

PEPTYDOGLIKAN – BUDOWA, ROLA BIOLOGICZNA ORAZ SYNTEZA

PEPTIDOGLYCAN – STRUCTURE, BIOLOGICAL ACTIVITY AND CHEMICAL SYNTHESIS

**Justyna Samaszko-Fiertek*, Barbara Dmochowska,
Janusz Madaj**

*Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, Pracownia Chemii Cukrów
ul. Wita Stwosza 63, 80-303 Gdańsk
e-mail: j.samaszko-fiertek@ug.edu.pl

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Peptydoglikan

1.1. Budowa

1.2. Rola biologiczna

1.3. Struktura trzeciorzędowa

1.4. Biosynteza

1.5. Synteza chemiczna

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

Dr hab. Janusz Madaj, prof. nadzw. UG, ukończył studia chemiczne na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w roku 1989. W tym samym roku podjął pracę w Zakładzie Chemii Cukrów UG. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w roku 1995. W latach 1997–8 odbył staż naukowy w Case Western Reserved University w Cleveland, Ohio USA w grupie profesora Vincenta M. Monnier. W roku 2004 uzyskał stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych po przedstawieniu rozprawy na temat: „Badania dróg tworzenia i przemian wybranych związków cukrowych”. Jego aktualne zainteresowania naukowe skupiają się na chemii organicznej ze szczególnym uwzględnieniem chemii węglowodanów. Ostatnio swoje prace koncentruje na badaniach mechanizmu oddziaływania wankomycyny ze ścianą komórkową bakterii Gram-dodatnich oraz wpływem na to oddziaływanie fragmentów cukrowych.

Dr Barbara Dmochowska w roku 1994 ukończyła Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w Gdańsku. Jest adiunktem w Pracowni Chemii Cukrów na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Tematyka badawcza: tworzenie czwartorzędowych soli *N-D*-glikoamoniowych i alditoliloamoniowych z udziałem amin o potencjalnych właściwościach biologicznych.

Dr Justyna Samaszko-Fiertek w roku 2004 ukończyła Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w Gdańsku. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskała w roku 2010. Jest adiunktem w Pracowni Chemii Cukrów na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Tematyka badawcza: badaniach mechanizmu oddziaływania wankomycyny ze ścianą komórkową bakterii Gram-dodatnich, opracowanie metod syntezy nowych pochodnych antybiotyków glikopeptydowych.

ABSTRACT

The most important component of bacterial cell walls especially Gram-positive bacteria is peptidoglycan, called also murein, PGN. The first time this synonym was used in 1964 by Weidel and Pelzer [1]. Peptidoglycan is present in the outer layer of the cytoplasmic membrane and its structure. The structure of peptidoglycan depends on the bacteria strain. It is estimated that in Gram-negative bacteria, it occupies only about 10–20% of the total area of the cell wall, when in Gram-positive bacteria it is 50 and up to 90% of all space.

Problems with isolation with high purity of biological material shows the need for developing techniques for chemical synthesis of peptidoglycan fragments and their analogs. In past few years there has been a growing interest within the synthesis of compounds glycoprotein (glycopeptides, peptidoglycan, etc.). As a basis for the construction of cell walls of many bacteria.

Despite intensive research and gain significant knowledge of the physical and biological, chemical synthesis or biosynthesis (Fig. 5 and 6) of peptidoglycan, not so far failed to unambiguously determine its three-dimensional structure. The works of Kelman and Rogers [15] and Dimitriev [20] nearer picture of its structure. However, the time to develop *in vivo* visualization of cell structure it will be difficult to identify correctly peptidoglycan three-dimensional structure.

Due to the important biological roles of murein, many research centers have taken to attempt their chemical synthesis. For biological research began to use chemically synthesized peptidoglycan fragments which guaranteed both uniform and a certain structure. An important roles in the development of methods of chemical synthesis of peptidoglycan had H. Chowdhury work, Fig. 8 [35], Heseck, Fig. 9 and 10 [36, 37], Dziarskiego [38] and Boneca [39] and Inamury [34, 40].

Keywords: peptidoglycan, chemical synthesis, biosynthesis, biological activity

Słowa kluczowe: peptydoglikan, synteza chemiczna, biosynteza, rola biologiczna

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Używane w tekście symbole aminokwasów oraz ich pochodnych są zgodne z postanowieniami IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature zawartymi w Eur. J. Biochem., 1985, **138**, 9-37 oraz *A Short Guide to Abbreviations and Their Use In Peptide Science*, J. Peptide Sci., 1999, **5**, 465-471. W wypadkach nie objętych postanowieniami stosowano oznaczenia powszechnie przyjęte w chemii peptydów.

| | |
|------------|---|
| AFM | – ang. <i>Atomic Force Microscopy</i> |
| ATP | – adenozyno-5'-trifosforan |
| GalNAc | – <i>N</i> -acetylo-D-galaktozamina |
| GlcNAc | – <i>N</i> -acetylo-D-glukozamina |
| MDP | – muramyldipeptyd |
| MurG | – <i>N</i> -acetyloglukozaminylotransferaza |
| MraY | – specyficzna translokazy |
| MTP | – muramylotripeptyd |
| MurA | – transferaza enoilopirogroniowa |
| MurNAc | – kwas <i>N</i> -acetylo-D-muraminowy |
| NADPH | – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy |
| PGN | – ang. <i>peptidoglycan</i> |
| TEM | – transmisyjny mikroskop elektronowy |
| UDP-GlcNAc | – UDP- <i>N</i> -acetylo-D-glukozamina |
| UTP | – urydyno-5'-trifosforan |

