regulation in *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.*, 1995; 177: 1059-1068
- [81] Murray G.L., Attridge S.R., Morona R.: Regulation of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide O antigen chain length is required for virulence; identification of FepE as a second Wzz. *Mol. Microbiol.*, 2003; 47: 1395-1406
- [82] Murray G.L., Attridge S.R., Morona R.: Inducible serum resistance in *Salmonella typhimurium* is dependent on wzz_{fepE}-regulated very long O antigen chains. *Microbes Infect.*, 2005; 7: 1296-1304
- [83] Murray G.L., Attridge S.R., Morona R.: Altering the length of the lipopolysaccharide O antigen has an impact on the interaction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with macrophages and complement. *J. Bacteriol.*, 2006; 188: 2735-2739
- [84] Needham B.D., Trent M.S.: Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2013; 11: 467-481
- [85] Nevola J.J., Stocker B.A., Laux D.C., Cohen P.S.: Colonization of the mouse intestine by an avirulent *Salmonella typhimurium* strain and its lipopolysaccharide-defective mutants. *Infect. Immun.*, 1985; 50: 152-159
- [86] Okamura N., Spitznagel J.K.: Outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* LT2 have lipopolysaccharide-dependent resistance to the bactericidal activity of anaerobic human neutrophils. *Infect. Immun.*, 1982; 36: 1086-1095
- [87] Okuda S., Freinkman E., Kahne D.: Cytoplasmic ATP hydrolysis powers transport of lipopolysaccharide across the periplasm in *E. coli*. *Science*, 2012; 338: 1214-1217
- [88] Ozenberger B.A., Nahlik M.S., McIntosh M.A.: Genetic organization of multiple fep genes encoding ferric enterobactin transport functions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1987; 169: 3638-3646
- [89] Palva E.T., Mäkelä P.H.: Lipopolysaccharide heterogeneity in *Salmonella typhimurium* analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Eur. J. Biochem.*, 1980; 107: 137-143
- [90] Parkhill J., Dougan G., James K.D., Thomson N.R., Pickard D., Wain J., Churcher C., Mungall K.L., Bentley S.D., Holden M.T., Sebahia M., Baker S., Basham D., Brooks K., Chillingworth T. i wsp.: Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature*, 2001; 413: 848-852
- [91] Pawlak A., Rybka J., Dudek B., Krzyżewska E., Rybka W., Kędzióra A., Klaus E., Bugla-Płoskońska G.: *Salmonella* O48 serum resistance is connected with the elongation of the lipopolysaccharide O-antigen containing sialic acid. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017; 18: E2022
- [92] Peterson A.A., Haug A., McGroarty E.J.: Physical properties of short- and long-O-antigen-containing fractions of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* 0111:B4. *J. Bacteriol.*, 1986; 165: 116-122
- [93] Peterson A.A., McGroarty E.J.: High-molecular-weight components in lipopolysaccharides of *Salmonella typhimurium*, *Salmonella minnesota*, and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1985; 162: 738-745
- [94] Raetz C.R.: Biochemistry of endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.*, 1990; 59: 129-170
- [95] Raetz C.R.: Bacterial endotoxins: extraordinary lipids that activate eucaryotic signal transduction. *J. Bacteriol.*, 1993; 175: 5745-5753
- [96] Raetz C.R., Whitfield C.: Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.*, 2002; 71: 635-700
- [97] Rahman M.M., Guard-Petter J., Carlson R.W.: A virulent isolate of *Salmonella enteritidis* produces a *Salmonella typhi*-like lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.*, 1997; 179: 2126-2131
- [98] Ray P.H.: Purification and characterization of 3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthetase from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1980; 141: 635-644
- [99] Raymond C.K., Sims E.H., Kas A., Spencer D.H., Kutayin T.V., Ivey R.G., Zhou Y., Kaul R., Clendenning J.B., Olson M.V.: Genetic variation at the O-antigen biosynthetic locus in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 2002; 184: 3614-3622
- [100] Reeves P.R.: Biosynthesis and assembly of lipopolysaccharide. *W: Bacterial Cell Wall*. red.: Elsevier Science Publishers, Amsterdam 1994, 281-314
