

细菌类脂 A 的结构修饰及其应用前景

陈久洲 李烨 王小元*

(江南大学食品科学与技术国家重点实验室 江苏 无锡 214122)

摘要: 类脂 A 是革兰氏阴性细菌细胞外膜外侧脂多糖的主要组成成分,也是内毒素的活性成分,可以被宿主免疫细胞识别并引发疾病。类脂 A 的生物合成途径相对保守,但在转运到外膜外侧的过程中它的结构被修饰以适应不同的外界环境。类脂 A 的结构修饰在细菌体内受到严格调控,与细菌的毒性密切相关,却不影响细菌的生长繁殖。主要介绍近几年类脂 A 结构修饰方面的研究进展,在此基础上分析了类脂 A 结构修饰在病原菌防治、疫苗开发、工业发酵和食品安全等相关领域的应用前景。

关键词: 内毒素,脂多糖,类脂 A,疫苗佐剂,食品安全

Structure Modification of Lipid A in Bacteria

CHEN Jiu-Zhou LI Ye WANG Xiao-Yuan*

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

Abstract: Lipid A is the major component of lipopolysaccharide, which forms the outer monolayer of the outer membrane in most Gram-negative bacteria. Lipid A is responsible for the bioactivity of endotoxin. After entering the host, lipid A can be recognized by immune cells, which may lead to diseases. The biosynthetic pathway of lipid A in bacteria is relatively conservative, but structure modifications can occur during its transport to the bacterial surface. These modifications differ in bacteria in order to adapt to different external environment. They are not necessary for survival, but are tightly regulated in the cell and closely related to the virulence of bacteria. This review summarizes recent advances on the modification of lipid A and its relationship with the virulence of bacteria. Furthermore, applications of such research in pathogen control, vaccine development, and fermentation industry are proposed.

Keywords: Endotoxin, Lipopolysaccharide, Lipid A, Vaccine adjuvant, Food safety

脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS),也叫内毒素,是革兰氏阴性细菌细胞外膜的主要组成成分,主要由类脂 A、核心多糖和 O-抗原 3 部分组成。类脂 A 是 LPS 的疏水基团,可以将亲水性的核心多糖和 O-抗原黏附在细菌的外表面构成完整的细胞壁,同时

类脂 A 也是内毒素的活性成分^[1-2]。当病原性的革兰氏阴性细菌侵入宿主后,其表面 LPS 的释放并被免疫细胞表面的 Toll 样受体 4 (Toll Like Receptor 4, TLR-4)识别,引发细胞内一系列的生理生化反应,产生肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-1 β 和干扰

素- γ 等多种细胞因子。一方面,这些细胞因子的过量积累能够引起严重的内毒素休克,表现为炎症反应、凝血异常、血压过低、器官衰竭等症状;另一方面,部分细胞因子的适量产生可以激发宿主的免疫反应,所以类脂 A 及其结构类似物也具有潜在的疫苗佐剂的功能^[3-4]。研究表明类脂 A 诱导产生的细胞因子的种类和数量取决于 TLR-4 对类脂 A 结构的识别。

LPS 是革兰氏阴性细菌细胞外膜的主要成分,其正常的合成和转运是细菌赖以生存的必要条件。如图 1 所示,大肠杆菌(*Escherichia coli*)中 LPS 合成的起始底物是水溶性的小分子 UDP-氨基葡萄糖乙酸酐(UDP-N-acetylglucosamine, UDP-GlcNAc),经过 LpxA、LpxC、LpxD、LpxH、LpxB、LpxK、KdtA、LpxL 和 LpxM 的连续催化转变成 KDO₂-类脂 A,再经多种酶的催化连入多糖链并最终装配成

完整的 LPS 转运至细胞外膜外侧。大肠杆菌的类脂 A 是以 β -1,6-糖苷键连接的 2 个氨基葡萄糖为基本骨架,其结构中包含 1 位和 4' 位的两个磷酸基团以及 2、3、2' 和 3' 位的 6 条脂肪酸链^[2]。与核心多糖和 O-抗原相比,类脂 A 的结构相对保守,参与类脂 A 合成的 9 种酶及其编码基因在大部分的革兰氏阴性细菌中都存在。尽管合成过程保守,但不同细菌在不同环境中的类脂 A 结构却不尽相同,原因是向膜外转运时,类脂 A 的结构会发生各种各样的修饰,以适应不断变化的外界环境^[5]。近年来的研究表明类脂 A 结构中亲水性的磷酸基团和疏水性的脂肪酸链均可发生修饰作用(图 1)^[1]。本文结合该领域的最新研究进展,着重阐述了类脂 A 的结构修饰,并在此基础上分析了类脂 A 的结构与细菌致病性的关系以及类脂 A 结构修饰在病原菌防治、疫苗开发、工业发酵和食品安全等相关领域的应用前景。