WPROWADZENIE

W życiu człowieka od zawsze towarzyszą jemu wszelkiego rodzaju drobnoustroje – grzyby, bakterie, wirusy, itp. Niektóre z nich mają dobroczynny charakter, a niekiedy nawet ich obecność jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Część z nich odnalazła swoje zastosowanie w probiotykach np. bakterie kwasu mlekowego, tak bardzo ważne do stosowania w trakcie prowadzonej kuracji antybiotykowej. Chronią one przed rozwojem innych infekcji, grzybów i są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania jelit. Niestety wiele bakterii ma charakter chorobotwórczy. Przyczyniają się do rozwoju wielu infekcji, prowadzących do groźnych, niekiedy wręcz nieuleczalnych chorób. W przeciągu ostatnich kilku lat powodem wielu poważnych schorzeń były bakterie Gram-dodatnie. Największa zjadliwość wśród nich przypisywana jest gronkowcowi złocistemu (*Staphylococcus aureus*). Szacuje się, że od 10 do 50% populacji ludzkiej jest na stałe lub okresowo nosicielami tego drobnoustroju, z czego u znacznej większości nie zaobserwowano występowania objawów chorobotwórczych. Żyją oni z tą bakterią w ciągłej symbiozie, są dla niej pewnego rodzaju żywicielem, nieustannie dostarczają jej pokarm, a w zamian gronkowiec chroni swojego „dobroczyńcę” przed innymi bakteriami. Niestety *Staphylococcus aureus* pomimo swojego „dobroczynnego wpływu”, jeśli tylko spotka sprzyjające warunki (np. obniżona odporność organizmu) zaczyna siać powszechny postrach. Gronkowiec złocisty uważany jest od wielu lat za jeden z podstawowych patogenów odpowiedzialnych za zakażenia szpitalne i pozaszpitalne ludzi. Odpowiedzialny jest on m.in. za zakażenia ran chirurgicznych, zapalenie płuc, zapalenie opon mózgowych oraz zakażenia noworodków na oddziałach intensywnej terapii.

Pojawienie się coraz to nowszych, bardziej niebezpiecznych infekcji wywołanych przez kolejne szczepy bakteryjne przyczyniło się do konieczności poznania mechanizmów ich zjadliwości. Powstanie nowych i rozwinięcie się już istniejących technik analitycznych pozwoliło na kompleksową analizę budowy ściany komórkowej, jak również próby jej syntetycznego „odtworzenia”, co niewątpliwie ułatwia poznanie ogromu czynników ich wirulentności i patogenności bakterii. Wśród nich wyróżniamy m. in. zdolność wytwarzania toksyn czy enzymów zewnątrz wydzielniczych, jednakże w tym aspekcie dużą rolę odgrywa również sama budowa ściany komórkowej bakterii. Gronkowiec złocisty w głównej mierze zbudowany jest z peptydoglikanu (50–90%), który sam charakteryzuje się właściwościami immunostymulacyjnymi. Już w 1974 roku wykazano, że najmniejszym fragmentem adiutantomu czynnym jest muramyłodipeptyd (MDP), stymulujący wytwarzanie licznych cytokin. Jednakże fragmentu tego nie można wyodrębnić bezpośrednio ze ściany komórkowej bakterii, a można go otrzymać wyłącznie na drodze syntezy chemicznej.

Obserwowane problemy w dopracowaniu technik izolowania materiału biologicznego, odznaczającego się wysoką czystością zwróciły uwagę na konieczność rozwoju technik syntezy chemicznej określonych fragmentów, stanowiących analogi

tych, które zostały wyizolowane z materiału biologicznego. Sprawilo to, że nastąpił duży wzrost zainteresowania syntezą związków glikoproteinowych (glikopeptydów, peptydoglikanów, itp.), stanowiących podstawę budowy ścian komórkowych wielu bakterii. Od tego czasu opracowano wiele nowych technik uwzględniających syntezę odpowiednich fragmentów (cukrowych, peptydowych) zarówno w roztworze, jak i na nośniku stałym, a także bardziej zaawansowanych opartych na remodelowaniu glikoprotein czy metodzie *in vivo* supresyjnej tRNA.

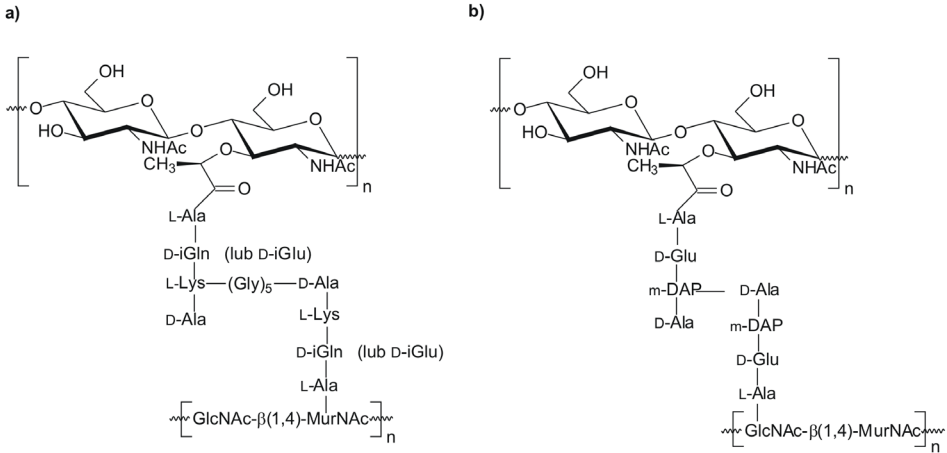
1. PEPTYDOGLIKAN

Ważnym składnikiem ścian komórkowych bakterii zarówno Gram-dodatniej, jak i Gram-ujemnej jest peptydoglikan, zwany również mureiną (PGN). Synonim ten został użyty po raz pierwszy w 1964 roku przez Weidela i Pelzera [1]. Peptydoglikan obecny jest w zewnętrznej warstwie membrany cytoplazmatycznej. W zależności od bakterii różni się on składem (budową), a przede wszystkim zajmowaną powierzchnią (grubością warstwy). Szacuje się, że w przypadku bakterii Gram-ujemnych zajmuje on tylko około 10–20% całkowitej powierzchni ściany komórkowej, a w przypadku bakterii Gram-dodatnich od 50 do nawet 90%.

