

革兰氏阴性细菌脂多糖分子 Kdo₂-lipid A 基团的结构修饰

王小元

江南大学, 食品科学与技术国家重点实验室, 无锡 214122

摘要:在大多数革兰氏阴性细菌中, 脂多糖分子的 Kdo₂-lipid A 基团是构成其外膜外层的主要成分。一些细菌通过修饰其脂多糖分子的 Kdo₂-lipid A 基团来适应新的生存环境。Kdo₂-lipid A 在细胞内膜内层合成, 被连上核心糖并翻转到内膜外层, 再连上 O-抗原重复单元, 形成脂多糖分子。Kdo₂-lipid A 可以通过 TLR4 受体激活先天性免疫系统, 所以其结构修饰机制的研究有助于开发新的细菌疫苗和疫苗佐剂。

关键词:革兰氏阴性菌, 脂多糖, Kdo₂-lipid A, 内毒素, 疫苗佐剂

中图分类号:Q936 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2013)02-0111-07

革兰氏阴性细菌细胞外膜的主要组分脂多糖, 俗名内毒素, 主要由 Kdo₂-lipid A、核心糖和 O-抗原重复单元三部分组成, 其中 Kdo₂-lipid A 基团是内毒素的主要活性成分^[1]。在革兰氏阴性细菌的模式菌株大肠杆菌中, Kdo₂-lipid A 含有 2 个 Kdo、2 个氨基葡萄糖、2 个磷酸基团和 6 条脂肪酸链(图 1)。一些细菌的 Kdo₂-lipid A 分子结构会被修饰^[2]; 这些修饰主要发生在细菌内膜的外侧或外膜。有些情况下, Kdo₂-lipid A 修饰酶的表达及其活性受环境因素调控, 如 pH 变化、二价阳离子浓度改变或抗菌肽的存在等。

革兰氏阴性病原菌侵入宿主后会释放其表面的脂多糖分子^[3]。这些脂多糖分子的 Kdo₂-lipid A 基团可被免疫细胞表面的 TLR4 识别, 在细胞内引发一系列生化反应, 产生多种细胞因子。细胞因子的种类和数量取决于 Kdo₂-lipid A 的精细结构。有些细胞因子的过量积累能够引起严重的内毒素休克; 而有些细胞因子的适量产生可以加强宿主的

先天性免疫能力。所以, 研究 Kdo₂-lipid A 的修饰机制有助于优化其结构来开发新型的细菌疫苗和佐剂。

1 大肠杆菌 Kdo₂-lipid A 的组成型生物合成途径

大肠杆菌中 Kdo₂-lipid A 的合成主要发生在细胞质和内膜内层, 先后需要由 9 个酶催化的 9 步反应(图 1)。基因进化研究表明这 9 个酶具有较高的保守性, 存在于大多数变形杆菌中^[4]。反应起始底物是水溶性的小分子 UDP-氨基葡萄糖乙酸酐(UDP-GlcAc)。前 3 步反应分别由可溶性蛋白酶 LpxA、LpxC 和 LpxD 催化, 导致在 UDP-GlcAc 分子上加了 2 条脂肪酸链; 接着膜外周蛋白酶 LpxH 将 UDP-GlcAc 的 UDP 分解, 形成 Lipid X 分子。LpxA 和 LpxD 存在 45% 的序列相似性, 有类似的三聚体结构, 但存在不同的四级结构和活性位点^[5-6]。因

基金项目:国家“973 项目”——国家重点基础研究发展计划(2012CB725202); 国家自然科学基金(31170069)

作者简介:王小元(1965-), 男, 山西垣曲人, 伦敦大学博士, 江南大学教授。Tel: +86-510-85329329; Fax: +86-510-85329236; E-mail: xwang@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2012-09-10; **修回日期:**2012-11-13