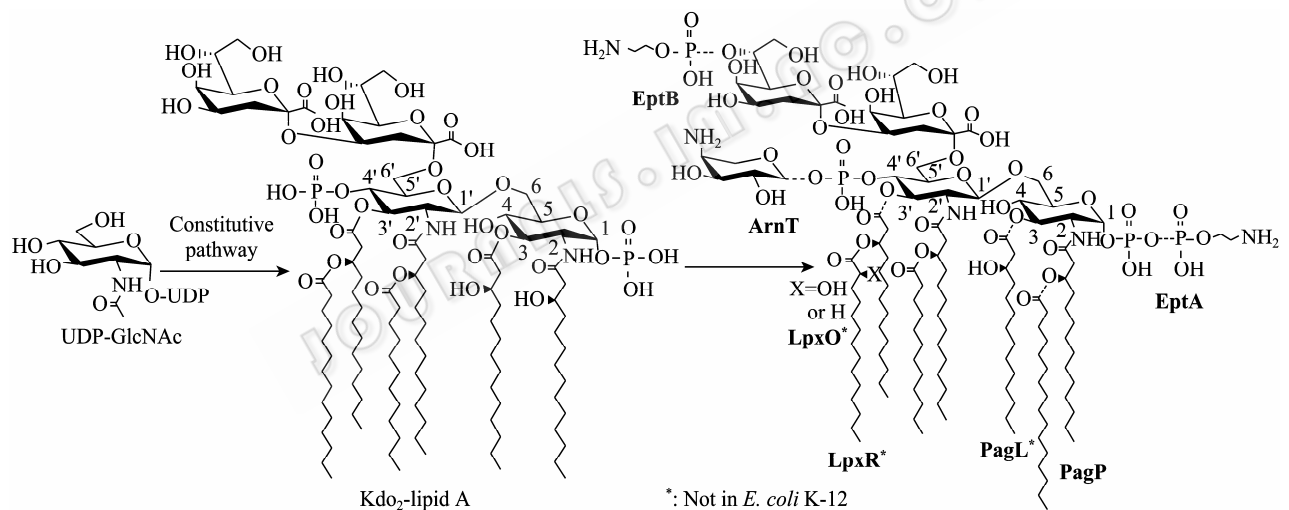


图 1 大肠杆菌和沙门氏菌中类脂 A 的合成及修饰^[1]

Fig. 1 The constitutive biosynthetic pathway and covalent modification of Kdo₂-lipid A in *E. coli* and *Salmonella*^[1]

1 类脂 A 结构修饰的调控

细菌中存在多种调控机制调节菌体的生命活动以适应不断变化的外界环境,尤其是一些病原性的细菌,它们通过调节毒力基因的表达和毒力蛋白的作用适应生存环境的变化。目前已经发现的参与类脂 A 结构修饰的调控机制主要有二元调控系统 PhoP-PhoQ 和 PmrA-PmrB。

1.1 PhoP-PhoQ 二元调控系统

PhoP-PhoQ 是革兰氏阴性细菌中一种非常重要

的二元调控系统,参与低 Mg^{2+} 环境下多种细胞活性的调控。膜上感应蛋白 PhoQ 能够感受外部环境中低浓度的 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 并通过磷酸化的胞内转录调控蛋白 PhoP 与基因组上特定序列的结合开启一些基因的转录以适应这种环境的变化^[6]。此外,PhoP-PhoQ 还可以被宿主免疫系统分泌的阳离子抗菌肽(Cationic antimicrobial peptides, CAMPs)激活^[7]。细菌体内受 PhoP-PhoQ 调控的基因有 40 多种,分为 PhoP 激活基因(*pag*)和 PhoP 抑制基因(*prg*)。