1.1. BUDOWA

Peptydoglikany występujące w ścianie komórkowej bakterii zbudowane są z długich łańcuchów polisacharydowych, składających się z powtarzających się jednostek *N*-acetylo-*D*-glukozaminy (GlcNAc) oraz kwasu *N*-acetylo-*D*-muraminowego (MurNAc), połączonych wiązaniem $\beta(1\rightarrow4)$ *O*-glikozydowym. W niektórych peptydoglikanach zamiast reszty MurNAc występuje kwas *L*-talozaaminouronowy. Do grupy karboksylowej kwasu *N*-acetylo-*D*-muraminowego przyłączony jest fragment peptydowy składający się z reszt *L*- i *D*-aminokwasów, a w przypadku kwasu *L*-talozaaminouronowego fragment ten składa się wyłącznie z *L*-aminokwasów [2].

Łańcuch peptydowy *S. aureus* zbudowany jest z reszt *L*-alaniny, kwasu *D*-izoglutaminowego (w przypadku niektórych szczepów gronkowca reszta ta zastąpiona jest *D*-isoglutaminą), *L*-lizyny oraz *D*-alaniny (Rys. 1a).



Rysunek 1. Przykłady peptydoglikanu występującego w przyrodzie [2]

Figure 1. Examples of peptidoglycan fragments [2]

W przypadku bakterii Gram-ujemnych w miejsce L-Lys występuje najczęściej *meso*-Dap (np. *Escherichia coli*, Rys. 1b). Ważnym elementem budowy mureiny są mostki peptydowe. Łączą one poszczególne łańcuchy glikanu nadając silnie usieciowaną, trójwymiarową, sztywną strukturę, co stanowi istotną cechę tego typu związków. Mostki peptydowe mogą różnić się od siebie w zależności od bakterii zarówno składem, jak i długością. Powoduje to, że wyróżniamy kilka typów mureiny. W typie A wiązanie poprzeczne powstaje pomiędzy grupą karbonylową D-alaniny z pozycji 4, a wolną grupą aminową aminokwasu diaminowego w pozycji 3 z sąsiedniego peptydu. W obrębie tej klasy wyróżniamy dodatkowo kilka podtypów. W przypadku A1 wiązanie peptydowe między obydwoma resztami jest bezpośrednie, ale może różnić się obecnością reszty diaminowej:

- A1 α – w tworzeniu wiązania uczestniczy L-lizyna;
- A1 β – grupa aminowa z łańcucha bocznego pochodzi od reszty L-ornityny;
- A1 γ – obecny jest kwas diaminopimelinowy (charakterystyczny dla większości bakterii Gram-ujemnych np. *E. coli*, rzadziej Gram-dodatnich, np. *L. monocytogenes*).

W mureinie podtypu A2 w tworzeniu mostków peptydowych biorą udział te same reszty aminokwasowe, które obecne są w fragmencie peptydowym.

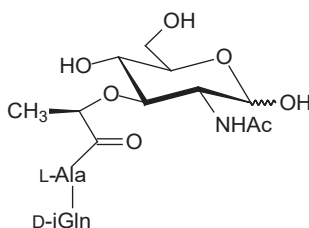
W momencie gdy mostek składa się z dwóch do siedmiu reszt aminokwasowych, mamy do czynienia z podtypem A3, dla którego charakterystycznym przedstawicielem jest gronkowiec złocisty. W skład jego peptydoglikanu wchodzi mostki pentaglicynowe, zaś w przypadku *S. pyogenes* dialanylowe [2]. Wiązania poprzeczne w mostkach utworzone przez aminokwasy dikarbosylowe (najczęściej D-asparaginę, D- lub L-glutaminę) występują w podtypie A4.

W przypadku mureiny typu B, mostki powstają pomiędzy resztą D-glutaminy w pozycji 2 jednego peptydu, a czwartą resztą aminokwasową (D-alaniną) sąsiedniego. Reszty te połączone są ze sobą przy pomocy aminokwasu diaminowego.

1.2. ROLA BIOLOGICZNA

Pierwszą linią obrony układu immunologicznego organizmów przeciwko mikroorganizmom jest rozpoznanie podstawowych składników ich budowy takich, jak peptydoglikan, lipopolisacharydy, lipoproteiny czy DNA bakteryjne. Związki te posiadają pewnego rodzaju mediatory, do których zaliczamy cytokiny, prostaglandynę czy tlenek azotu NO ułatwiające identyfikację obcych organizmów [36]. W wielu pracach peptydoglikanowi przypisuje się właściwości immunoadiuwantowe (immunostymulacyjne, ang. *immunopotentiator*), jednakże mechanizm ich działania jak dotąd nie został dokładnie poznany [7, 8].

