

Received: 2004.08.03
Accepted: 2004.09.09
Published: 2004.09.20

Budowa chemiczna i biosynteza lipopolisacharydu – ważnego składnika osłony komórkowej bakterii Gram-ujemnych

Chemical structure and biosynthesis of lipopolysaccharide – important component of the cell envelope of Gram-negative bacteria

Marta Kaszowska

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

Streszczenie

Błona zewnętrzna jest pierwszą warstwą osłony komórkowej bakterii Gram-ujemnych, zbudowaną w swej wewnętrznej części z fosfolipidów, natomiast w części zewnętrznej przede wszystkim z lipopolisacharydów (LPS). Lipopolisacharyd to termostabilna cząsteczka zbudowana z trzech, różniących się pod względem strukturalnym części: lipidu A, oligocukru rdzenia oraz antygeny O. Zainteresowanie tą cząsteczką, w medycynie nazywaną endotoksyną, jest spowodowane jej aktywnościami biologicznymi. Cząsteczka ta ujawnia swoją aktywność w chwili przedostania się do krwiobiegu, co dzieje się w przypadku uogólnionych zakażeń bakteriami Gram-ujemnymi.

W pracy przedstawiono funkcje osłony komórkowej bakterii Gram-ujemnych, jej skład chemiczny, strukturę oraz biosyntezę jej głównego składnika – LPS. Choć pojawiło się wiele prac dotyczących biosyntezy poszczególnych fragmentów LPS i jest wiadome jak powstaje jego pełna struktura, nie zidentyfikowano jeszcze wszystkich białek odpowiedzialnych za jej transport na zewnątrz błony komórkowej.

Słowa kluczowe:

lipopolisacharyd (LPS, endotoksyna) • zewnętrzna błona komórkowa bakterii Gram-ujemnych • biosynteza LPS • transport LPS

Summary

The outer membrane is the first layer of the cell envelope of Gram-negative bacteria. This fragment of the cell envelope is built of phospholipids in the internal part and mainly of lipopolysaccharides in the external part. Lipopolysaccharide (LPS, endotoxin) is a thermostabile component consisting of three parts which differ in chemical structure and biological activity. LPS contributes greatly to the structural integrity of bacteria and protects them from host immune defenses.

This review explains what makes this LPS leaflet an effective barrier to permeability and describes the pathways of biosynthesis and the assembly of the hydrophobic domain, known as lipid A, a core oligosaccharide, and the distal polysaccharide (O-antigen).

Key words:

lipopolysaccharide (LPS, endotoxin) • outer membrane of Gram-negative bacteria • biosynthesis of LPS • transport of LPS

Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_58/6370.pdf
Word count:	3791
Tables:	–
Figures:	4
References:	54

Adres autorki: Zakład Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław, e-mail: Marta.Kaszowska@iitd.pan.wroc.pl

WPROWADZENIE

Ściana komórkowa bakterii Gram-ujemnych jest jedną z najbardziej złożonych struktur komórkowych. Zbudowana z błony cytoplazmatycznej, warstwy peptydoglikanu oraz błony zewnętrznej stanowi około 25% suchej masy komórki bakteryjnej (ryc. 1A). Każda z wymienionych części ma specyficzną budowę tworząc łącznie osłonę ochronną komórki. Jest ona również warstwą, przez którą odbywa się transport cząsteczek zarówno do wnętrza jak i na zewnątrz komórki.

Pierwszą barierą ochronną komórki bakterii Gram-ujemnej jest jej błona zewnętrzna. Co sprawia, że jest ona taką dobrą warstwą ochronną? Niewątpliwie duży wpływ na to ma jej duża sztywność wynikająca ze składu chemicznego. Ta hydrofobowa warstwa ochronna w wewnętrznej części złożona z fosfolipidów, w zewnętrznej warstwie zawiera 70–75% amfifilowych cząsteczek nazywanych lipopolisacharydami (LPS). Pojedyncza cząsteczka LPS składa się z trzech odrębnych regionów różniących się budową chemiczną, właściwościami biologicznymi oraz zmiennością struktury (ryc. 1B).

Lipid A jest najbardziej konserwatywną częścią LPS, kotwiczącą tę cząsteczkę w błonie zewnętrznej. Unikatowa struktura tego fragmentu odzwierciedla jego specyficzną rolę w aktywności biologicznej cząsteczki LPS, stąd nazywany jest on centrum toksyczności. Szkielet cukrowy tej części endotoksyny u większości bakterii Gram-ujemnych tworzą dwie cząsteczki glukozaminy połączone wiązaniem glikozydowym $\beta(1\rightarrow6)$ [37]. Heterogenność lipidu A zależy od stopnia podstawienia szkieletu cukrowego kwasami tłuszczowymi oraz grupami zawierającymi ładunek. W skład lipidu A wchodzi najczęściej nasycone, nierozgałęzione kwasy tłuszczowe nadające LPS charakter hydrofobowy. Stałymi składnikami tego fragmentu LPS są 3-hydroksykwas oraz dużo rzadziej – 2-hydroksykwas.

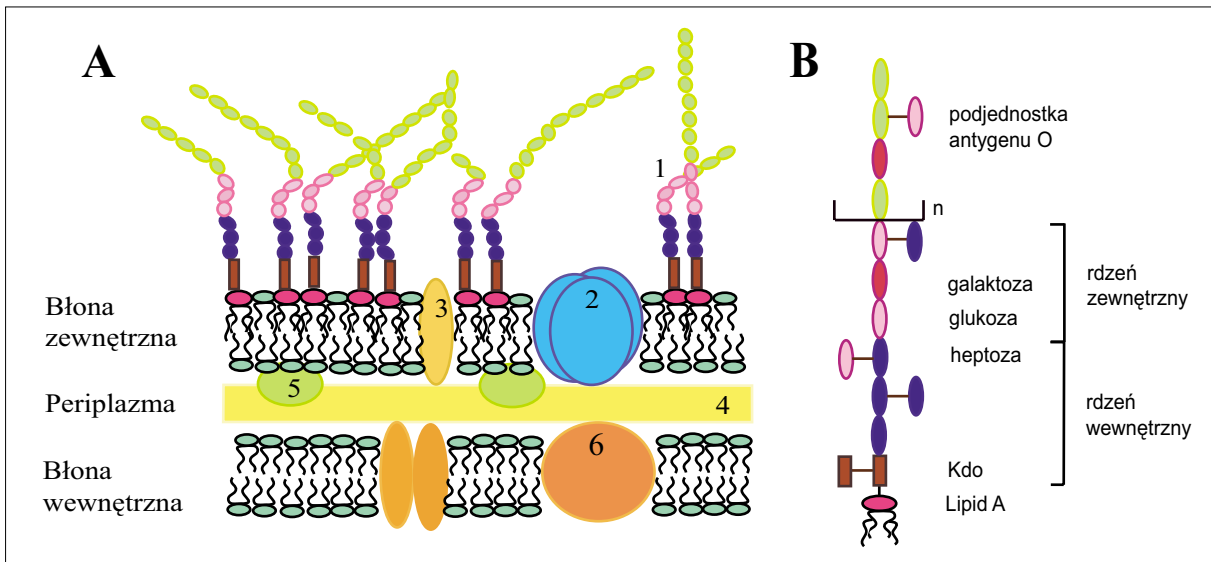
Oligocukier rdzenia poprzez pierwszą resztę kwasu 3-deoksy-*D*-manno-oktulozonoowego (Kdo) podstawia proksymalną resztę glukozaminy lipidu A. Powstałe między tymi cząsteczkami, kwasolabilne wiązanie ketozydowe $\alpha(2\rightarrow6)$ ulega rozerwaniu podczas łagodnej hydrolizy, umożliwiając łatwą separację części polisacharydowej LPS od lipidu A. W szczepach *Shewanella algae* BrY oraz *Shewanella oneidensis* MR-1 są obecne w miejscu Kdo reszty kwasu 8-amino-Kdo [47,48]. Reszty Kdo są zazwyczaj podstawiane przez kolejne reszty Kdo oraz heptoz (najczęściej L,D-Hep), które podstawiane są dodatkowo ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi, pirofosforanowymi czy fosfoetanolaminą. W przypadku niektórych szczepów *Acinetobacter* oraz *Burkholderia cepacia* jedna z cząsteczek