PhoP-PhoQ 参与细菌毒力的调控,对病原菌的

生存至关重要。 Mg^{2+} 是哺乳动物细胞环境的重要指示剂,胞内为低 Mg^{2+} 环境,胞外则是高 Mg^{2+} 环境。如图 2 所示,细菌侵入细胞时,与侵入有关的 *prg* 基因(*prgHIJK*)在高 Mg^{2+} 的作用下转录被激活,增强了细菌对宿主细胞的侵袭力;而进入细胞后 *PhoQ* 感应宿主细胞内的低 Mg^{2+} 环境,与毒力有关的 *pag* 基因(*pagP*、*pagL*)的转录被激活,使得细菌具备很强的胞内寄生能力^[8]。

1.2 PmrA-PmrB 二元调控系统

PmrA-PmrB 是革兰氏阴性细菌中另外一种重要的二元调控系统,*PmrB* 可以感受外部环境中高浓度的 Fe^{3+} 和低 pH 并通过 *PmrA* 激活特定基因的转录。在沙门氏菌(*Salmonella*)中 *PmrA-PmrB* 还可以通过 *PhoP* 激活的蛋白 *PmrD* 在低 Mg^{2+} 条件下被激活,与 *PhoP-PhoQ* 共同调控细菌的生命活动,但是在大肠杆菌中 *PmrD* 却没有功能(图 2)^[9]。

PmrA-PmrB 调控的类脂 A 结构的修饰主要涉及磷酸基团的共价修饰,修饰基团的添加可以中和细菌表面因类脂 A 存在而携带的大量的负电荷以抵抗 CAMPs 的攻击。*PmrA-PmrB* 调控系统最典型的例子是 *arn* 操纵子和 *udg* 基因,作用是将一个 4-氨基阿拉伯糖(4-amino-4-deoxy- α -L-arabinose, L-Ara4N) 基团转移到类脂 A 分子 4' 位的磷酸基团上^[10]。如图 2 所示,*arn* 操纵子含有 7 个结构基因 *arnBCADTEF*, 依次编码 7 种酶: *ArnB*、*ArnC*、*ArnA*、*ArnD*、*ArnT*、*ArnE* 和 *ArnF*^[11]。首先 *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戍烯醇磷酸- α -L-4-氨基阿拉伯糖 (Undecaprenyl phosphate-L-Ara4N, 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 基团转移到类脂 A 分子上^[12]。

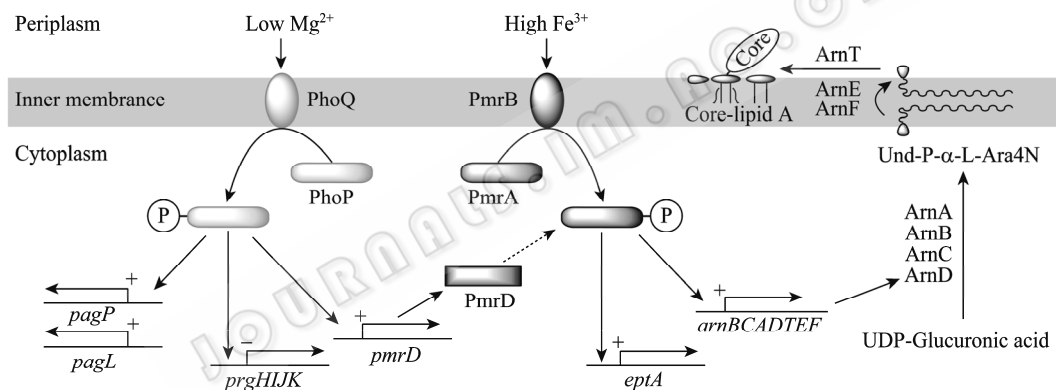


图 2 PhoP-PhoQ 和 PmrA-PmrB 调控的与类脂 A 结构修饰有关的基因的表达^[5,9,13]

Fig. 2 Regulation of gene expression by PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB involved in lipid A modification^[5,9,13]

2 类脂 A 脂肪酸链上的修饰

目前已经发现的与类脂 A 脂肪酸链修饰有关的酶有 *PagP*、*PagL*、*LpxR* 和 *LpxO* 等,其中 *PagP*、*PagL* 和 *LpxR* 是细胞外膜蛋白,能够感受外部微环境的变化并迅速作用于临近的类脂 A 分子,使细菌表现出对环境的适应性。