Przez długie lata prowadzono pracę nad toksycznością, zjadliwością fragmentów mureiny i w 1974 roku odkryto, że najmniejszym fragmentem peptydoglikanu wykazującym minimum aktywności bakteryjnej (adiuwantowo czynnym) jest muramylodipeptyd MDP, N-acetylo-D-muramylo-L-alanylo-D-izoglutamina (Rys. 2). Otrzymuje się go jedynie na drodze chemicznej syntezy [9], ponieważ enzymatyczna hydroliza materiału biologicznego prowadzi jedynie do otrzymania muramylotripeptydów (MTP), które wykazują się podobnie jak MDP właściwościami immunostymulacyjnymi.

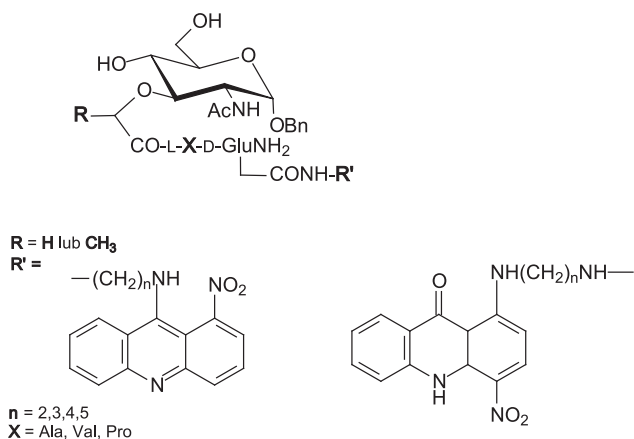


Rysunek 2. Budowa muramylodipeptydu (MDP)
Figure 2. Structure of muramyldipeptide (MDP)

Ze względu na znaczne właściwości biologiczne tego najmniejszego fragmentu przeprowadzono szeroki zakres badań mających na celu otrzymanie jego analogów. Starano się zwiększyć, a niekiedy nawet polepszyć jego właściwości farmakologiczne [10]. Synteza tego typu fragmentów nastręcza niekiedy wielu problemów. Pionierem w tego typu pracy był Arendt wraz ze swoimi współpracownikami [11]. Przedstawił on nowy sposób otrzymywania muramyllopeptydów, będących pochodnymi peptydowymi o skomplikowanej strukturze. Zademonstrował syntezę muramylotetrapeptydu, stanowiącego odpowiednik naturalnego fragmentu ściany komórkowej bakterii [12].

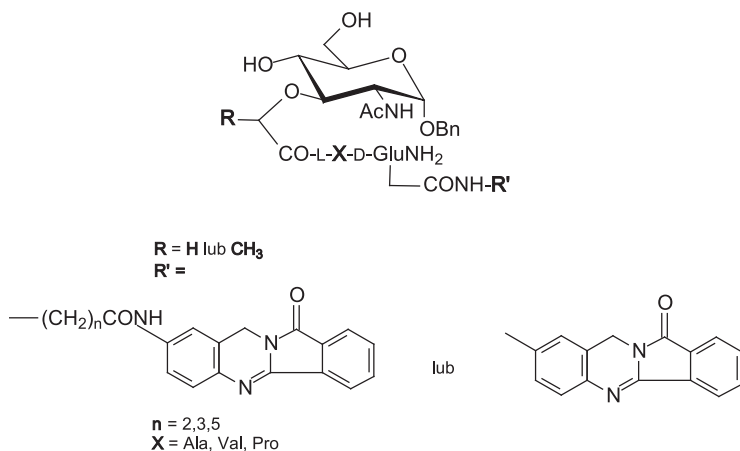
Warte uwagi są również prace Azuma i współpracowników, zajmujących się syntezą wielu pochodnych MDP. Część z nich stanowiły pochodne acylowane w pozycji C-6 reszty cukrowej różnymi kwasami karboksylowymi, m.in. kwasem mykolinowym. Niektóre z nich wykazały się silne właściwości przeciwnowotworowe, np. chinylowe pochodne analogu MDP [13].

Przez ostatnie kilkanaście, a nawet kilkadziesiąt lat otrzymano bardzo wiele analogów MDP oraz nor-MDP o stwierdzonej lub potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej czy immunomodulacyjnej. Niektóre z nich stanowią pochodne 1-nitroakrydyny/4-nitroakrydonu (Rys. 3) lub batracykliny (Rys. 4), tuftsyny oraz ich pochodnych. Nad tego typu połączeniami prace prowadzone są m.in. przez grupę prof. Dzierzbickej i prof. Kołodziejczyka [14].



Rysunek 3. Pochodne 1-nitroakrydyny/4-nitroakrydonu [14]

Figure 3. 1-Nitroacridine/4-nitroacrydone derivatives [14]



Rysunek 4. Pochodne batracykliny [14]

Figure 4. Batracyclin derivative [14]

W budowie komórki peptydoglikan pełni wiele funkcji, odpowiedzialny jest m.in. za utrzymanie ciśnienia osmotycznego, kształt oraz nadaje jej wielkość. Stanowi przykład cylindrycznego lub kulistego nierozpuszczalnego polimeru, zapewniającego mechaniczną ochronę przed czynnikami zewnętrznymi oraz turgorem wewnątrzkomórkowym.

Ważnym etapem prac nad peptydoglikanem były badania nad jego grubością, a wysuwane wnioski zależne były od zastosowanej metody. Początkowo do pomiarów wykorzystywano transmisyjny mikroskop elektronowy (TEM), a próbkę odwadniano i utrwalano. Inna metoda opierała się na określeniu ilości znakowanych radioaktywnie składników mureiny, a następnie przy użyciu wzorów chemicznych dokonaniu odpowiednich wyliczeń. Na tej podstawie określono grubość mureiny dla *E. coli* wahającej się w granicach od 1 do 3 nm. Zastosowanie mikroskopii sił atomowych AFM (ang. *Atomic Force Microscopy*) odzwierciedlało wyniki bliższe warunkom panującym *in vivo*. Pomiarы prowadzone były w środowisku wodnym i wskazywały, że grubość warstwy dla *E. coli* wynosi około 6 nm, zaś dla gronkowca złocistego 20–40 nm.