Kdo może zostać zastąpiona resztą kwasu *D*-glicero-*D*-talo-oktulozonoowego (Ko). Poznano jedynie kilka szczepów niemających w tym regionie, nazywanym regionem heptozowym, ujemnie naładowanych reszt fosforanowych [35,44]. Reszty te biorą również udział w stabilizacji konformacji cząsteczki LPS, a co za tym idzie, jednocześnie w stabilizacji błony bakteryjnej przez ich interakcje z dwuwartościowymi jonami Ca^{2+} oraz Mg^{2+} . W następnej kolejności reszty heptoz są podstawiane przez sześciowęglowe reszty cukrowe np.: glukozę, galaktozę, kwasów uronowych, glukozaminy, które tworzą tzw. część zewnętrzną oligocukru rdzenia.

Łańcuch O-swoisty przeważnie jest heteropolisacharydem złożonym z kilku do kilkudziesięciu powtarzających się podjednostek oligosacharydowych, zawierających od dwu do ośmiu reszt cukrowych. Ten fragment endotoksyny jest charakterystyczny i unikatowy dla danego szczepu. Określa swoistość serologiczną, odgrywając niezwykle ważną rolę antygeny powierzchniowego (antygen O) bakterii Gram-ujemnych. Struktury powtarzających się podjednostek – rodzaje cukrów, formy pierścienia, sekwencje, typy wiązań, niecukrowe podstawniki wykazują różnice między szczepami w obrębie gatunku, przedstawiając ogromną zmienność związaną z tą częścią LPS.

Poznanie ogólnego planu struktury LPS umożliwiło ustalenie interakcji pomiędzy tymi cząsteczkami w warstwie błony zewnętrznej, co niewątpliwie ma duży wpływ na budowę tej części komórki bakteryjnej oraz spełniane funkcje. Zakotwiczony w błonie lipid A jest barierą hamującą przenikanie hydrofobowych substancji wpływając na oporność komórek bakterii Gram-ujemnych na sole kwasów żółciowych, detergenty oraz hydrofobowe antybiotyki. Lipid A stabilizuje również konformację białek występujących w błonie zewnętrznej poprzez interakcje z nimi.

Cząsteczki lipidu A wchodzące w skład warstwy błony zewnętrznej sprawiają, że tworzy ona warstwę o dużej sztywności w porównaniu z warstwą wewnętrzną błony zewnętrznej zbudowaną przede wszystkim z fosfolipidów. Kwasy tłuszczowe podstawiające część cukrową lipidu A są zazwyczaj nasycone, jednak ich rodzaj może się zmieniać w zależności od temperatury otoczenia – tzw. zjawisko termoadaptacji, które polega na dostosowywaniu płynności błony do temperatury otoczenia [9,50]. Wspomniane zjawisko występuje np. w LPS *E. coli*, rosnących w temperaturze równej lub wyższej od 30°C. Przeniesienie tych bakterii do temperatury 12°C powoduje uaktywnienie transferazy palmitynianowej (LpxP), odpowiedzialnej za dodatkowe podstawienie resztami nienasyconego kwasu palmitynooleinowego, prowadząc do usztywnienia zewnętrznej błony bakteryjnej. Taki mechanizm powoduje,



Ryc. 1.A. Schemat budowy ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych; 1 – lipopolisacharyd (LPS), 2 – poryna, 3 – nieporynowe białko błony zewnętrznej, 4 – peptydoglikan, 5 – lipoproteina, 6 – białko błony cytoplazmatycznej; B – schemat budowy cząsteczki lipopolisacharydu

że nawet kiedy dochodzi do denaturacji wszystkich białek obecnych w błonie, reszty kwasów tłuszczowych sprawiają, że spełnia ona wciąż rolę ochronną. Na wytrzymałość błony, oprócz składu chemicznego, wpływa także odpowiednie ułożenie cząsteczek LPS względem siebie podczas tworzenia tej struktury. Obecność ujemnie naładowanych reszt zarówno w części lipidu A, a także w części oligocukru rdzenia wewnętrznego ma także duży wpływ na wytrzymałość tego fragmentu komórki bakteryjnej. Te ujemnie naładowane grupy oddziałują z dwuwartościowymi kationami obecnymi w środowisku zewnętrznym, silnie determinując wewnętrzne interakcje pomiędzy częściami lipidowymi znajdującymi się w bliskim sąsiedztwie. Za utrzymanie lipidu A, a co za tym idzie jednocześnie całej cząsteczki LPS w odpowiednim ułożeniu w warstwie zewnętrznej błony są odpowiedzialne wiązania wodorowe. Konformacja cząsteczek LPS tak, by wykazywały minimum energetyczne sugeruje, że fragmenty antygenów O powinny być odchylone w przeciwną stronę od nachylonych pod kątem około 30° do płaszczyzny błony fragmentów lipidów A. Takie ułożenie uwalnia strukturę cząsteczki LPS od wszystkich naprężeń [22].

Z chemicznego punktu widzenia, cząsteczki LPS są podobne do glikosfingolipidów, zbudowanych z reszt cukrowych podstawianych kwasami tłuszczowymi z grupami hydroksylowymi, obecnymi w komórkach eukariotycznych, rzadko zaś identyfikowanych w komórkach organizmów prokariotycznych. W glikosfingolipidach są obecne także grupy NH oraz wolna jedna, lub więcej grup hydroksylowych. Taka struktura, jak wykazały badania, stabilizuje warstwę błony poprzez silne interakcje między cząsteczkami, a więc lipopolisacharydy, podobnie jak glikosfingolipidy, są cząsteczkami idealnie spełniającymi funkcje ochronne.

Bardzo ważny wpływ na funkcjonowanie błony ma rozmieszczenie obecnych w niej kwasów tłuszczowych podstawianych resztami cukrowymi lipidu A. Większa liczba reszt kwasów tłuszczowych wpływa na silniejsze interakcje pomiędzy nimi, a także na powiększenie powierzchni tych

interakcji. Lipid A jest glikolipidem z wiązaniem $\beta(1\rightarrow6)$ glikozydowym pomiędzy dwiema resztami cukrów z wolną grupą 4-OH na redukującym końcu spełniającą rolę donora w wiązaniach wodorowych. Tak samo oligocukier rdzenia związany w 6 pozycji nieredukującej glukozaminy może być donorem wiązań wodorowych. W przeciwieństwie do fosfolipidów, lipid A zawiera reszty kwasów tłuszczowych, mające grupy OH mogące także spełniać rolę donorów wiązań wodorowych. To sugeruje, że te wiązania odgrywają znaczącą rolę w wewnętrznych interakcjach stabilizujących warstwę błony zewnętrznej. W modelu warstwy błony zewnętrznej komórki bakterii Gram-ujemnej *E. coli* reszty kwasów tłuszczowych podstawiające lipid A tworzą stabilną warstwę ochronną dzięki istniejącym interakcjom pomiędzy nimi, a także między nimi a obecnymi w środowisku zewnętrznym jonami dwuwartościowymi.