- [101] Roncero C., Casadaban M.J.: Genetic analysis of the genes involved in synthesis of the lipopolysaccharide core in *Escherichia coli* K-12: three operons in the *rfa* locus. *J. Bacteriol.*, 1992; 174: 3250-3260
- [102] Ruan X., Loyola D.E., Marolda C.L., Perez-Donoso J.M., Valvano M.A.: The WaaL O-antigen lipopolysaccharide ligase has features in common with metal ion-independent inverting glycosyltransferases. *Glycobiology*, 2012; 22: 288-299
- [103] Ruiz N., Gronenberg L.S., Kahne D., Silhavy T.J.: Identification of two inner-membrane proteins required for the transport of lipopolysaccharide to the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 5537-5542
- [104] Ruiz N., Kahne D., Silhavy T.J.: Transport of lipopolysaccharide across the cell envelope: the long road of discovery. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2009; 7: 677-683
- [105] Samuel G., Reeves P.: Biosynthesis of O-antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly. *Carbohydr. Res.*, 2003; 338: 2503-2519
- [106] Schmitt M.P., Payne S.M.: Genetics and regulation of enterobactin genes in *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.*, 1988; 170: 5579-5587
- [107] Sorensen P.G., Lutkenhaus J., Young K., Eveland S.S., Anderson M.S., Raetz C.R.: Regulation of UDP-3-O-[R-3-hydroxymyristoyl]-N-acetylglucosamine deacetylase in *Escherichia coli*. The second

- enzymatic step of lipid A biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 25898-25905
- [108] Sozhamannan S., Deng Y.K., Li M., Sulakvelidze A., Kaper J.B., Johnson J.A., Nair G.B., Morris J.G.Jr.: Cloning and sequencing of the genes downstream of the *wbc* gene cluster of *Vibrio cholerae* serogroup O139 and analysis of the junction genes in other serogroups. *Infect. Immun.*, 1999; 67: 5033-5040
- [109] Sperandeo P., Cescutti R., Villa R., Di Benedetto C., Candia D., Dehò G., Polissi A.: Characterization of *lptA* and *lptB*, two essential genes implicated in lipopolysaccharide transport to the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 2007; 189: 244-253
- [110] Sperandeo P., Lau F.K., Carpentieri A., De Castro C., Molinaro A., Dehò G., Silhavy T.J., Polissi A.: Functional analysis of the protein machinery required for transport of lipopolysaccharide to the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 2008; 190: 4460-4469
- [111] Sperandeo P., Villa R., Martorana A.M., Šamalíková M., Grandori R., Dehò G., Polissi A.: New insights into the *Lpt* machinery for lipopolysaccharide transport to the cell surface: *LptA-LptC* interaction and *LptA* stability as sensors of a properly assembled transenvelope complex. *J. Bacteriol.*, 2011; 193: 1042-1053
- [112] Stevenson G., Kessler A., Reeves P.R.: A plasmid-borne O-antigen chain length determinant and its relationship to other chain length determinants. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1995; 125: 23-30
- [113] Stone K.J., Strominger J.L.: Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C₅₅-isoprenyl pyrophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1971; 68: 3223-3227
- [114] Storm D.R., Strominger J.L.: Complex formation between bacitracin peptides and isoprenyl pyrophosphates. The specificity of lipid-peptide interactions. *J. Biol. Chem.*, 1973; 248: 3940-3945
- [115] Sturiale L., Garozzo D., Silipo A., Lanzetta R., Parrilli M., Molinaro A.: New conditions for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of native bacterial R-type lipopolysaccharides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2005; 19: 1829-1834
- [116] Sturiale L., Palmigiano A., Silipo A., Knirel Y.A., Anisimov A.P., Lanzetta R., Parrilli M., Molinaro A., Garozzo D.: Reflectron MALDI TOF and MALDI TOF/TOF mass spectrometry reveal novel structural details of native lipooligosaccharides. *J. Mass Spectrom.*, 2011; 46: 1135-1142
- [117] Sutcliffe I.C.: A phylum level perspective on bacterial cell envelope architecture. *Trends Microbiol.*, 2010; 18: 464-470
- [118] Switzer R.C.3rd., Merril C.R., Shifrin S.: A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 1979; 98: 231-237
- [119] Therisod H., Labas V., Caroff M.: Direct microextraction and analysis of rough-type lipopolysaccharides by combined thin-layer chromatography and MALDI mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 2001; 73: 3804-3807