1.3. STRUKTURA TRZECIORZĘDOWA

Pomimo intensywnych badań i zdobycia znacznej wiedzy o właściwościach fizycznych i biologicznych, syntezie chemicznej czy biosyntezie peptydoglikanu, nie udało się jak dotąd w sposób jednoznaczny określić jej trójwymiarowej struktury. Pierwsze hipotezy na jej temat powstawały już w latach 70-tych. Wówczas, ze względu na obecność wiązania $\beta(1\rightarrow4)$ O-glikozydowego w mureinie, sądzono, że polimery glikanowe wykazują analogię do chityny. Budowa jej wydaje się stosunkowo prosta i sztywne, do reszty MurNAc przyłączone są dodatkowo łańcuchy peptydowe, ułożone w jednym kierunku [15].

Kolejne hipotezy zwracały uwagę na konieczność tworzenia się wiązań wodorowych w obrębie struktury. Kelman i Rogers zasugerowali, że oddziaływania te powstają pomiędzy sąsiadującymi łańcuchami peptydowymi, pochodzącymi od dwóch różnych łańcuchów glikanu. Dalsze badania wskazywały, że wiązania wodorowe tworzą się w obrębie jednego peptydu, a nie jak wcześniej przypuszczano dwóch sąsiadujących, przyjmując postać $2_2,7$ helisy [15].

Wykorzystanie spektroskopii w podczerwieni i analizy rentgenograficznej pozwoliło ustalić, że łańcuchy cukrowe w przeciwieństwie do chityny nie są ani proste ani sztywne, lecz przyjmują postać prawoskrętnej helisy. Obrót następuje co 4 dwucukrowe podjednostki, z których pod kątem prostym wychodzą łańcuchy peptydowe, ułożone prostopadle względem siebie.

Kolejny proponowany model zakładał, że łańcuchy glikanu przyjmują kształt długich cylindrów (ang. *long cylinders*) [16] lub rozciągniętej liny (ang. *stretched ropes*) [17] otoczonej ciasną spiralą pojedynczych podstawników peptydowych. Poszczególne warstwy glikanu ułożone były względem siebie i powierzchni komórki

równolegle, dodatkowo obrócone o kąt 60° względem sąsiedniego łańcucha. W ten sposób warstwa mureiny przyjmowała kształt „sklejki” (ang. „plywood”-type). Wymusza ona duże konformacyjne zniekształcenie względem łańcuchów peptydowych, osiągając tym samym duży stopień ich usieciowania.

Zastosowanie metod modelowania molekularnego pozwoliło na zaproponowanie prostopadłego ułożenia łańcuchów glikanu do powierzchni komórki bakteryjnej, tzw. model rusztowy (ang. *scaffold model*). Gwarantuje on wysoki stopień usieciowania sięgający nawet 80–90%, co zgodne jest z uzyskanymi wcześniej danymi eksperymentalnymi [18, 19]. Za tym modelem przemawiają obliczenia i badania wykonane m.in. przez Dimitrieva [20].

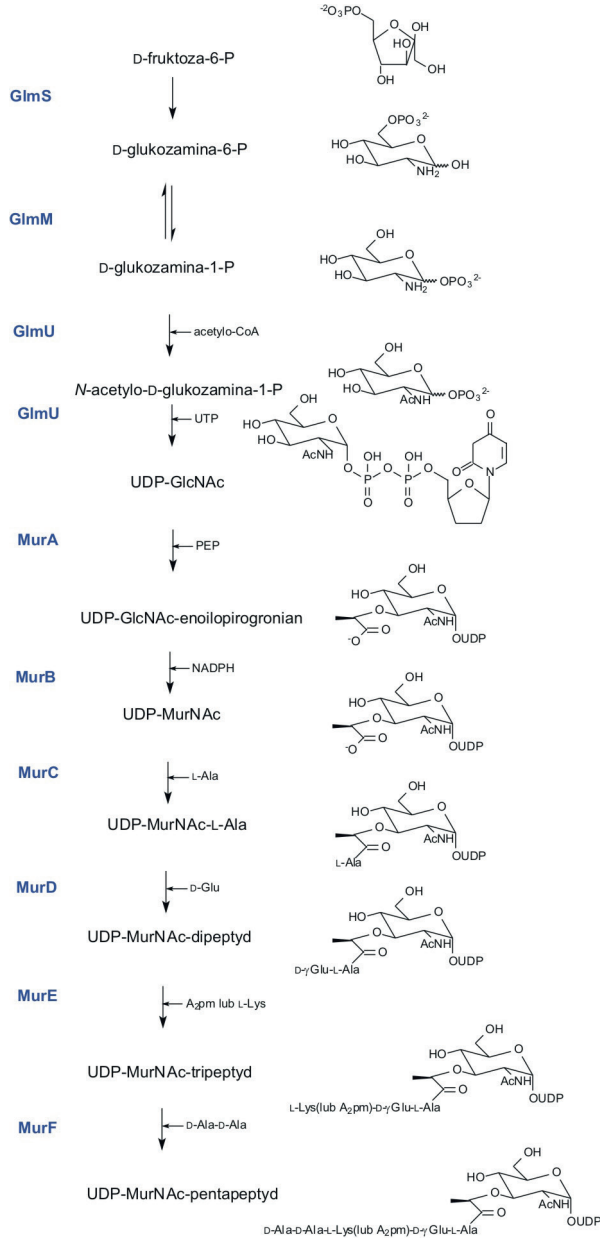
Do czasu opracowania metod wizualizacji *in vivo* budowy komórki na poziomie molekularnym trudno będzie wskazać właściwą teorię ułożenia łańcuchów mureiny. Związane jest to z różnorodnością typów peptydoglikanu występujących w przyrodzie, stopniem ich usieciowania oraz ilością tworzących się warstw. Zasadnicze różnice dotyczą mureiny bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich. Przypuszcza się, że *S. aureus* jest przykładem najbardziej usieciowanego i niezwyklego typu mureiny i jedynie metoda rusztowa może w pełni odzwierciedlać jego strukturę.