W błonie są umiejscowione także białka, które są odpowiedzialne za transport składników potrzebnych komórce bakteryjnej. Białka te są zakotwiczone w błonie dzięki interakcjom z jej pozostałymi składnikami w błonie zewnętrznej, przede wszystkim z lipopolisacharydami. Przeanalizowano dokładnie interakcje LPS z jednym z takich białek błonowych, białkiem FhuA. Zaobserwowano, że za te interakcje odpowiedzialne są wiązania jonowe. Lizyna na powierzchni białka oddziałuje z grupami o charakterze mocnego kwasu, jak np.: grupami fosforanowymi czy pirofosforanowymi LPS, natomiast grupy o silnym charakterze zasadowym np. w argininie reagują z grupami o charakterze słabych kwasów, np.: Kdo. Przypuszcza się, że podobne oddziaływania mogą zachodzić z innymi białkami, takimi jak: laktoferyna, BPI czy lizozym [36].

Z medycznego punktu widzenia lipopolisacharyd nazywany jest endotoksyną ponieważ jego obecność może być związana z wystąpieniem posocznicy – groźnego powikłania w przypadku zakażeń bakteryjnych, do których dochodzi wtedy, gdy pewne składniki ściany komórkowej bakterii dostaną się do krwiobiegu, gdzie rozpoznawane przez komórki układu odpornościowego doprowadzają do we-

wnątrzymostrojowej reakcji zapalnej. Endotoksyny w kontakcie z komórkami układu odpornościowego, takimi jak: makrofagi/monocyty, limfocyty, komórki śródbłonka naczyń krwionośnych, stymulują je do efektywnego zahamowania infekcji przez syntezę i uwalnianie przez nie aktywnych produktów, tj.: czynnika martwicy nowotworu – TNF- α , interleukin 1, 6, 8, prostaglandyn, czynnika aktywującego płytki krwi – PAF, tlenku azotu oraz tlenowych rodników. Gdy komórki układu odpornościowego oddziałują z dużą ilością cząsteczek endotoksyny sytuacja staje się niebezpieczna ponieważ dochodzi wtedy do nadmiernego wytwarzania mediatorów, obniżenia ciśnienia krwi, wysokiej gorączki, rozsianego wewnątrzymostrojowego krzepnięcia krwi, niewydolności narządów wewnętrznych czego skutkiem jest śmiertelny wstrząs septyczny [43].

Przez wiele lat uważano, że jedynie komórki bakteryjne zawierające kompletny, złożony z trzech omówionych wyżej fragmentów LPS są zdolne do prawidłowego wzrostu oraz funkcjonowania (tzw. formy gładkie S – smooth). Z czasem, w wyniku poznawania nowych struktur okazało się, że mutanty mające niekompletną strukturę LPS nie są letalne, choć na pewno z utratą fragmentu cząsteczki jest związane osłabienie ich wirulencji. Natomiast próby otrzymania prawidłowo rosnących i dzielących się mutantów z różnych gatunków bakterii, całkowicie pozbawionych LPS kończyły się niepowodzeniem, wykazując ich ważną rolę w funkcjach życiowych. Poznawanie coraz większej liczby struktur LPS wykazało, że fragment lipidu A podstawionego jedną cząsteczką Kdo, jak np. u *Haemophilus influenzae* [34] jest niezbędną strukturą do prawidłowego funkcjonowania błony bakteryjnej i jednocześnie całej komórki bakteryjnej.

W przeciwieństwie do *E. coli* i wielu innych bakterii Gram-ujemnych będących ludzkimi patogenami, istnieje kilka szczepów z wrodzonym brakiem lipidu A w strukturze błony zewnętrznej, definiowanym brakiem genów *lpx* odpowiedzialnych za biosyntezę fragmentu lipidu A. Reakcja barwna Grama na wymienionych bakteriach wskazuje na to, że pomimo braku LPS należą one do grupy bakterii Gram-ujemnych, a te nietypowe struktury spełniają takie same funkcje jak cząsteczki lipopolisacharydów. Na powierzchni błony zewnętrznej *Sphingomonas paucimobilis* oraz *Sphingomonas capsulata* występują amfifilowe cząsteczki – glikosfingolipidy (GSL). Są to cząsteczki charakterystyczne dla komórek eukariotycznych, rzadko identyfikowane w komórkach bakteryjnych. Nawet ich droga biosyntezy w tych komórkach nie jest poznana. Na powierzchni błony zewnętrznej *Sphingomonas paucimobilis* występują dwa rodzaje glikosfingolipidów: GSL-4A oraz GSL-1, z których pierwszy, w przeciwieństwie do drugiego jest zdolny do indukcji pierwszorzędowych mediatorów wstrząsu septycznego, takich jak: TNF- α , IL-1, IL-6. GSL-4A jest prawie 10 000 słabszym aktywatorem niż typowa cząsteczka LPS [23,30]. U *Sphingomonas capsulata* występują dwa rodzaje glikosfingolipidów, z których jeden jest taki sam jak u wcześniej wymienionego szczepu (GSL-1), natomiast drugi (GSL-3) różni się od GSL-4A jedną, terminalną resztą mannozy [24]. Innym, zidentyfikowanym szczepem nie mającym LPS jest *Fibrobacter succinogenes* S85, który ma dwa rodzaje polisacharydów oraz glikolipid w zewnętrznej warstwie ściany komórkowej [46]. W tych cukrowych polimerach zidentyfikowano

po raz pierwszy HEAP (kwas *N*-(2-hydroksyetylo)-2-aminoetylofosfonowy), który jest kowalencyjnie związany z membranowymi polimerami i chroni komórkę przed działaniem fosfataz oraz lipaz. Polisacharydy te, choć mają różną strukturę, mają takie same grupy przenoszące ładunek (każda powtarzająca się reszta ma jedną grupę fosfodiesterową). Polisacharydy połączone są także z cząsteczkami kwasów tłuszczowych tworząc łącznie cząsteczkę amfifilową spełniającą funkcje ochronne oraz funkcje czynnika wirulencji tego szczepu bakterii.