为 LpxA 催化的第 1 步反应是可逆的, 所以 LpxC 催化的第 2 步反应成为 Kdo₂-lipid A 合成的第一个关键步骤, 决定着其合成效率。第 5 步反应由膜外周蛋白酶 LpxB 将 Lipid X 及其前体聚合; 接着磷酸激酶 LpxK 在 4' 位上加了 1 个磷酸基团, 形成 Lipid IV_A 分子。第 7 步反应由膜蛋白 KdtA 在 Lipid IV_A 分子的 6' 位上连续加 2 个 Kdo 基团; 最后膜蛋白 LpxM 和 LpxL 先后在 2' 和 3' 位上分别加上 1 个二级脂肪

酸链, 形成 Kdo₂-lipid A 分子 (图 1)。位于细菌细胞内膜内层 Kdo₂-lipid A 被连上核心寡糖, 形成核心多糖-lipid A。核心多糖-lipid A 从内膜的内侧转运到内膜的外侧, 连上 O-抗原重复单元, 最终形成脂多糖分子并被转运到外膜的外侧。脂多糖分子通过影响细菌细胞外膜的完整性来决定细菌的存亡, 所以其合成和转运过程中所涉及到的各种关键蛋白成为抗菌素研究的靶点^[7]。

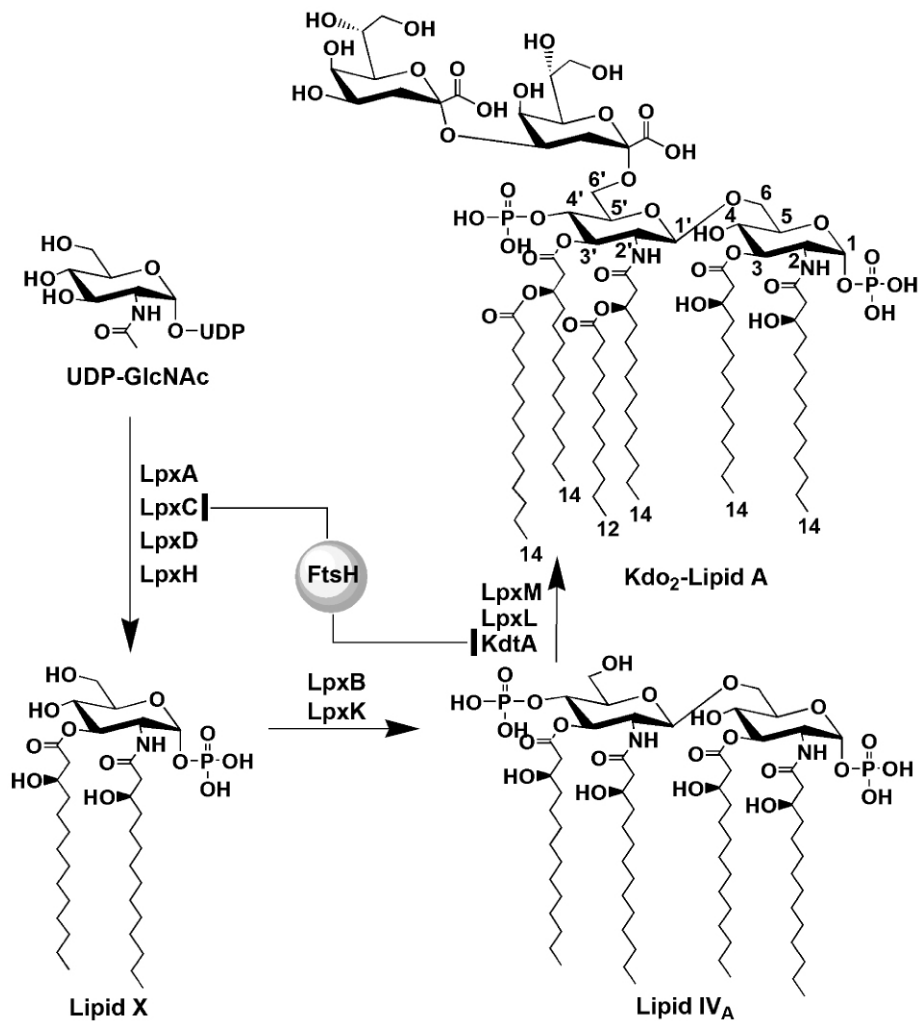


图 1 大肠杆菌 Kdo₂-lipid A 保守的生物合成途径

Fig. 1 The constitutive pathway for Kdo₂-lipid A biosynthesis in *E. coli*. LpxA, LpxC and LpxD are soluble cytoplasmic proteins, whereas LpxH and LpxB are peripheral membrane proteins. LpxK, KdtA, LpxL and LpxM are integral inner membrane proteins, the active sites of which face the cytoplasm. LpxC and KdtA could be degraded by FtsH when too much LPS were synthesized. The numbers around the glucosamine backbone specify the glucosamine ring positions of lipid A. The numbers at the end of acyl chains indicate the predominant fatty acid chain lengths.