1.4. BIOSYNTETA

Historia badań nad biosyntezą fragmentu peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii sięga już półwiecza. Park jako pierwszy wyizolował z hodowli gronkowca złocistego „traktowanego” penicyliną prekursor nukleotydu odpowiedzialnego za rozrost peptydoglikanu, a było to w czasach gdy nie wiadano jeszcze o istnieniu takiej makromolekuły [21].

Lata intensywnych badań doprowadziły do wysunięcia wniosku, że na biosyntezę mureiny składa się wiele kluczowych etapów. Dokładne określenie/rozgraniczenie, który z nich jest najważniejszy jest bardzo trudne, ale można dokonać podstawowego podziału w zależności od miejsca w komórce, w którym zachodzi ten proces [22, 23]:

- 1) Cytoplazma – w tej części gromadzone są prekursory peptydoglikanu, zbudowane z reszty *N*-acetylo-*D*-glukozaminy i kwasu *N*-acetylo-*D*-muraminowego, do którego grupy karboksylowej przyłączone są krótkie fragmenty peptydowe (Schemat 1) [24];

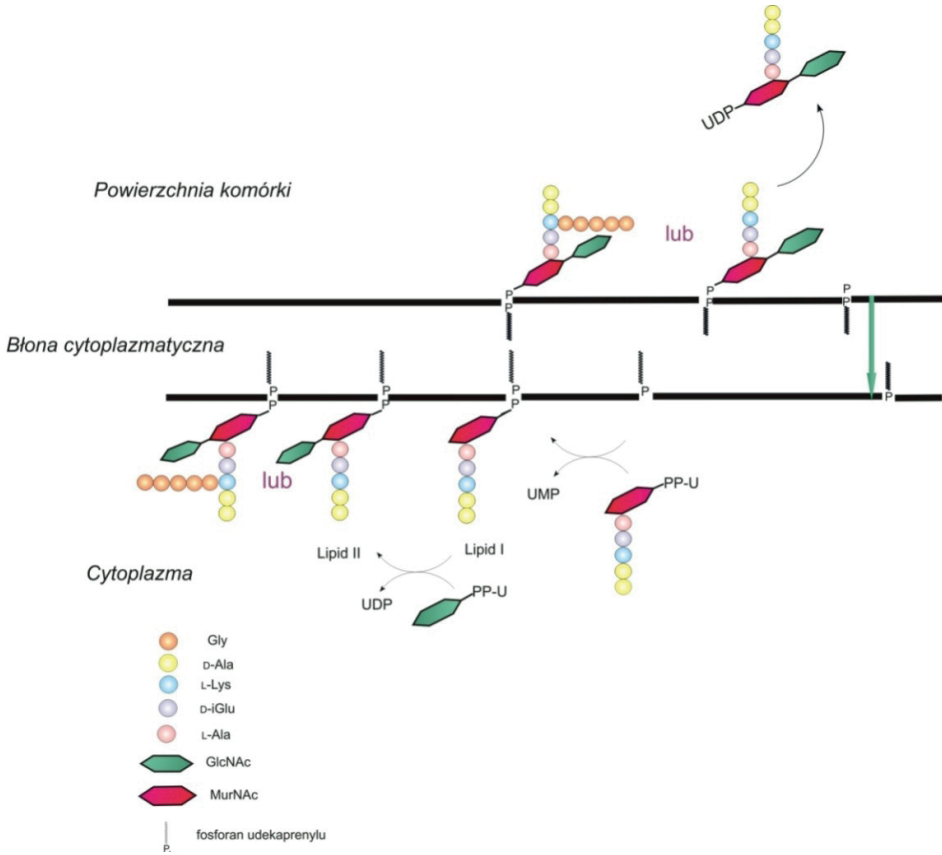


Schemat 1. Synteza prekursorów peptydoglikanu [22]

Scheme 1. Synthesis of precursor of peptidoglycan [22]

- 2) Monomery mureiny następnie przekształcane są w produkty pośrednie – pochodne lipidowo disacharydowo-peptydowe połączone wiązaniem fosforowym (ang. *lipid intermediate disacchride-(peptide)-pyrophosphate*)