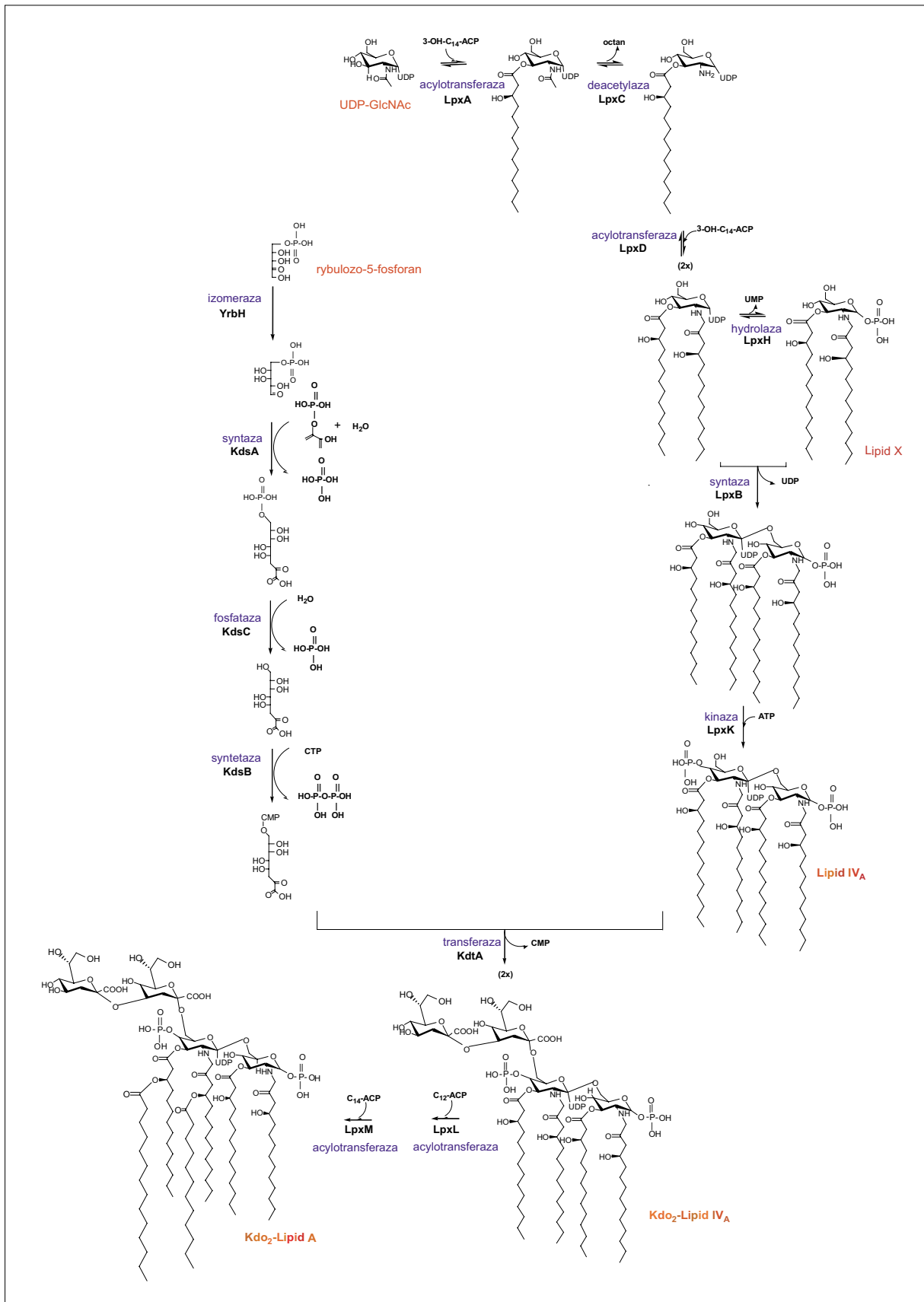
BIOSYNTeza LPS

A. Biosynteza lipidu A

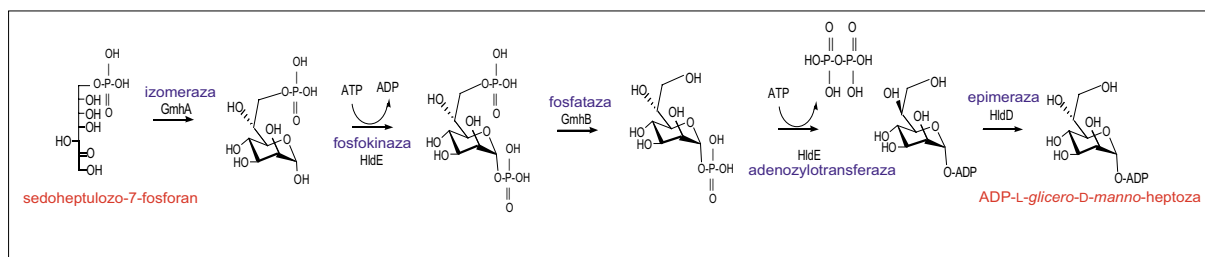
Synteza LPS rozpoczyna się od syntezy lipidu A, do którego w następnej kolejności przyłączany jest fragment polisacharydowy zbudowany z oligocukru rdzenia oraz powtarzających się podjednostek cukrowych wchodzących w skład antygeny O.

Biosynteza lipidu A zachodząca w cytoplazmie najlepiej została scharakteryzowana u *E. coli* (ryc. 2). Pierwszą jej reakcją jest acylacja cukrowego nukleotydu UDP-GlcNAc przez acylotransferazę UDP-GlcNAc (LpxA). Enzym ten jest odpowiedzialny za przenoszenie reszty kwasu mirystynowego. W reakcji bierze udział białko nośnikowe acylu z grupą funkcyjną –SH (acyl carrier protein – ACP-SH), które jest donorem reszt kwasów tłuszczowych [1,2]. W różnych szczepach białko LpxA jest odpowiedzialne za selektywne przyłączanie reszt hydroksykwasów o różnej długości, np. u *Pseudomonas aeruginosa* są podstawiane w tym miejscu reszty dziesięciowęglowe [53]. Powstały produkt: UDP-3-*O*-(acyl)-GlcNAc jest następnie przekształcany przez deacylazę UDP-(3-*O*-(*R*-3-hydroksymirystylo)-*N*-acyloglukozaminy (LpxC) w UDP-3-acyloglukozaminę [45,51], która w następnym etapie ulega deacylacji z jednoczesnym przyłączeniem do niej drugiej cząsteczki kwasu mirystynowego. Etap ten katalizowany jest przez *N*-acylotransferazę UDP-3-*O*-(3-hydroksymirystylo) glukozaminy (LpxD) [27] w wyniku czego powstaje cząsteczka UDP-2,3-diacylglukozaminy. Wysoce selektywna pirofosfataza UDP-2,3-diacylglukozaminy (LpxH) doprowadza do usunięcia UMP z substratu i powstania produktu nazywanego lipidem X (2,3-diacylglukozamino-1-fosforanem). U większości lipidów A aby powstał szkielet cukrowy musi dojść do kondensacji lipidu X z cząsteczką UDP-2,3-diacylglukozaminy i utworzenia pomiędzy nimi wiązania β (1 \rightarrow 6) glikozydowego [7,39]. Za ten etap odpowiedzialna jest syntaza disacharydowa lipidu A (LpxB). Kolejna reszta fosforanowa dołączana jest dzięki swoistej kinazie 4'tetraacylodisacharydu (LpxK), co prowadzi do powstania cząsteczki lipidu IV_A [40].

W następnej kolejności do powstałej struktury lipidu IV_A są przyłączane cząsteczki Kdo, których prekursorem jest rybulozo-5-fosforan (ryc. 2). Izomeraza arabinozo-5-fosforanu (yrbH) przekształca substrat do arabinozo-5-fosforanu [49], który w następnej reakcji katalizowanej przez swoistą syntazę (KdsA) jest przekształcany w kwas 3-*deoksy*-D-*manno*-oktulozonowy-8-fosforan (Kdo-8-fosforan) [29]. Następnie KdsC, tj. fosfataza kwasu 3-*deoksy*-D-*manno*-oktulozonowego-8-fosforanu usuwa grupę fosforanową z substratu doprowadzając do powstania cząsteczki kwasu 3-*deoksy*-D-*manno*-oktulozonowego [41], do którego następ-



Ryc. 2. Struktura i biosynteza fragmentu lipid A-Kdo₂ w *E. coli* K-12



Ryc. 3. Schemat syntezy ADP-L-glicero-D-manno-heptozy

nie syntetaza CMP-Kdo (KdsB) przyłącza CMP [42], aby możliwy był transport cząsteczki Kdo na powstały wcześniej lipid IV_A przez transferazę KdtA [6]. Białko KdtA jest odpowiedzialne za przenoszenie wszystkich obecnych w danym szczepie reszt Kdo, np. w *Haemophilus influenzae* katalizuje przeniesienie jednej cząsteczki [52], a w *E. coli* dwóch cząsteczek [11], a w *Chlamydia trachomatis* trzech cząsteczek Kdo [3]. Ostatnim etapem biosyntezy lipidu A jest dodanie kolejnych łańcuchów kwasów tłuszczowych. Za te podstawienia są odpowiedzialne dwie ACP-zależne acylotransferazy: LpxL oraz LpxM [10].