作为细胞外膜的主要组成部分, 数量过高会对细胞膜的稳定性产生影响, 所以 Kdo₂-lipid A 的合

成效率受到膜蛋白降解酶 FtsH 的调控^[8]。当细胞膜内 Kdo₂-lipid A 过量时, FtsH 通过降解关键酶

LpxC 和 KdtA 来降低其合成速度^[9]。

2 革兰氏阴性菌中 Kdo₂-lipid A 修饰系统的调控机制

为适应不断变化的外界环境,一些革兰氏阴性细菌进化出参与 Kdo₂-lipid A 结构修饰的二元调控系统 PhoP-PhoQ 和 PmrA-PmrB^[10]。PhoP-PhoQ 二元调控系统中,PhoQ 是位于细胞膜上的感受蛋白,而 PhoP 是位于细胞质内的响应蛋白。PhoQ 可以感受环境中阳离子抗菌肽、低 pH 和低浓度的二价阳离子等,导致 PhoP 的磷酸化。磷酸化的 PhoP 结合在一些染色体基因的启动子上激活或抑制这些基因的转录。PmrA-PmrB 二元调控系统中,PmrB 是位于细胞膜上的感受蛋白,而 PmrA 是位于细胞质内的响

应蛋白。PmrB 可以感受环境中高浓度的 Fe³⁺ 和低 pH,并通过 PmrA 激活特定基因的转录。PhoP-PhoQ 系统和 PmrA-PmrB 系统均可以直接激活一些基因的转录来修饰 Kdo₂-lipid A 的结构。在沙门氏菌中,PhoP-PhoQ 系统可以通过激活蛋白 PmrD 来激活 PmrA-PmrB 系统;而在大肠杆菌中,PmrD 因功能失活而不能激活 PmrA-PmrB 系统^[11]。

3 Kdo₂-lipid A 基团疏水部分脂肪酸链的修饰

大肠杆菌 Kdo₂-lipid A 通常在 2、3、2' 和 3' 位含有 6 条脂肪酸链,其中 2 条为二级脂肪酸链(图 1)。但是,一些革兰氏阴性细菌通过改变其 Kdo₂-lipid A 中脂肪酸链的数目和长度来适应其生存环境(表 1)。

表 1 革兰氏阴性细菌中 Kdo₂-lipid A 的结构修饰酶

Table 1 Enzymes involved in the structural modification of Kdo₂-Lipid A in Gram-negative bacteria