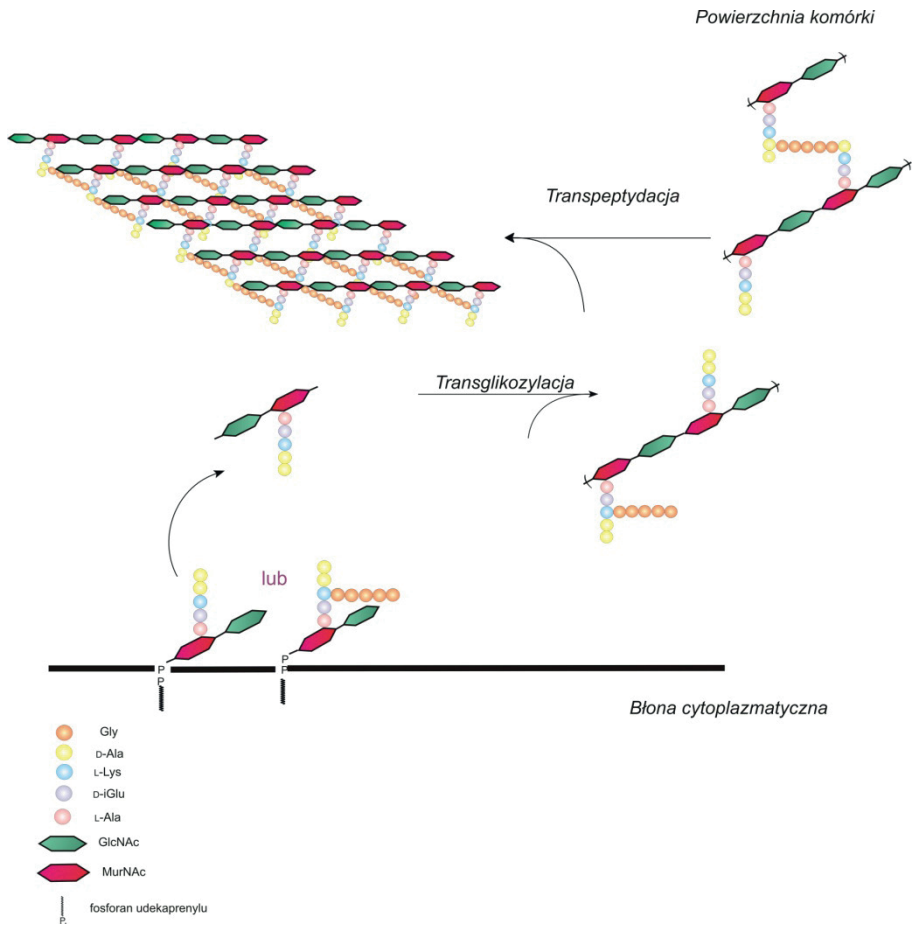
undecaprenol). Powstałe prekursory transportowane są na nośnik lipidowy, który występuje w błonie komórkowej, a następnie przenoszone są przez nią z równoczesnym odłączeniem lipidowego przenośnika-fosforanu undekaprenyłu (Rys. 5). Proces ten przebiega na pograniczu trzech warstw – cytoplazmy, zewnętrznej warstwy komórki, a przede wszystkim w błonie cytoplazmatycznej.



Rysunek 5. Przeniesienie prekursorów peptydoglikanu przez błonę cytoplazmatyczną [25]

Figure 5. The transfer of the peptidoglycan precursor across the cytoplasmic membrane [25]

Ostatni etap polega na polimeryzacji przetransportowanych fragmentów mureiny. Zachodzi on na zewnętrznej warstwie błony komórkowej, w tym momencie ważną rolę odgrywają dwa typy enzymów: glikozylotransferazy – odpowiedzialne za tworzenie się łańcuchowych form glikanów oraz transpeptydazy – prowadzące do powstania usieciowanej, sztywnej struktury mureiny (Rys. 6) [26, 27].

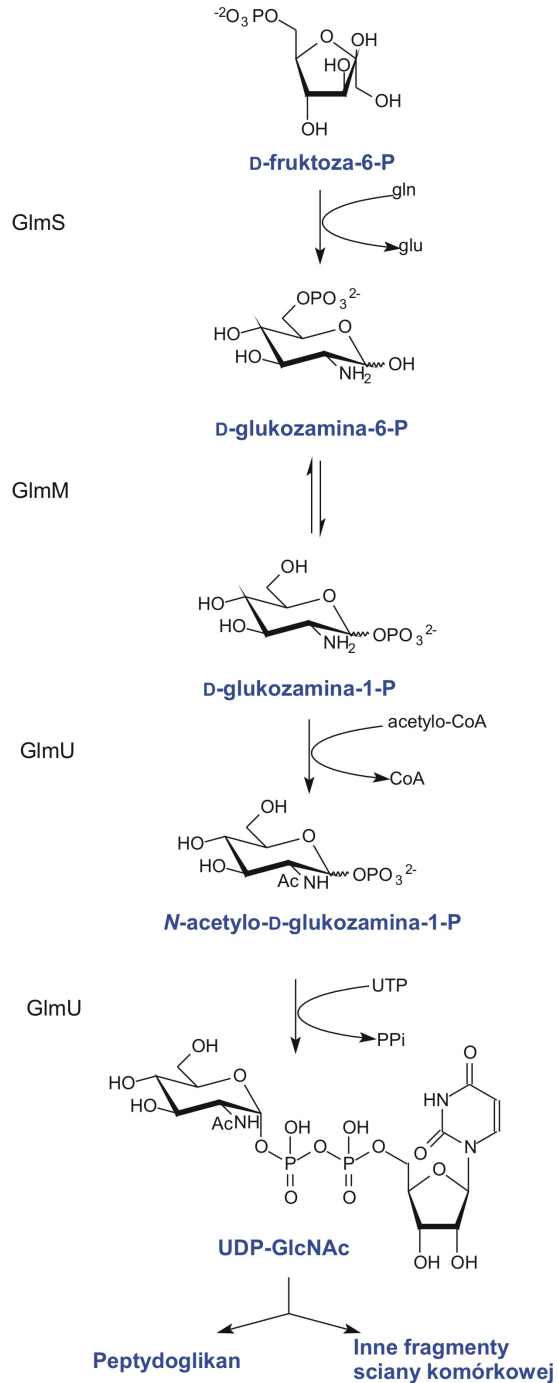


Rysunek 6. Etap działania transpeptydaz i glikozylotransferaz [25]

Figure 6. Place of action of transpeptidase and glycosyltransferase [25]

Biosynteza mureiny jest procesem bardzo złożonym, każdy jej etap pełni ściśle określone funkcje i jest konieczny do prawidłowego rozrostu ściany komórkowej bakterii.