W genomach wielu bakterii Gram-ujemnych są obecne także geny odpowiedzialne za dodatkowe podstawienie fragmentu cukrowego lipidu A, np.: grupami fosforanowymi, fosfoetanolinami (P-EtN), 4-amino-4-deoksy-L-arabinozą (L-Ara4N), D-arabinozą w postaci furanozy, glukozaminą (GlcN), które nie występują w *E. coli*.

B. Biosynteza części polisacharydowej LPS

Pierwszą resztą oligocukru rdzenia LPS jest osmiowęglowa cząsteczka Kdo, która jest następnie podstawiana przez kolejne reszty cukrowe. Utworzenie kompletnej struktury lipidu A wymaga wcześniejszego podstawienia dwucukru lipidu A resztami Kdo, zanim zostaną przyłączone wszystkie reszty hydroksykwasów. Akceptorem, do którego są przyłączane kolejno pozostałe składniki oligocukru rdzenia, jest więc kompleks lipidu A ze wszystkimi obecnymi w danym szczepie cząsteczkami Kdo. Reszty Kdo są podstawiane w następnej kolejności resztami heptoz, stąd ten fragment oligocukru rdzenia nazywany jest fragmentem heptozowym. Użycie syntetycznych substratów w reakcjach *in vitro* doprowadziło do ustalenia ich konfiguracji. Swoiste heptozylotransferazy identyfikowane w większości bakterii: RfaC (WaaC) oraz RfaF (WaaF) preferują cząsteczki ADP-L,D-heptoz jako substratów do katalizowanych przez nie reakcji, co wyjaśnia rzadkie identyfikowanie reszt D, D-heptoz w lipopolisacharydach [19].

Pierwszą reakcją syntezy jest izomeryzacja sedoheptulozo-7-fosforanu do D-glicero-D-manno heptozo-1-fosforanu przez izomerazę sedoheptulozo 7-fosforanu (GmhA). Ten enzym zidentyfikowano zarówno w *E. coli* jak i *H. influenzae* [4,5]. Następnie fosfokinaza D,D-heptozo-7-fosforanowa HldE, potocznie nazywana RfaE (dwufunkcyjny enzym, który będzie także katalizować inną reakcję szlaku biosyntezy heptoz) przekształca otrzymany związek do D-glicero-D-manno-heptozo-1,7-difosforanu. Kolejnym etapem jest usunięcie grupy fosforanowej przez fosfatazę D,D-heptozo-1,7-difosforanu – GmhB w wyniku czego powstaje D-glicero-D-manno-heptozo-1-fosforan,

który następnie jest przekształcany do ADP-D-glicero-D-manno-heptozy przez adenylozylotransferazę D,D-heptozo-1-fosforanu (HldE) [28]. Ostatni etap omawianego szlaku biosyntezy, katalizowany przez epimerazę ADP-L-glicero-D-manno-heptozy GmhD (RfaD) prowadzi do powstania ADP-L-glicero-D-manno-heptozy. Gen *rfaF* jest odpowiedzialny za przyłączenie drugiej cząsteczki heptozy, a *rfaP* za podstawienia grupami fosforanowymi w wewnętrznej części oligocukru rdzenia u *Salmonella* [20]. Bakterie z mutacjami w genie *rfaD* muszą syntetyzować ADP-D-glicero-D-manno-heptozę [12]. Mutanty genów odpowiedzialnych za syntezę reszt heptoz: *rfaC*, *rfaD*, *rfaE* są związane z brakiem podstawień fragmentu lipidu IV_A-Kdo₂ resztami heptoz. W *Rhizobium etli* [8] oraz *Rhizobium leguminosarum* do fragmentu Kdo2-lipid A przyłączana jest bezpośrednio reszta mannozy. Za te podstawienia jest odpowiedzialne białko LpcC (mannozylotransferaza) [21].

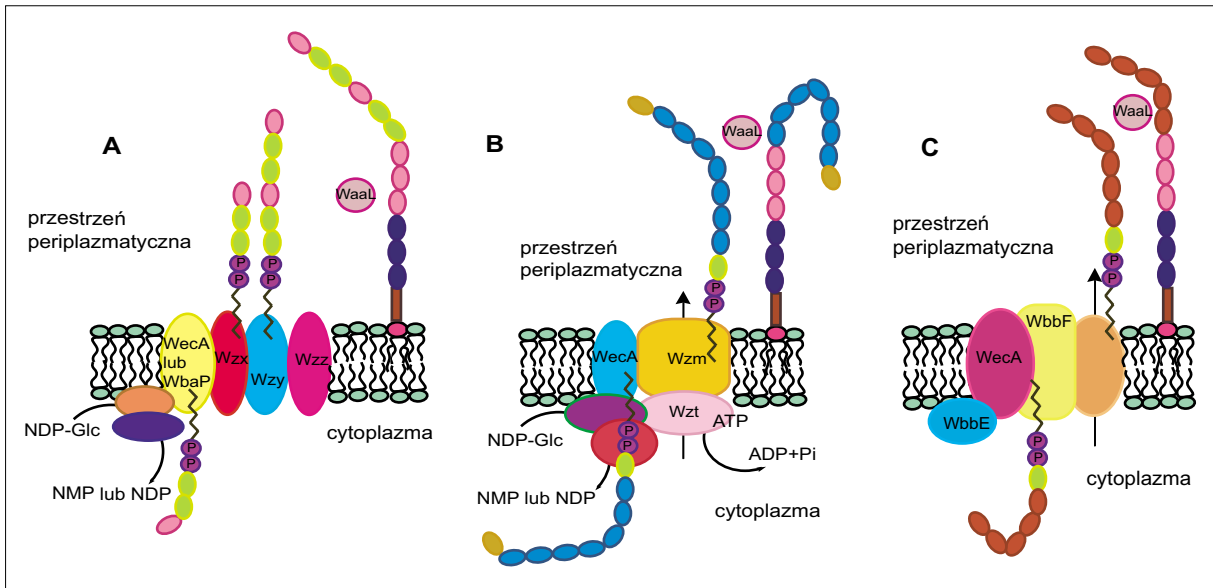
Po przyłączeniu wszystkich obecnych w danym szczepie składników siedmiowęglowych wraz z ich podstawnikami są przyłączane reszty sześciowęglowe. Glukozylowe transferazy odpowiedzialne za przyłączenie zewnętrznej części oligocukru rdzenia są peryferyjnymi, błonowymi białkami.

U wszystkich szczepów *E. coli* i *Salmonella* pierwszą resztą tego fragmentu jest reszta glukozy. Za przyłączenie UDP-glukozy jest odpowiedzialna 1,3-glukozylozylotransferaza RfaG [14]. W zależności od składników budujących ten fragment są obecne na chromosomach odpowiednie geny np. ostatnio scharakteryzowano u *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 nową dehydrogenazę (WbpA) [33].

Kolejne reszty cukrowe tworzą fragment antygeny O (S-LPS), który ma swój udział w determinowaniu wirulencji. Postaci S-LPS są typowymi strukturami obecnymi w dzikich szczepach wielu przedstawicieli bakterii Gram-ujemnych. Dotąd zidentyfikowano wiele składników cukrowych wchodzących w skład tego fragmentu LPS, a także ponad 30 składników niecukrowych. Dodatkowo bardzo często w tej części cząsteczki LPS identyfikuje się niestechiometryczne podstawienia reszt cukrowych grupami acetylowymi. Z kilkoma wyjątkami enzymy odpowiedzialne za biosyntezę tej części LPS są kodowane przez geny znane jako *rfb*. Kodują one enzymy wymagane do syntezy cukrowych prekursorów antygeny O, ich polimeryzacji oraz transportu do miejsca ligacji. Różnorodność struktur O-polisacharydowych jest związana z częstym polimorfizmem regionu *rfb*.