Positions	Enzymes	Functions
2'	LpxXL	Incorporate a very long fatty acid chain in place of the secondary laurate chain normally added by LpxL ^[12]
2'	LpxP	Incorporate a palmitoleoyl moiety into nascent lipid A in place of the secondary laurate chain normally added by LpxL ^[13]
2 or 2'	LpxD2	Add a shorter 3-OH fatty acid group to 2 or 2' position at low temperature ^[14]
3'	LpxO	Add an OH group to the secondary fatty acid chain at 3' position ^[15]
3'	LpxR	Remove the 3'-acyloxyacyl moiety ^[16]
2	PagP	Transfer a palmitate to the primary fatty acid chain at 2-position ^[18]
3	PagL	Remove the 3-O-linked acyl chain ^[20]
1	LpxE	Remove the 1-phosphate group ^[22]
4'	LpxF	Remove the 4'-phosphate group ^[30]
1	LpxT	Transfer a phosphate group to the 1-phosphate ^[25]
1	LpxQ	Oxidize the proximal glucosamine to form an aminogluconate unit ^[24]
1	LmtA	Catalyze the methylation of the 1-phosphate ^[26]
1	EptA	Add a phosphoethanolamine to 1-position ^[27]
1 or 4'	EptC	Modify the 1 or 4' position of lipid A and the flagellar rod protein FlgG with a phosphoethanolamine residue ^[29]
1 or 4'	AmT	Transfer the L-Ara4N unit to the 1 or 4' position ^[32]
Kdo	RgtA	Add a GalA moiety to the distal unit of Kdo ^[36]
Kdo	RgtB	Add a GalA moiety to the distal unit of Kdo ^[36]
Kdo	EptB	Add a phosphoethanolamine to the distal unit of Kdo ^[37]

固氮菌 Kdo₂-lipid A 的 2' 位上有 1 条由 LpxXL 加上的超长的次级脂肪酸,有利于其生存在豆科植物根部^[12]。在低温条件下,大肠杆菌中的 LpxP^[13] 取代 LpxL 在 Kdo₂-lipid A 的 2' 位上加了 1 条不饱和 C16 次级脂肪酸,而弗朗西斯菌中的 LpxD2^[14] 取代 LpxD1 在 Kdo₂-lipid A 的 2 和 2' 位上加了 1 条较短的 3-OH 脂肪酸。在有氧条件下,沙门氏菌细胞内膜上的酶 LpxO 以 Fe²⁺ 和 α-酮戊二酸为辅助因子在 3' 位的次级脂肪酸链上引入 1 个羟基^[15]。在存在

Ca²⁺ 的情况下,在大肠杆菌中表达沙门氏菌 LpxR 可以去掉 Kdo₂-lipid A 分子 3' 位上的脂肪酸链^[16]; 幽门螺旋杆菌中也存在 LpxR,因而能产生一种具有低免疫活性的含有 4 条脂肪酸链的 Kdo₂-lipid A^[17]。

沙门氏菌中位于细胞外膜的酰基转移酶 PagP 可以将磷脂的 C16 脂肪酸链转移到 Kdo₂-lipid A 的 2 位脂肪酸链上,形成 1 条次级脂肪酸链。PagP 产生的含有 7 条脂肪酸链的 Kdo₂-lipid A 可以干扰

TLR4 的识别,并使细菌对阳离子抗菌肽产生抗性^[18]。PagP 蛋白结构中有 8 个跨膜的 β 折叠组成的折叠筒,处于筒底部的氨基酸 Gly88 决定了其转移的脂肪酸链的长度。PagP 的活性位点朝向细胞外膜外侧^[19],通常情况下 PagP 在细胞膜中表达水平低且没有活性。当外膜外层结构遭到破坏而外膜渗透性增加时,外膜内层的磷脂会向外膜外侧转运,为 PagP 提供脂肪酸供体,同时 PagP 被迅速激活,改变 Kdo₂-lipid A 的结构来快速修复外膜。PagP 的转录水平受 PhoP-PhoQ 调控。PagL 是细胞外膜上的一种脱酰基酶,能特异性地水解去除 Kdo₂-lipid A 分子 3 位上的脂肪酸链,使其不被 TLR4 识别,有利于细菌躲避宿主免疫系统的攻击^[20]。PagL 的蛋白结构与 PagP 类似,也受 PhoP-PhoQ 二元系统和细菌外膜渗透性的调控。

4 Kdo₂-lipid A 亲水部分基团的修饰

大肠杆菌 Kdo₂-lipid A 亲水部分主要由 1 和 4' 位的磷酸基团和 6' 位的 Kdo 基团构成(图 1)。革兰氏阴性细菌进化出各种酶来共价修饰这些基团,从而改变 Kdo₂-lipid A 分子的疏水性(表 1)。