2.1 PagP

PagP 是位于细胞外膜上的一种十六烷酰转移酶,可以从磷脂分子上转移一条十六碳脂肪酸链到类脂 A 的 $\beta 2$ 位上,产生 7 条脂肪酸链结构的类脂 A。这种结构的类脂 A 可以干扰宿主免疫细胞 TLR-4 对类脂 A 的识别并赋予细菌对 CAMPs 的抗性^[14]。*PagP*

对供体选择的精确度非常高,*PagP* 中有 8 个跨膜的 β 折叠组成 1 个 β 折叠筒,处于 β 折叠筒底部的 Gly88 决定了脂肪酸链的长度^[15-16],研究并控制 *PagP* 对脂肪酸链的选择对内毒素抑制剂及疫苗佐剂的开发非常重要。

PagP 受 *PhoP-PhoQ* 转录水平的调控,但作为与外部环境直接接触的有催化活性的外膜蛋白,它还有一种更为快速的基于蛋白水平的调控机制-外膜蛋白信号反应耦合机制^[17]。一般条件下 *PagP* 低水平表达但不发挥作用,即处于潜伏状态,潜伏的原因是它的活性位点朝向其催化底物磷脂匮乏的细胞外膜外侧^[18]。当突变使 LPS 的形状发生变化或者用 EDTA 螯合掉膜上用于中和相邻 LPS 间负斥力的

Mg²⁺时, LPS 的组织结构遭到破坏, 导致磷脂向外膜外侧转运, 此时 PagP 迅速激活并利用磷脂为底物催化类脂 A 的十六烷酰化修饰来快速修复由此带来的膜渗透性屏障的破坏。例如, LpxM 缺失的大肠杆菌 O157:H7 突变株和表达外源 PagL 的 *E. coli* 中 PagP 均被不同程度的激活^[19-20]; 而 EDTA 短暂处理的大肠杆菌中类脂 A 可以快速十六烷酰化, 该过程不依赖于新的 PagP 的合成^[21]。

2.2 PagL

PagL 是细胞外膜上的一种脱酰基酶, 能特异性的水解去除类脂 A 3 位的脂肪酸链, 而类脂 A 的脱酰基化能通过改变 TLR-4 的识别减弱类脂 A 的内毒素活性, 有利于细菌躲避宿主免疫系统的攻击^[13-14, 22]。因此, PagL 对于 LPS 的体外减毒以及新的疫苗和疫苗佐剂开发有重要的利用价值。PagL 的活性中心在暴露在跨膜区的外侧, 所以对其结构的研究还可以为病原菌的防治和内毒素抑制剂的开发提供理论依据。

PagL 也同时受 PhoP-PhoQ 和外膜蛋白信号反应耦合机制的调控。沙门氏菌类脂 A 分子上 L-Ara4N 的存在可以抑制 PagL 的活性, 而该基团的缺失可以促使 PagL 从潜伏状态激活, 以弥补因 L-Ara4N 缺失造成的细菌对多粘菌素敏感性的增加^[23-24]。PagL 的潜伏机制至今还不明确, Manabe^[25] 等的研究表明 PagL 细胞外侧一些特定的氨基酸序列可以识别 L-Ara4N 修饰的类脂 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^[26]。

2.3 LpxR

LpxR 是在沙门氏菌中发现的另外一种位于细胞外膜上的脱酰基酶, 作用是脱去类脂 A 3' 位上的脂肪酸链。LpxR 的生理功能至今还不清楚, 但是脂肪酸链的变化往往可以通过改变宿主免疫系统对类脂 A 的识别影响其内毒素活性, 所以 LpxR 也是一种潜在的可用于类脂 A 减毒的工具酶。

与 PagP 和 PagL 不同, LpxR 既不受 PhoP-PhoQ 的调控, 也不受 PmrA-PmrB 的调控, 但是它的活性需要 Ca²⁺ 的存在。在大肠杆菌中外源表达 LpxR 时可使大部分的类脂 A 分子脱酰基化, 而沙门氏菌中 LpxR 却处于潜伏状态^[27]。虽然 LpxR 的晶体结构已经鉴定, 但是 LpxR 在外膜上的潜伏机制还不清楚^[29]。LpxR 的同源基因在其他一些病原性的革兰