Transport lipopolisacharydu

Antygen O jest syntetyzowany jako odrębny polimer, który dopiero po całkowitej polimeryzacji zostaje przetrans-



Ryc. 4. Schemat transportu polisacharydowych łańcuchów na drodze: A – Wzy-zależnej, B – zależnej od transportera ABC, C – syntezozależnej

portowany do przestrzeni perioplazmatycznej, a następnie przyłączony do fragmentu lipid A-oligocukier rdzenia [32]. Powtarzające się struktury podjednostek, przyłączane zawsze do redukującego końca wzrastającego łańcucha są zebrane na cząsteczce błonowo związanego przenośnika – pochodnej alkoholu C_{55} -izoprenoidowego: fosforanu undekaprenylu (und-P), który jest także wymagany podczas syntezy peptydoglikanu czy polisacharydu otoczkowego, a liczba jego cząsteczek w komórce podlega ścisłej kontroli. W zależności od tego z jakim rodzajem antygeny O mamy do czynienia istnieją trzy drogi jego transportu na miejsce ligacji: Wzy-zależna, droga zależna od transportera ABC oraz droga syntezozależna. Pomimo różnego transportu przez błonę cytoplazmatyczną reakcje początkowe polimeryzacji są podobne.

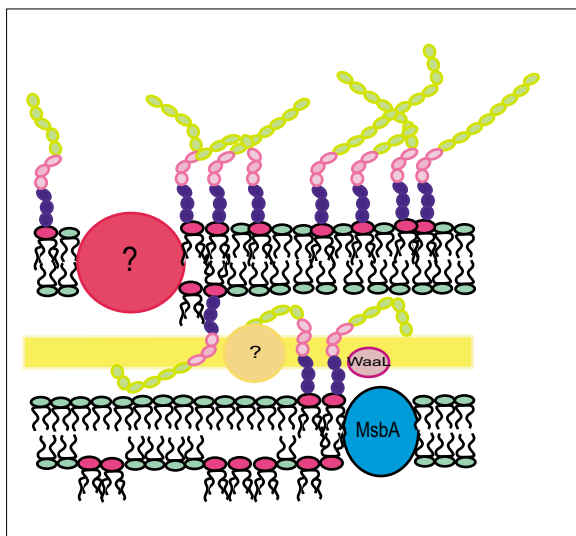
Pierwszym wspólnym krokiem wszystkich dróg jest przeniesienie reszty cukrowej (np.: UDP-Glc) na cząsteczkę aktywnego monofosforylowanego przenośnika (und-P) prowadzący do powstania und-PP-związanego cukru (np. und-PP-Glc). Energia ufosforylowanego cukru jest następnie wykorzystywana na reakcje polimeryzacji.

Droga Wzy-zależna (Wzy-dependent pathway) – transport podjednostek wchodzących w skład antygeny O na tej drodze odbywa się w przypadku struktur heteropolisacharydów, mających rozgałęzienia i to samo wiązanie pomiędzy kolejnymi przyłączanymi podjednostkami (ryc. 4A). Typowymi przykładami są O-polisacharydy z *S. enterica* serogrup: B (Typhimurium) oraz E1 (Anatum). Są one zbudowane z identycznego trisacharydowego rdzenia: Man-Rha-Gal, różniąc się między sobą resztami podstawiającymi ten trisacharyd.

Polimeryzacja antygeny O w przypadku drogi następuje w przestrzeni perioplazmatycznej dokąd muszą zostać przetransportowane pojedyncze podjednostki cukrowe powstające w cytoplazmie, co możliwe jest dzięki aktywnym cząsteczkom przenośnika und-PP, z którymi są związane, a następnie pojedynczo transportowane przez błonę cyto-

plazmatyczną. Transport odbywa się za pomocą kompleksu czterech peryferyjnie związanych membranowych białek: WbaP (lub WecA), Wzy, Wzx, Wzz. Do pierwszego białka z kompleksu: WbaP (lub WecA) są przyłączane podjednostki cukrowe z und-PP. Następnie flipaza Wzx (O-antygenowa translokaza) przenosi te cząsteczki przez błonę do przestrzeni perioplazmatycznej [17]. Po zewnętrznej stronie błony cytoplazmatycznej polimeraza O-antygenowa (Wzy) kontroluje polimeryzację łańcuchów polisacharydowych przez dodawanie kolejnych podjednostek do redukującego końca powstającego polimeru. W dalszej kolejności białko Wzz moduluje długość powstających łańcuchów [31], będąc odpowiedzialnym za czas interakcji powstającego polimeru z polimerazą Wzy. Po skończonej polimeryzacji powstały polimer jest przyłączany do kompleksu lipid A-oligocukier rdzenia przez ligazę (WaaL) a uwalniany und-P jest zwracany do aktywnej postaci monofosforylowej, do której mogą się przyłączać kolejne podjednostki cukrowe. W mutancie *wzx* podjednostki związane z und-P były akumulowane w cytoplazmie dowodząc, że właśnie to białko jest odpowiedzialne za transport tych struktur przez błonę cytoplazmatyczną. Natomiast mutanty *wzy* zawierały LPS zbudowane jedynie z połączenia lipid A-oligocukier rdzenia podstawionego jedną tylko podjednostką antygeny O (SR-LPS) [13].

Droga zależna od transportera ABC (ABC transporter-dependent pathway) – kolejny typ drogi transportu jest wykorzystywany w przypadku nierozgałęzionych O-polisacharydów do tego jeszcze będących homopolimerami np.: polimannozowe antygeny O *E. coli* O8, O9 oraz O9a (ryc. 4B). Nazwa tej drogi jest związana z białkami odpowiedzialnymi za transport powstałych polimerów do przestrzeni perioplazmatycznej przez błonę cytoplazmatyczną – tworzących tzw. transporter ABC. W skład tej kasety białek wchodzi: WecA, Wzm oraz Wzt. Dzięki nim możliwy jest transport związanych z und-P polimerów cukrowych. Polimeryzacja następuje w cytoplazmie skąd powstały polimer jest transportowany do miejsca ligacji. Proces rozpoczyna się od połączenia pierwszej reszty



Ryc. 5. Schemat transportu cząsteczek LPS przez ścianę komórkową u bakterii Gram-ujemnych

cukrowej podjednostki z cząsteczką nośnika, którym jest jak poprzednio und-P. Powstaje tzw. prekursor, do którego jest przyłączana kolejna cząsteczka cukrowa nazywana adaptorem. Dopiero po tym etapie następuje przyłączenie ściśle określonej liczby podjednostek cukrowych np. mannozowych. Ta droga transportu wykorzystywana jest także przez szczepy zawierające niecukrowe podstawniki. Białka Wzt (ATP-aza) oraz Wzm poprzez interakcje tworzą kanał, przez który odbywa się transport powstałych polimerów do przestrzeni periplazmatycznej, gdzie WaaL doprowadza do ich ligacji z fragmentem lipid A oligocukier rdzenia.

Droga syntazozależna (synthase-dependent pathway) – jedynym dotąd poznany przykładem trzeciej drogi transportu jest O-polisacharyd z serowaru Borreze *S. enterica* [25] (ryc. 4C). Antygen O jest zbudowany z: GlcNAc (promotor), ManNAc (adaptor) oraz reszt poli-N-acetylomanozaminowych. Białkami przenoszącymi powstały w cytoplazmie homopolimer są aktywne, swoiste syntazy mające powinowactwo do powstających polimerów. Droga ta w początkowym etapie jest identyczna z transportem ABC-zależnym ponieważ rozpoczyna się od udziału WecA, białka kontrolującego połączenia cząsteczki GlcNAc z und-P. Do tego kompleksu następnie jest przyłączana reszta adaptora a reakcja jest katalizowana przez glikozylotransferazę WbbE. Następnie WbbF jest odpowiedzialna za polimeryzację. Syntazy są błonowymi białkami i katalizują reakcję polimeryzacji, jednocześnie eksportując polisacharydowy łańcuch przez błonę wewnętrzną [26]. Tak jak w ABC-

zależnej drodze produktem drogi syntazowej jest ligowany do lipidu A połączony z oligocukrem rdzenia a cała reakcja katalizowana jest przez ligazę WaaL.