许多修饰酶的催化位点在 Kdo₂-lipid A 分子 1 位上,因为 1 位磷酸基团所带负电荷与膜的稳定性密切相关。弗朗西斯菌 LpxE 能特异性地去除大肠杆菌 Kdo₂-lipid A 分子 1 位上的磷酸基团^[21-22]。LpxE 的同源基因在根瘤菌和幽门螺旋杆菌中也有发现^[23]。有氧条件下根瘤菌外膜蛋白 LpxQ 可以在 LpxE 脱 1 位磷酸的基础上将氨基葡萄糖转变为 2-氨基葡萄糖酸^[24]。LpxT 利用十一异戊烯醇焦磷酸为供体在 Kdo₂-lipid A 基团 1 位磷酸基团上添加第二个磷酸基团形成焦磷酸结构,其活性受 PmrA 的负调控,并间接促进 EptA 的作用^[25]。钩端螺旋体中 LmtA 可以将 S-腺苷甲硫氨酸的甲基转移至 Kdo₂-lipid A 的 1 位磷酸基团上^[26]。沙门氏菌 EptA 在 Kdo₂-lipid A 基团的 1 位磷酸基团上添加磷酸乙醇胺^[27],其表达受 PmrA-PmrB 二元系统调控。幽门螺旋杆菌 EptA 在 Kdo₂-lipid A 分子的 1 位上用磷酸乙醇胺取代了原来的磷酸基团^[28]。幽门螺旋杆菌中还存在一个具有双重功能的 EptC,它不仅

Kdo₂-lipid A 分子的 1 位或 4' 上加磷酸乙醇胺,而且在鞭毛蛋白 FlgG 也能添加磷酸乙醇胺^[29]。

Kdo₂-lipid A 分子 4' 位的磷酸基团可以被在弗朗西斯菌发现的磷酸酶 LpxF 特异性地去除^[30]。LpxF 缺失突变的弗朗西斯菌不再具有侵袭小鼠的能力,说明 Kdo₂-lipid A 分子结构的修饰与细菌的致病能力密切相关^[31]。

ArnT 将 L-Ara4N 从特定供体转移至 Kdo₂-lipid A 1 位或 4' 位的磷酸基团上。L-Ara4N 的合成与转移涉及到受 PmrA-PmrB 系统调控的 *arn* 操纵子和 *udg* 基因。操纵子 *arn* 含有的七个结构基因 *arnBCADTEF*,依次编码 7 种酶 ArnB、ArnC、ArnA、ArnD、ArnT、ArnE 和 ArnF。基因 *udg* 编码的 Ugd 将 UDP-葡萄糖催化成 UDP-葡萄糖醛酸,而后 ArnA、ArnB、ArnC、ArnD 的连续作用将其转变成十一异戊烯醇磷酸- α -L-4-氨基阿拉伯糖(UDP-P- α -L-Ara4N),再经 ArnE 和 ArnF 转运至细胞内膜外侧,并由 ArnT 催化将 L-Ara4N 基团转移到 Kdo₂-lipid A 分子上^[32]。ArnT 催化的 4' 位磷酸基团上 L-Ara4N 的添加需要 3' 位次级脂肪酸链的存在。弗朗西斯菌的 1 位磷酸基团被半乳糖胺基团用同样的机制所修饰,ArnC 的同源基因 FLmF1 和 FLmF2 参与半乳糖胺基团供体十一异戊烯醇磷酸- β -D-半乳糖胺的合成,ArnT 的同源蛋白 FlmK 催化完成半乳糖胺基团的转移^[33]。沙门氏菌 Kdo₂-lipid A 分子上 L-Ara4N 的存在可以抑制 PagL 的活性^[34]。PagL 细胞外侧一些特定的氨基酸序列可以识别 L-Ara4N 修饰的 Kdo₂-lipid A,而活性位点之间相互结合形成二聚体可能是 PagL 失活的原因^[35-36]。

Kdo₂-lipid A 分子上的 Kdo 基团也可以被修饰。如固氮菌中 RgtA 和 RgtB 可以分别在 Kdo₂-lipid A 分子上的外 Kdo 基团上加上一个半乳糖醛酸(GalA)^[36];大肠杆菌中 EptB 也可以在 Kdo₂-lipid A 分子上的外 Kdo 基团上加上一个磷酸乙醇胺^[37]。