氏阴性细菌的基因组中都有发现, 不同的是幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)中 LpxR 始终保持活性并催化类脂 A 3' 位的脱酰基化, 产生一种低免疫活性的 4 条脂肪酸链的类脂 A^[28]。

2.4 LpxO

LpxO 是细胞内膜上的一种双加氧酶, 作用是在有氧条件下以 Fe²⁺ 和 α -酮戊二酸为辅助因子催化类脂 A 3' 位次级脂肪酸链的羟基化^[30]。LpxO 不受 PhoP-PhoQ 和 PmrA-PmrB 的调控, 活性中心朝向周质空间, 其晶体结构和生理功能还未确定。

3 类脂 A 磷酸基团的修饰

类脂 A 结构中 2 个磷酸基团的存在使得细菌表面带有大量的负电荷, 这就为宿主体内 CAMPs 的结合提供了条件。为了躲避宿主免疫系统的攻击, 部分病原性的细菌可以通过磷酸基团的去除或正电基团的共价修饰来减弱类脂 A 的负电性, 目前已报道的与类脂 A 磷酸基团修饰有关的酶有 LpxE、LpxF、ArnT、EptA (PmrC)、LpxT、LmtA 和 LpxQ 等。

3.1 磷酸基团的去除

类脂 A 磷酸基团的缺失能有效地减少细菌表面负电荷的量, 防止宿主 CAMPs 对细菌外膜的结合和破坏。目前在弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*)中已经发现 2 个磷酸酶: LpxE 和 LpxF, 其中 LpxE 能特异性的去除类脂 A 1 位上的磷酸基团^[31]; 而 LpxF 则特异性地识别并去除 4' 位的磷酸基团^[32]。LpxE 的同源基因在根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum*)和幽门螺旋杆菌中也有发现^[33-34]。

类脂 A 磷酸基团的缺失常见于病原菌和内共生菌中, 根瘤菌的类脂 A 上没有磷酸基团, 而弗朗西斯菌的类脂 A 上常常只带有一个磷酸基团^[35]。值得关注的是 LpxE 水解后的类脂 A 产物与已经商业化的疫苗佐剂单磷酸类脂 A (MPL) 的结构非常相似, 将 LpxE 用于 MPL 的生产和新疫苗佐剂的开发前景广阔。而 *lpxF* 缺失突变的弗朗西斯菌不再具有感染小鼠的能力则为其在弗朗西斯菌防治中的应用提供了理论依据^[36]。

3.2 磷酸基团的共价修饰

类脂 A 磷酸基团的共价修饰是细菌躲避宿主免疫系统的一种重要的方式。现在已经发现的参与这

类修饰的酶为受 PmrA-PmrB 调控的 ArnT 和 EptA。其中 EptA 的作用是在类脂 A 1 位磷酸基团上引入 1 个磷酸乙醇胺(Phosphoethanolamine, pEtN)基团, 其供体是磷脂酰乙醇胺^[37]。磷酸基团的共价修饰对体内缺少去除类脂 A 磷酸基团的磷酸酶的细菌在宿主体内的生存至关重要。类脂 A 磷酸基团的共价修饰在其他一些病原性的革兰氏阴性细菌中也有发现。幽门螺旋杆菌类脂 A 分子的 1 位上有 pEtN 的修饰, 不同的是这种修饰是在磷酸基团去除的基础上发生的^[38]; 弗朗西斯菌的 1 位磷酸基团通常被半乳糖胺基团修饰, ArnT 的同源基因 *flmK* 催化完成半乳糖胺基团的转移而 ArnC 的同源基因 *fLmF1* 和 *fLmF2* 则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^[39-40]。

参与类脂 A 磷酸基团修饰的酶还有 LpxT、LmtA 和 LpxQ。LpxT 可以利用十一异戊烯醇焦磷酸为磷酸基团供体在类脂 A 1 位磷酸基团上添加第 2 个磷酸基团形成焦磷酸结构, 其活性受 PmrA 的负调控, 间接促进 EptA 的作用^[41-42]。钩端螺旋体中 LmtA 可以将 S-腺苷甲硫氨酸的甲基转移至类脂 A 的 1 位磷酸基团上^[43]。根瘤菌外膜蛋白 LpxQ 的功能是有氧条件下在 LpxE 催化的 1 位脱磷酸作用之后将氨基葡萄糖转变为 2-氨基葡萄糖^[44]。