Całkowita struktura cząsteczki LPS powstaje w przestrzeni periplazmatycznej komórki bakteryjnej, gdzie następuje połączenie jej poszczególnych fragmentów: lipidu A oraz polisacharydu. Wszystkie substraty wymagane do syntezy fragmentów ulegających ligacji są syntetyzowane w cytoplazmie, skąd następnie muszą zostać przetransportowane do miejsca ligacji, a więc przez błonę cytoplazmatyczną. Część lipidowa z fragmentem oligocukru rdzenia transportowana jest za pomocą jednego z białek transportera ABC błony cytoplazmatycznej nazywanego MsbA [15,54].

Białko to składa się z sześciu transmembranowych helis, między którymi występuje duża przestrzeń, wyłożona zasadowymi resztami, przez którą mogą przemieszczać się cząsteczki lipidu A i/lub fosfolipidów [38]. Nie wiadomo na jakiej zasadzie są transportowane te cząsteczki choć wydaje się bardzo prawdopodobne, że MsbA jest flipazą. Jednym z dowodów na wykazanie ważnej roli MsbA było wykorzystanie mutantów w genie *lpxL*, odpowiedzialnym za syntezę dodatkowych łańcuchów hydroksykwasów w lipidzie A. U tych mutantów, pomimo niekompletnej struktury lipidu A, białko MsbA spełniało swoją funkcję poniżej temperatury 42°C. Dodatkowe potwierdzenie ważnej funkcji MsbA było możliwe przez analizę mutantu WD2 *E. coli*, u którego w temperaturze 44°C dochodziło do inaktywacji transportu lipidu A oraz fosfolipidów prowadząc równocześnie do inaktywacji całej komórki bakteryjnej [16]. Poniżej tej temperatury transport cząsteczek nie był hamowany. Wiadomo również, że komórki bakteryjne pozbawione genu *msbA* u *E. coli* są letalne.

Wciąż nie zidentyfikowano białka (lub białek) odpowiedzialnego za transport kompletnych cząsteczek LPS przez przestrzeń periplazmatyczną oraz błonę zewnętrzną. Najprawdopodobniej transport ten odbywa się poprzez dyfuzję poprzeczną (transport flip-flop), polegającą na powolnym przemieszczaniu się cząsteczek z jednej powierzchni błony na drugą.

Jedynie u *Neisseria meningitidis* wykazano, że białko Omp85, które jest jednym z konserwatywnych białek błony zewnętrznej większości bakterii Gram-ujemnych jest odpowiedzialne za transport LPS przez zewnętrzną błonę. Po raz pierwszy przedstawiono, że gen *omp85* jest transkrybowany z genami odpowiedzialnymi za biosyntezę lipidu A. Udowodniono także, że obecność tego białka jest niezbędna do przeżycia bakterii ponieważ akumulacja dużej ilości ujemnie naładowanych grup w periplazmie związana z brakiem transportu LPS na zewnątrz błony, prowadzi do śmierci komórki bakteryjnej [18].

PIŚMIENICTWO

- [1] Anderson M.S., Bulawa C.E., Raetz C.R.H.: The biosynthesis of Gram-negative endotoxin. formation of lipid A precursors from UDP-GlcNAc in extracts of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., 1985; 260: 15536–15541
- [2] Anderson M.S., Bull H.G., Galloway S.M., Kelly T.M., Mohan S., Radica K., Raetz C.R.H.: UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase of *Escherichia coli*. The first step of endotoxin biosynthesis is thermodynamically unfavorable. J. Biol. Chem., 1993; 268: 19858–19865
- [3] Belunis C.J., Mdluli K.E., Raetz C.R.H., Nano F.E.: A novel 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase from *Chlamydia trachomatis* required for expression of the genus-specific epitope. J. Biol. Chem., 1992; 267: 18702–18707
- [4] Brooke J.S., Valvano M.A.: Biosynthesis of inner core lipopolysaccharide in enteric bacteria identification and characterization of a conserved phosphoheptose isomerase. J. Biol. Chem., 1996A; 271: 3608–3614