5 Kdo₂-lipid A 结构修饰的应用前景

Kdo₂-lipid A 一方面能够通过 TLR4 刺激宿主先天性免疫系统,另一方面在维持革兰氏阴性细菌细胞外膜渗透性和完整性中起主要作用。因此,

Kdo₂-lipid A 分子结构修饰与细菌在不同条件下的生存能力密切相关。Kdo₂-lipid A 的合成及结构修饰的研究在以下几个方面具有应用前景。

首先, Kdo₂-lipid A 结构修饰的研究可为细菌疫苗和疫苗佐剂的开发奠定基础。Kdo₂-lipid A 是一种很好的免疫系统激活因子, 因此一方面可以通过优化其结构开发疫苗佐剂, 另一方面可以将一些革兰氏阴性病原菌的 Kdo₂-lipid A 结构优化来开发减毒疫苗^[38]。其次, 通过修饰酶工具定向改造 Kdo₂-lipid A 结构, 改善革兰氏阴性工业生产菌的细胞膜通透性, 提高其生产效率。再次, 因为 Kdo₂-lipid A 结构修饰酶多为膜蛋白, 其活性位点大多暴露内外膜的两侧, 所以可以用来标记新合成的分子的跨膜转运过程。最后, 由于 Kdo₂-lipid A 是细菌细胞生存所必需的, 其关键合成酶和修饰酶可以作为靶点来开发相应的抗菌素或内毒素抑制剂。

参考文献

- [1] Wang X, Quinn PJ. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Progress in Lipid Research*, 2010, 49: 97-107.
- [2] Chen J, Li Y, Wang X. Structure modification of lipid A in bacteria. *Microbiology China*, 2010, 37: 1685-1691. (in Chinese)
陈久洲, 李焱, 王小元. 细菌类脂 A 的结构修饰及其应用前景. *微生物学通报*, 2010, 37: 1685-1691.
- [3] Ellis TN, Kuehn MJ. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiology Molecular Biology Review*, 2010, 74: 81-94.
- [4] Opiyo SO, Pardy RL, Moriyama H, Moriyama EN. Evolution of the Kdo₂-lipid A biosynthesis in bacteria. *BMC Evolution Biology*, 2010, 10: 362-375.
- [5] Williams AH, Raetz CR. Structural basis for the acyl chain selectivity and mechanism of UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2007, 104: 13543-13550.
- [6] Bartling CM, Raetz CR. Crystal structure and acyl chain selectivity of *Escherichia coli* LpxD, the N-acyltransferase of lipid A biosynthesis. *Biochemistry*, 2009, 48: 8672-8683.
- [7] Barb AW, Jiang L, Raetz CR, Zhou P. Structure of the deacetylase LpxC bound to the antibiotic CHIR-090: Time-dependent inhibition and specificity in ligand binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2007, 104: 18433-18438.
- [8] Langklotz S, Baumann U, Narberhaus F. Structure and function of the bacterial AAA protease FtsH. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, 1823: 40-48.
- [9] Langklotz S, Schäkermann M, Narberhaus F. Control of lipopolysaccharide biosynthesis by FtsH-mediated proteolysis of LpxC is conserved in enterobacteria but not in all gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193: 1090-1097.
- [10] Guo L, Lim KB, Gunn JS, Bainbridge B, Darveau RP, Hackett M, Miller SI. Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes phoP-phoQ. *Science*. 1997, 276: 250-253.
- [11] Winfield MD, Groisman EA. Phenotypic differences between *Salmonella* and *Escherichia coli* resulting from the disparate regulation of homologous genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2004, 101: 17162-17167.
- [12] Haag AF, Wehmeier S, Muszyński A, Kerscher B, Fletcher V, Berry SH, Hold GL, Carlson RW, Ferguson GP. Biochemical characterization of *Sinorhizobium meliloti* mutants reveals gene products involved in the biosynthesis of the unusual lipid A very long-chain fatty acid. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286: 17455-17466.
- [13] Vorachek-Warren MK, Carty SM, Lin S, Cotter RJ, Raetz CR. An *Escherichia coli* mutant lacking the cold shock-induced palmitoleoyltransferase of lipid A biosynthesis: absence of unsaturated acyl chains and antibiotic hypersensitivity at 12 degrees C. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277: 14186-14193.
- [14] Li Y, Powell DA, Shaffer SA, Rasko DA, Pelletier MR, Leszyk JD, Scott AJ, Masoudi A, Goodlett DR, Wang X, Raetz CR, Ernst RK. LPS remodeling is an evolved survival strategy for bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2012, 109: 8716-8721.
- [15] Gibbons HS, Reynolds CM, Guan Z, Raetz CRH. An inner membrane dioxygenase that generates the 2-hydroxymyristate moiety of *Salmonella* lipid A. *Biochemistry*, 2008, 47: 2814-2825.