3.3 类脂 A 结构中磷酸基团和脂肪酸链的相互影响

类脂 A 分子的主要组成部分磷酸基团和脂肪酸链并不是孤立存在的, 二者相互影响。例如, *lpxF* 缺失突变的弗朗西斯菌的类脂 A 与野生菌相比不仅多了 4'位的磷酸基团, 其 3'位的脂肪酸链也不再被水解去除^[36], 而弗朗西斯菌的 LpxF 只有在 3'位次级脂肪酸链缺失的大肠杆菌中表达时才有相应的水解的作用^[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^[45], 而沙门氏菌中该基团的添加能抑制 3 位脂肪酸链的去除^[24]。这些相互作用产生的确切原因还不清楚, 但能说明类脂 A 分子上不同基团之间可能存在一些复杂的相互关系。

4 类脂 A 结构修饰的应用前景

类脂 A 是维持革兰氏阴性细菌细胞外膜渗透性屏障作用的主要组分, 其合成和结构修饰对于细菌

的生存至关重要。类脂 A 结构修饰方面的研究不但有助于揭示病原菌的致病机理, 而且可以为病原菌的防治、细菌疫苗和疫苗佐剂的开发及微生物的应用提供坚实的理论基础。

参与类脂 A 结构修饰的酶多为膜蛋白, 活性位点大都暴露在周质空间或者外膜的外侧, 这就使得以这些修饰酶为靶点开发相应的抗生素或内毒素抑制剂成为可能。而类脂 A 作为内毒素的活性成分可以刺激宿主的免疫系统, 说明类脂 A 是一种很好的免疫系统激活因子。美国 Corexa 公司已经开发出了可用于乙肝病毒疫苗和过敏治疗的疫苗佐剂 MPL。研究表明 MPL 作用的免疫细胞中白细胞介素-1β 的分泌量显著降低, 使得 MPL 的毒性降低但免疫活性还在^[46]。利用类脂 A 修饰酶在体内生产 MPL 可以代替传统的体外化学处理法来提高 MPL 的产量和质量, 而以类脂 A 修饰酶为工具定向改造细菌的类脂 A 结构也可以直接用于减毒疫苗的生产。因此, 类脂 A 修饰酶在细菌疫苗和疫苗佐剂的开发中前景广阔。

此外, 类脂 A 结构及其结构修饰在食品安全检测和发酵工业中也具有潜在的应用价值, 利用类脂 A 结构的特殊性可以开发新的用于病原菌快速检测的方法, 而工业发酵菌种类脂 A 结构的减毒改造也可以扩大其使用范围。

目前, 类脂 A 合成及结构修饰的研究已经取得了很大的进展, 但其应用领域却还非常有限。在已有研究的基础上进一步探索不同结构类脂 A 的致病机理并将其用于病原菌的防治是类脂 A 应用的基础; 而利用已知修饰酶对类脂 A 的结构定向修饰并用于减毒疫苗及疫苗佐剂开发则是类脂 A 应用的关键; 此外, 利用类脂 A 结构的特殊性开发新的病原菌快速检测方法以及将类脂 A 结构改造过的工程菌株用于发酵工业则能大大拓宽类脂 A 的应用领域。因此, 利用恰当的方法和手段发现并鉴定新的类脂 A 修饰酶, 并利用这些修饰酶造福人类, 将成为今后该领域的研究重点。

参 考 文 献

- [1] Raetz CRH, Reynolds CM, Trent MS, et al. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu Rev*