- [5] Brooke J.S., Valvano M.A.: Molecular cloning of the *Haemophilus influenzae gmhA (lpcA)* gene encoding a phosphoheptose isomerase required for lipopolysaccharide biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 1996B; 178L: 3339–3341
- [6] Brozek K.A., Hosaka K., Robertson A.D., Raetz C.R.H.: Biosynthesis of lipopolysaccharide in *E. coli*. cytoplasmic enzymes that attach 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid to lipid A. *J. Biol. Chem.*, 1989; 264: 6956–6966
- [7] Bulawa C.E., Raetz C.R.H.: The biosynthesis of Gram-negative endotoxin. identification and function of UDP-2,3-diacetylglucosamine in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 1984; 259: 4846–4851
- [8] Carlson R.W., Reuhs B., Chen T., Bhat U.R., Noel K.D.: Lipopolysaccharide core structures in *Rhizobium elii* and mutants deficient in O-antigen. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 11783–11788
- [9] Carty S.M., Sreekumar K.R., Raetz C.R.H.: Effect of cold shock on lipid A biosynthesis in *E. coli*. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 9677–9685
- [10] Clementz T, Bednarski J. J, Raetz C. R. H.: 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
- [11] Clementz T, Raetz C.R.H.: A Gene Coding for 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase in *E. coli*. Identification, mapping, cloning, and sequencing. *J. Biol. Chem.*, 1991; 266: 9687–9696
- [12] Coleman W.G.: The *rfaD* gene codes for ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase. An enzyme required for lipopolysaccharide core biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 1983; 258: 1985–1990
- [13] Collins L.V., Hackett J.: Molecular cloning characterization, and nucleotide sequence of the *rfaC* gene which encodes an O-antigen polymerase. *J. Bacteriol.*, 1991; 173: 2521–2529
- [14] Creeger E.S., Rothfield L.I.: Cloning of genes for bacterial glycosyltransferases. *J. Biol. Chem.*, 1979; 254: 804–810
- [15] Doerrler W.T., Raetz C.R.H.: ATP-ase activity of the MsbA lipid flippase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 36697–36705
- [16] Doerrler W., Reedy M., Raetz C.R.H.: An *Escherichia coli* mutant defective in lipid export. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 11461–11464
- [17] Feldman M.F., Marolda C.L., Monteiro M.A., Perry M.B., Parodi A.J., Valvano M.A.: The activity 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
- [18] Genevrois S., Steeghs L., Roholl P., Letesson J.J., Ley P.: The Omp85 protein of *Neisseria meningitidis* is required for lipid export to the outer membrane. *EMBO*, 2003; 22: 1780–1789
- [19] Gronow W.S., Brabetz W., Brade H.: Comparative functional characterization *in vivo* of heptosyltransferase I (*Waac*) and II (*WaaF*) from *E. coli*. *J. Bacteriol.*, 2000; 267: 6602–6611
- [20] Jousimies H., Makela P.H.: Genetic analysis of *Salmonella minnesota* R mutants with defects in the biosynthesis of the lipopolysaccharide core. *J. Bacteriol.*, 1974; 119: 753–759
- [21] Kanipes M.I., Ribeiro A.A., Lin S.L., Cotter R.J., Raetz C.R.H.: A mannosyl transferase required for lipopolysaccharide inner core assembly in *Rhizobium leguminosarum*. Purification, substrate specificity, and expression in *Salmonella waac* mutants. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 16356–16364
- [22] Kastowsky M., Sabisch A., Gutberlet T., Bradaczek H.: Molecular modeling of the three-dimensional structure and conformational flexibility of bacterial lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.*, 1992; 174: 4798–4806
- [23] Kawasaki S., Moriguchi R., Sekiya K., Nakai T., Ono E., Kume K., Kawahara K.: The cell envelope structure of the lipopolysaccharide-lacking Gram-negative bacterium *Sphingomonas paucimobilis*. *J. Bacteriol.*, 1994; 176: 284–290
- [24] Kawahara K., Moll H., Knirel Y.A., Seydel U., Zähringer U.: Structural analysis of two glycosphingolipids from the lipopolysaccharide-lacking bacterium *Sphingomonas capsulata*. *Eur. J. Biochem.*, 2000; 267: 1837–1846
- [25] Keenleyside W.J., Whitfield C.: Lateral Transfer of *rfaB* Genes: A mobilizable ColE1-type plasmid Carries the *rfaO*: 54 (O: 54 antigen biosynthesis) gene cluster from *Salmonella enterica* serovar Borreze. *J. Bacteriol.*, 1995; 177: 5247–5253
- [26] Keenleyside W.J., Whitfield C.: A Novel pathway for O-polysaccharide biosynthesis in *Salmonella enterica* serovar Borreze. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 28581–28592
- [27] Kelly T.M., Stachula S.A., Raetz C.R.H., 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
- [28] Kneidinger B., Marolda C., Graninger M., Zamyatina A., McArthur F., Kosma P., Valvano M.A., Messner P.: Biosynthesis pathway of ADP-L-glycero-β-D-manno-heptose in *E. coli*. *J. Bacteriol.*, 2002; 184: 363–369
- [29] 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(2): 297–306
- [30] Krziwon C., Zähringer U., Kawahara K., Weidemann B., Kusumoto S., Rietschel E.T., Flad H.D., Ulmer A.J.: Glycosphingolipids from *Sphingomonas paucimobilis* induce monokine production in human mononuclear cells. *Infect. Immun.*, 1995; 63: 2899–2905
- [31] Liu D., Cole R.A., Reeves P.R.: An O-antigen processing function for *wzx (rfaX)*: A promising candidate for O-unit flippase. *J. Bacteriol.*, 1996; 178: 2102–2107
- [32] McGrath B.C., Osborn M.I.: Localization of the terminal steps of O-antigen synthesis in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 1991; 173: 649–654
- [33] Miller W.L., Wenzel C.Q., Daniels C., Larocque S., Brisson J.R., Lam J.S.: Biochemical characterization of WbpA, a UDP-N-acetyl-D-glucosamine 6-dehydrogenase involved in O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Biol. Chem.*, 2004 (w druku)
- [34] Müller-Loennies S., Brade L., Brade H.: Chemical structure and immunoreactivity of the lipopolysaccharide of the deep rough mutant I-69 rd/b* of *Haemophilus influenzae*. *Eur. J. Biochem.*, 2002; 269: 1237–1242
- [35] Niedziela T., Lukasiewicz J., Jachymek W., Dzieciatkowska M., Lugowski C., Kenne L.: Core oligosaccharides of *Plesiomonas shigelloides* O54: H2 (strain CNCTC 113/92). Structural and serological analysis of the lipopolysaccharide core region, the O-antigen biological repeating unit, and the linkage between them. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 11653–11663
- [36] Nikaido H.: Molecular basic of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2003; 67: 593–656
- [37] Raetz C.R.H., Whitfield C.: Biochemistry of endotoxin. *Annu. Rev. Biochem.*, 1990; 59: 129–170
- [38] Raetz C.R.H., Whitfield C.: Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.*, 2002; 71: 635–700
- [39] Ray B.L., Painter G., Raetz C.R.H.: The biosynthesis of Gram-negative endotoxin. Formation of lipid A disaccharide from monosaccharide precursors in extracts of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 1984; 259: 4852–4859
- [40] Ray B.L., Raetz C.R.H.: The biosynthesis of Gram-negative endotoxin. A novel kinase in *Escherichia coli* membranes that incorporates the 4'-phosphate of lipid A. *J. Biol. Chem.*, 1987; 262: 1122–1128
- [41] Ray P.H.: Purification and characterization of 3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthetase from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1980; 141: 635–644
- [42] Ray P.H., Benedict C.D.: Purification and characterization of specific 3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate phosphatase from *Escherichia coli* B. *J. Bacteriol.*, 1980; 142: 60–68
- [43] Rietschel E.T., Brade H., Holst O., Brade L.: Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. In: Pathology of septic shock. Eds.: Rietschel E.T., Wagner H., Springer-Verlag. Berlin – Heidelberg – New York, 1996; 40–81
- [44] Severn W.B., Kelly R.F., Richards J.C., Whitfield C.: Structure of the core oligosaccharide in the serotype O8 lipopolysaccharide from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, 1996; 178: 1731–1741
- [45] Sorensen P.G., Lutkenhaust J., Yoning K., Eveland S.S., Anderson M.S., Raetz C.R.H.: 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
- [46] Vinogradov E., Egbosimba E.E., Perry M.B., Lam J.S., Forsberg C.W.: Structural analysis of the carbohydrate components of the outer membrane of the lipopolysaccharide-lacking cellulolytic remnant bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85. *Eur. J. Biochem.*, 2001; 268: 3566–3576
- [47] Vinogradov E., Korenevsky A., Beveridge T.J.: The structure of the rough-type lipopolysaccharide from *Shevanelia oneidensis* MR-1 containing 8-amino-8-deoxy-Kdo and an open-chain from 2-acetamido-2-deoxy-D-galactose. *Carbohydr. Res.*, 2003; 338: 1991–1997
- [48] Vinogradov E., Korenevsky A., Beveridge T.J.: The structure of the core region of the lipopolysaccharide from *Shevanelia algae* BrY, containing 8-amino-3,8-dideoxy-D-manno-oct-2-ulonic acid. *Carbohydr. Res.*, 2004; 339: 737–740
- [49] Volk W.A.: Purification and properties of phosphorabinoisomerase from *Propionibacterium pentosaceum*. *J. Biol. Chem.*, 1960; 235: 1550–1553

- [50] Vorachnek-Warren M.K., Carty S.M., Lin S., Cotter R.J., Raetz C.R.H.: An *Escherichia coli* mutant lacking the cold shock-induced palmitoleotransferase of lipid A biosynthesis. absence of unsaturated acyl chains and antibiotic hypersensitivity at 12°C. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 14186–14186
- [51] 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. *PNAS*. 2003; 100: 8146–8150
- [52] White K.A., Kaltashov I.A., Cotter R.J., Raetz C.R.H.: A mono-functional 3-*deoxy*-D-*manno*-octulosonic acid (Kdo) transferase and a Kdo kinase in extracts of *Haemophilus influenzae*. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 16555–16563
- [53] Wyckoff T.J.O., Lin S., Cotter R.J., Dotson G.D., Raetz C.R.H.: Hydrocarbon rulers in UDP-*N*-acetylglucosamine acyltransferases. *J. Biol. Chem.*, 1998; 73: 32369–32372
- [54] Zhou Z., White K.A., Polissi A., Georgopoulos C., Raetz C.R.H.: Functional of *Escherichia coli* MsbA, an essential ABC family transporter, in lipid A and phospholipid biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 12466–12466