- [16] Rutten L, Mannie JP, Stead CM, Raetz CRH, Reynolds CM, Bonvin AM, Tommassen JP, Egmond MR, Trent MS, Gros P. Active-site architecture and catalytic mechanism of the lipid A deacylase LpxR of *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2009, 106: 1960-1964.
- [17] Stead CM, Beasley A, Cotter RJ, Trent MS. Deciphering the unusual acylation pattern of *Helicobacter pylori* lipid A. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190: 7012-7021.
- [18] Bishop RE, Gibbons HS, Guina T, Trent MS, Miller SI, Raetz CRH. Transfer of palmitate from phospholipids to lipid A in outer membranes of gram-negative bacteria. *EMBO Journal*, 2000, 19: 5071-5080.
- [19] Hwang PM, Choy WY, Lo EI, Chen L, Forman-Kay JD, Raetz CRH, Privé GG., Bishop RE, Kay LE. Solution structure and dynamics of the outer membrane enzyme PagP by NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2002, 99: 13560-13565.
- [20] Kawasaki K, Ernst RK, Miller SI. 3-O-deacylation of lipid A by PagL, a PhoP/PhoQ-regulated deacylase of *Salmonella typhimurium*, modulates signaling through Toll-like receptor 4. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279: 20044-20048.
- [21] Wang X, Ribeiro AA, Guan Z, McGrath SC, Cotter RJ, Raetz CRH. Structure and biosynthesis of free lipid A molecules that replace lipopolysaccharide in *Francisella tularensis* subsp. *novicida*. *Biochemistry*, 2006, 45: 14427-14440.
- [22] Wang X, Karbarz MJ, McGrath SC, Cotter RJ, Raetz CRH. MsbA transporter-dependent lipid A 1-dephosphorylation on the periplasmic surface of the inner membrane: topography of *Francisella novicida* LpxE expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279: 49470-49478.
- [23] Karbarz MJ, Six DA, Raetz CR. Purification and characterization of the lipid A 1-phosphatase LpxE of *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284: 414-425.
- [24] Que-Gewirth NLS, Karbarz MJ, Kalb SR, Cotter RJ, Raetz CRH. Origin of the 2-amino-2-deoxy-gluconate unit in *Rhizobium leguminosarum* lipid A. Expression cloning of the outer membrane oxidase LpxQ. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278: 12120-12129.
- [25] Herrera CM, Hankins JV, Trent MS. Activation of PmrA inhibits LpxT-dependent phosphorylation of lipid A promoting resistance to antimicrobial peptides. *Molecular Microbiology*, 2010, 76: 1444-1460.
- [26] Boon Hinckley M, Reynolds CM, Ribeiro AA, McGrath SC, Cotter RJ, Lauw FN, Golenbock DT, Raetz CRH. A *Leptospira interrogans* enzyme with similarity to yeast Ste14p that methylates the 1-phosphate group of lipid A. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280: 30214-30224.
- [27] Lee H, Hsu FF, Turk J, Groisman EA. The PmrA-regulated pmrC gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186: 4124-4133.
- [28] Tran AX, Whittimore JD, Wyrick PB, McGrath SC, Cotter RJ, Trent MS. The lipid A 1-phosphatase of *Helicobacter pylori* is required for resistance to the antimicrobial peptide polymyxin. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188: 4531-4541.
- [29] Cullen TW, Trent MS. A link between the assembly of flagella and lipooligosaccharide of the Gram-negative bacterium *Campylobacter jejuni*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2010, 107: 5160-5165.
- [30] Wang X, McGrath SC, Cotter RJ, Raetz CRH. Expression cloning and periplasmic orientation of the *Francisella novicida* lipid A 4'-phosphatase LpxF. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281: 9321-9330.
- [31] Wang X, Ribeiro AA, Guan Z, Abraham SN, Raetz CRH. Attenuated virulence of a *Francisella* mutant lacking the lipid A 4'-phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2007, 104: 4136-4141.
- [32] Yan A, Guan Z, Raetz CR. An undecaprenyl phosphate-aminoarabinose flippase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282: 36077-36089.
- [33] Wang X, Ribeiro AA, Guan Z, Raetz CR. Identification of undecaprenyl phosphate-beta-D-galactosamine in *Francisella novicida* and its function in lipid A modification. *Biochemistry*, 2009, 48: 1162-1172.
- [34] Kawasaki K, China K, Nishijima M. Release of the lipopolysaccharide deacylase PagL from latency compensates for a lack of lipopolysaccharide