- Biochem*, 2007(76): 295–329.
- [2] Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*, 2002(71): 635–700.
- [3] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 2006, **124**(4): 783–801.
- [4] Villa P, Ghezzi P. Animal models of endotoxic shock. *Methods Mol Med*, 2004(98): 199–206.
- [5] Wang X, Quinn PJ. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Prog Lipid Res*, 2010, **49**(2): 97–107.
- [6] Guo L, Lim KB, Gunn JS, *et al.* Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes phoP-phoQ. *Science*, 1997, **276**(5310): 250–253.
- [7] Bader MW, Sanowar S, Daley ME, *et al.* Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell*, 2005, **122**(3): 461–472.
- [8] Groisman EA. The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol*, 2001, **183**(6): 1835–1842.
- [9] Winfield MD, Groisman EA. Phenotypic differences between *Salmonella* and *Escherichia coli* resulting from the disparate regulation of homologous genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(49): 17162–17167.
- [10] Trent MS, Ribeiro AA, Doerrler WT, *et al.* Accumulation of a polyisoprene-linked amino sugar in polymyxin-resistant *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: structural characterization and transfer to lipid A in the periplasm. *J Biol Chem*, 2001, **276**(46): 43132–43144.
- [11] Breazeale SD, Ribeiro AA, McClarren AL, *et al.* A formyltransferase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli* and the modification of lipid A with 4-Amino-4-deoxy-L-arabinose. Identification and function of UDP-4-deoxy-4-formamido-L-arabinose. *J Biol Chem*, 2005, **280**(14): 14154–14167.
- [12] Yan A, Guan Z, Raetz CR. An undecaprenyl phosphate-aminoarabinose flippase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2007, **282**(49): 36077–36089.
- [13] 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. *J Biol Chem*, 2004, **279**(19): 20044–20048.
- [14] Bishop RE, Gibbons HS, Guina T, *et al.* Transfer of palmitate from phospholipids to lipid A in outer membranes of gram-negative bacteria. *EMBO J*, 2000, **19**(19): 5071–5080.
- [15] Khan MA, Neale C, Michaux C, *et al.* Gauging a hydrocarbon ruler by an intrinsic exciton probe. *Biochemistry*, 2007, **46**(15): 4565–4579.
- [16] Khan MA, Bishop RE. Molecular mechanism for lateral lipid diffusion between the outer membrane external leaflet and a beta-barrel hydrocarbon ruler. *Biochemistry*, 2009, **48**(41): 9745–9756.
- [17] Bishop RE. Structural biology of membrane-intrinsic beta-barrel enzymes: sentinels of the bacterial outer membrane. *Biochim Biophys Acta*, 2008, **1778**(9): 1881–1896.
- [18] Hwang PM, Choy WY, Lo EI, *et al.* Solution structure and dynamics of the outer membrane enzyme PagP by NMR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(21): 13560–13565.
- [19] Clements A, Tull D, Jenney AW, *et al.* Secondary acylation of *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide contributes to sensitivity to antibacterial peptides. *J Biol Chem*, 2007, **282**(21): 15569–15577.
- [20] Geurtsen J, Steeghs L, Hove JT, *et al.* Dissemination of lipid A deacylases (PagL) among gram-negative bacteria: identification of active-site histidine and serine residues. *J Biol Chem*, 2005, **280**(9): 8248–8259.
- [21] Jia W, El Zoeiby A, Petruzzello TN, *et al.* Lipid trafficking controls endotoxin acylation in outer membranes of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2004, **279**(43): 44966–44975.
- [22] Trent MS, Pabich W, Raetz CR, *et al.* A PhoP/PhoQ-induced Lipase (PagL) that catalyzes 3-O-deacylation of lipid A precursors in membranes of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem*, 2001, **276**(12): 9083–9092.
- [23] 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*. *J Bacteriol*, 2007, **189**(13): 4911–4919.
- [24] Kawasaki K, Ernst RK, Miller SI. Inhibition of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* lipopolysaccharide deacylation by aminoarabinose membrane modification. *J Bacteriol*, 2005, **187**(7): 2448–2457.
- [25] Manabe T, Kawasaki K. Extracellular loops of lipid A 3-O-deacylase PagL are involved in recognition of aminoarabinose-based membrane modifications in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *J Bacteriol*, 2008, **190**(16): 5597–5606.
- [26] Rutten L, Geurtsen J, Lambert W, *et al.* Crystal structure and catalytic mechanism of the LPS 3-O-deacylase PagL from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(18): 7071–7076.
- [27] Reynolds CM, Ribeiro AA, McGrath SC, *et al.* An outer membrane enzyme encoded by *Salmonella typhimurium* lpxR that removes the 3'-acyloxyacyl moiety of lipid A. *J Biol Chem*, 2006, **281**(31): 21974–21987.
- [28] Stead CM, Beasley A, Cotter RJ, *et al.* Deciphering the unusual acylation pattern of *Helicobacter pylori* lipid A. *J Bacteriol*, 2008, **190**(21): 7012–7021.
- [29] Rutten L, Mannie JP, Stead CM, *et al.* Active-site architecture and catalytic mechanism of the lipid A deacylase LpxR of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(6): 1960–1964.