- [120] Thibault P., Richards J.C.: Applications of combined capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry in the characterization of short-chain lipopolysaccharides. *W: Bacterial Toxins: Methods and Protocols. red.: Humana Press, 2000, 327-344*
- [121] Tocilj A., Munger C., Proteau A., Morona R., Purins L., Ajamian E., Wagner J., Papadopoulos M., Van Den Bosch L., Rubinstein J.L., Féthière J., Matte A., Cygler M.: Bacterial polysaccharide co-polymerases share a common framework for control of polymer length. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2008; 15: 130-138
- [122] Tomás J.M., Ciurana B., Benedí V.J., Juárez A.: Role of lipopolysaccharide and complement in susceptibility of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* to non-immune serum. *J. Gen. Microbiol.*, 1988; 134: 1009-1016
- [123] Tsai C.M., Frasch C.E.: A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 1982; 119: 115-119
- [124] Valvano M.: Export of O-specific lipopolysaccharide. *Front. Biosci.*, 2003; 8: s452-s471
- [125] Villa R., Martorana A.M., Okuda S., Gourlay L.J., Nardini M., Sperandeo P., Dehò G., Bolognesi M., Kahne D., Polissi A.: The *Escherichia coli* *Lpt* transenvelope protein complex for lipopolysaccharide export is assembled via conserved structurally homologous domains. *J. Bacteriol.*, 2013; 195: 1100-1108
- [126] Voss B.J., Trent M.S.: LPS transport: flipping out over MsbA. *Curr. Biol.*, 2018; 28: R30-R33
- [127] Wang X., Quinn P.J.: Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Prog. Lipid Res.*, 2010; 49: 97-107
- [128] Whitfield C.: Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. *Trends Microbiol.*, 1995; 3: 178-185
- [129] Whitfield C., Amor P.A., Köplin R.: Modulation of the surface architecture of gram-negative bacteria by the action of surface polymer:lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length. *Mol. Microbiol.*, 1997; 23: 629-638
- [130] Whitfield C., Trent M.S.: Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. *Annu. Rev. Biochem.*, 2014; 83: 99-128
- [131] Whittington D.A., Rusche K.M., Shin H., Fierke C.A., Christianson D.W.: Crystal structure of LpxC, a zinc-dependent deacetylase essential for endotoxin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 8146-8150
- [132] Williams A.H., Immormino R.M., Gewirth D.T., Raetz C.R.: Structure of UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase with a bound antibacterial pentadecapeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 10877-10882
- [133] Woodward R., Yi W., Li L., Zhao G., Eguchi H., Sridhar P.R., Guo H., Song J.K., Motari E., Cai L., Kelleher P., Liu X., Han W., Zhang W., Ding Y. i wsp.: *In vitro* bacterial polysaccharide biosynthesis: defining the functions of Wzy and Wzz. *Nat. Chem. Biol.*, 2010; 6: 418-423
- [134] Wyckoff T.J., Lin S., Cotter R.J., Dotson G.D., Raetz C.R.: Hydrocarbon rulers in UDP-N-acetylglucosamine acyltransferases. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 32369-32372
- [135] Xu D.Q., Cisar J.O., Ambulos N.Jr., Burr D.H., Kopecko D.J.: Molecular cloning and characterization of genes for *Shigella sonnei* form I O polysaccharide: proposed biosynthetic pathway and stable expression in a live salmonella vaccine vector. *Infect. Immun.*, 2002; 70: 4414-4423
- [136] Zarnowiec P., Mizera A., Chrapek M., Urbaniak M., Kaca W.: Chemometric analysis of attenuated total reflectance infrared spectra of *Proteus mirabilis* strains with defined structures of LPS. *Innate Immun.*, 2016; 22: 325-335
- [137] Zarrouk H., Karibian D., Godard I., Perry M.B., Caroff M.: Use of mass spectrometry to compare three O-chain-linked and free lipopolysaccharide cores: differences found in *Bordetella parapertussis*. *J. Endotoxin Res.*, 1997; 4: 453-458
- [138] Zhang L., Toivanen P., Skurnik M.: The gene cluster directing O-antigen biosynthesis in *Yersinia enterocolitica* serotype O:8: identification of the genes for mannose and galactose biosynthesis and the gene for the O-antigen polymerase. *Microbiology*, 1996; 142: 277-288

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.