- aminoarabinose modification-dependent resistance to the antimicrobial peptide polymyxin B in *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189: 4911-4919.
- [35] Rutten L, Geurtsen J, Lambert W, Smolenaers JJM, Bonvin AM, de Haan A, van der Ley P, Egmond MR, Gros P, Tommassen J. Crystal structure and catalytic mechanism of the LPS 3-O-deacylase PagL from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2006, 103: 7071-7076.
- [36] Kanjilal-Kolar S, Basu SS, Kanipes MI, Guan Z, Garrett TA, Raetz CR. Expression cloning of three *Rhizobium leguminosarum* lipopolysaccharide core galacturonosyltransferases. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281:12865-12878.
- [37] Reynolds CM, Kalb SR, Cotter RJ, Raetz CR. A phosphoethanolamine transferase specific for the outer 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid residue of *Escherichia coli* lipopolysaccharide. Identification of the eptB gene and Ca²⁺ hypersensitivity of an eptB deletion mutant. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280: 21202-21211.
- [38] Kong Q, Six DA, Roland KL, Liu Q, Gu L, Reynolds CM, Wang X, Raetz CRH and Curtiss III R. Salmonella synthesizing 1-monophosphorylated lipopolysaccharide exhibits low endotoxic activity while retaining its immunogenicity. *Journal of Immunology*, 2011, 187: 412-423.

Kdo₂-lipid A modification in Gram-negative bacteria— A review

Xiaoyuan Wang*

State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: In most Gram-negative bacteria, the Kdo₂-lipid A moiety of lipopolysaccharide forms the outer monolayer of the outer membrane. Diverse covalent modifications of Kdo₂-lipid A may occur in bacteria to survive different environmental conditions. Kdo₂-lipid A is usually synthesized on the cytoplasmic surface of the inner membrane. After the core oligosaccharide is attached to Kdo₂-lipid A, the molecule is flipped to the outer surface of the inner membrane, where the O-antigen repeats are attached to form lipopolysaccharide. Kdo₂-lipid A could activate the innate immune system through TLR4. Therefore, researches on the structure modification of Kdo₂-lipid A would be useful for developing new vaccines and adjuvants.

Keywords: Gram-negative bacteria, lipopolysaccharide, Kdo₂-lipid A, endotoxins, vaccine adjuvant

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2012CB725202) and by the National Natural Science Foundation of China (31170069)

* Corresponding author. Tel: +86-510-85329329; E-mail: xiaoyuanwang@hotmail.com

Received: 10 September 2012/Revised: 13 November 2012