- [30] Gibbons HS, Reynolds CM, Guan Z, *et al.* An inner membrane dioxygenase that generates the 2-hydroxymyristate moiety of *Salmonella* lipid A. *Biochemistry*, 2008, **47**(9): 2814–2825.
- [31] Wang X, Karbarz MJ, McGrath SC, *et al.* MsbA transporter-dependent lipid A 1-dephosphorylation on the periplasmic surface of the inner membrane: topography of *Francisella novicida* LpxE expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2004, **279**(47): 49470–49478.
- [32] Wang X, McGrath SC, Cotter RJ, *et al.* Expression cloning and periplasmic orientation of the *Francisella novicida* lipid A 4'-phosphatase LpxF. *J Biol Chem*, 2006, **281**(14): 9321–9330.
- [33] Karbarz MJ, Six DA, Raetz CR. Purification and characterization of the lipid A 1-phosphatase LpxE of *Rhizobium leguminosarum*. *J Biol Chem*, 2009, **284**(1): 414–425.
- [34] Tran AX, Karbarz MJ, Wang X, *et al.* Periplasmic cleavage and modification of the 1-phosphate group of *Helicobacter pylori* lipid A. *J Biol Chem*, 2004, **279**(53): 55780–55791.
- [35] Wang X, Ribeiro AA, Guan Z, *et al.* Structure and biosynthesis of free lipid A molecules that replace lipopolysaccharide in *Francisella tularensis* subsp. *novicida*. *Biochemistry*, 2006, **45**(48): 14427–14440.
- [36] Wang X, Ribeiro AA, Guan Z, *et al.* Attenuated virulence of a *Francisella* mutant lacking the lipid A 4'-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(10): 4136–4141.
- [37] Lee H, Hsu FF, Turk J, *et al.* The PmrA-regulated pmrC gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol*, 2004, **186**(13): 4124–4133.
- [38] Tran AX, Whittimore JD, Wyrick PB, *et al.* The lipid A 1-phosphatase of *Helicobacter pylori* is required for resistance to the antimicrobial peptide polymyxin. *J Bacteriol*, 2006, **188**(12): 4531–4541.
- [39] Wang X, Ribeiro AA, Guan Z, *et al.* Identification of undecaprenyl phosphate-beta-D-galactosamine in *Francisella novicida* and its function in lipid A modification. *Biochemistry*, 2009, **48**(6): 1162–1172.
- [40] Song F, Guan Z, Raetz CR. Biosynthesis of undecaprenyl phosphate-galactosamine and undecaprenyl phosphate-glucose in *Francisella novicida*. *Biochemistry*, 2009, **48**(6): 1173–1182.
- [41] Touze T, Tran AX, Hankins JV, *et al.* Periplasmic phosphorylation of lipid A is linked to the synthesis of undecaprenyl phosphate. *Mol Microbiol*, 2008, **67**(2): 264–277.
- [42] Herrera CM, Hankins JV, Trent MS. Activation of PmrA inhibits LpxT-dependent phosphorylation of lipid A promoting resistance to antimicrobial peptides. *Mol Microbiol*, 2010, **76**(6): 1444–1460.
- [43] Boon Hinckley M, Reynolds CM, Ribeiro AA, *et al.* A *Leptospira interrogans* enzyme with similarity to yeast Ste14p that methylates the 1-phosphate group of lipid A. *J Biol Chem*, 2005, **280**(34): 30214–30224.
- [44] Que-Gewirth NLS, Karbarz MJ, Kalb SR, *et al.* Origin of the 2-amino-2-deoxy-gluconate unit in *Rhizobium leguminosarum* lipid A. Expression cloning of the outer membrane oxidase LpxQ. *J Biol Chem*, 2003, **278**(14): 12120–12129.
- [45] Tran AX, Lester ME, Stead CM, *et al.* Resistance to the antimicrobial peptide polymyxin requires myristoylation of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* lipid A. *J Biol Chem*, 2005, **280**(31): 28186–28194.
- [46] Okemoto K, Kawasaki K, Hanada K, *et al.* A potent adjuvant monophosphoryl lipid A triggers various immune responses, but not secretion of IL-1 β or activation of caspase-1. *J Immunol*, 2006, **176**(2): 1203–1208.