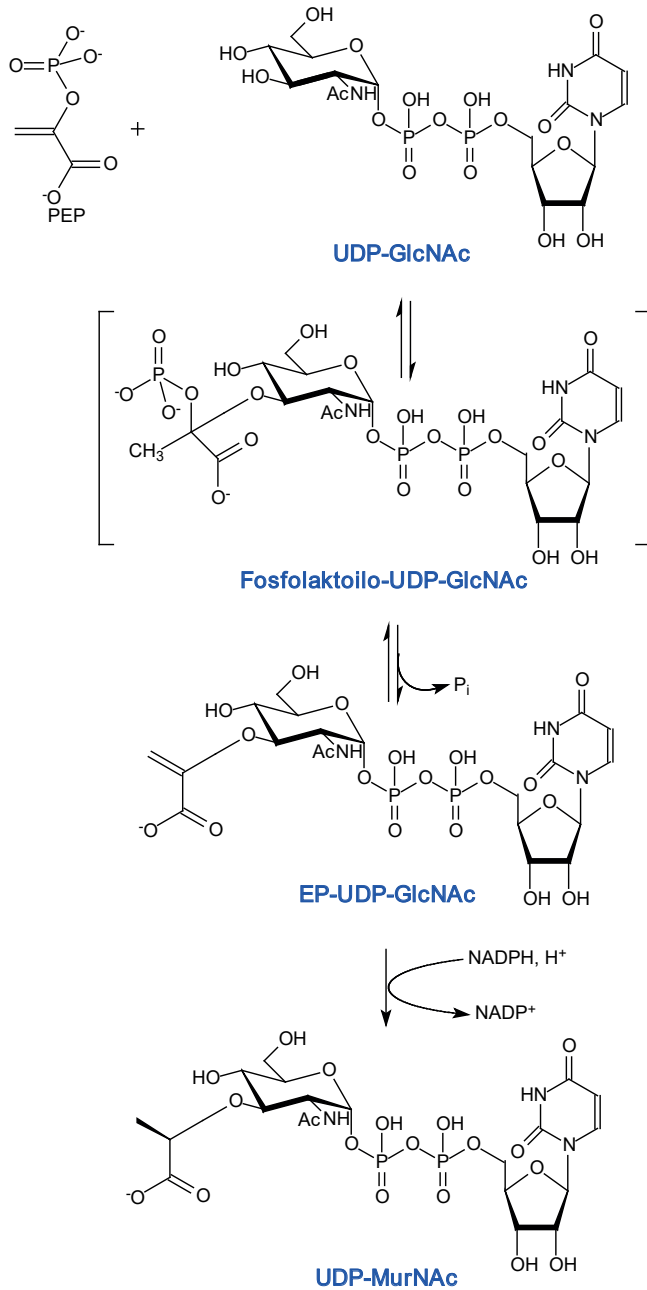
Za najważniejszy prekursor w tworzeniu peptydoglikanu uważana jest UDP-*N*-acetylo-*D*-glukozamina (UDP-GlcNAc). Formowana jest z 6-fosforanu-*D*-fruktozy (Schemat 2). Bierze również udział w powstawaniu innych makromolekuł opartych na strukturze *N*-acetylo-*D*-glukozaminy, takich jak kwasy tejchojowe (w przypadku bakterii Gram-dodatnich) oraz lipopolisacharydy i antygeny enterobakteryjne (bakterie Gram-ujemne) [22, 27–30].

Schemat 2. Powstawanie UDP-*N*-acetylo-*D*-glukozamina (UDP-GlcNAc) [22]Scheme 2. Formation of UDP-*N*-acetyl-*D*-glucosamine (UDP-GlcNAc) [22]

Przekształcenie 6-fosforanu-D-fruktozy w 6-fosforan-D-glukozaminy (Schemat 2) w pierwszym etapie katalizowane jest przez białymowy kompleks L-glutaminazę i aminotransferazę 6-fosforanu-D-fruktozy, która kodowana jest przez gen *glmS* [31]. N-Terminalny koniec domeny glutaminazy odpowiedzialny jest za hydrolizę L-glutaminy, w wyniku której uwalniana jest cząsteczka amoniaku, podczas gdy C-terminalny koniec domeny izomerazy przekształca amoniak i fosforan-6-D-fruktozy w fosforan-6-D-glukozaminy. Następnie ma miejsce przeniesienie grupy fosforanowej z atomu węgla 6 na grupę anomeryczną, w wyniku czego powstaje fosforan-1-D-glukozaminy. Reakcja ta katalizowana jest przez gen *glmM* w przypadku *E.coli*, natomiast w *S. aureus* rolę tę przypisuje się *femD* lub *femR315* [32, 33]. Ważnym etapem biosyntezy jest reakcja acetylowania grupy aminowej fragmentu cukrowego. Istotną rolę w tym procesie odgrywa pochodna koenzymu A. W wyniku przeniesienia grupy acetylowej z acetylo-CoA na 1-fosforan-D-glukozaminy, przy udziale transacetylazy, powstaje N-acetylo-D-glukozamino-1-fosforan. Związek ten w reakcji z UTP ulega dalszym przekształceniom do UDP-N-acetylo-D-glukozaminy (UDP-GlcNAc). Etap ten katalizowany jest przez pirofosfatazę [22].

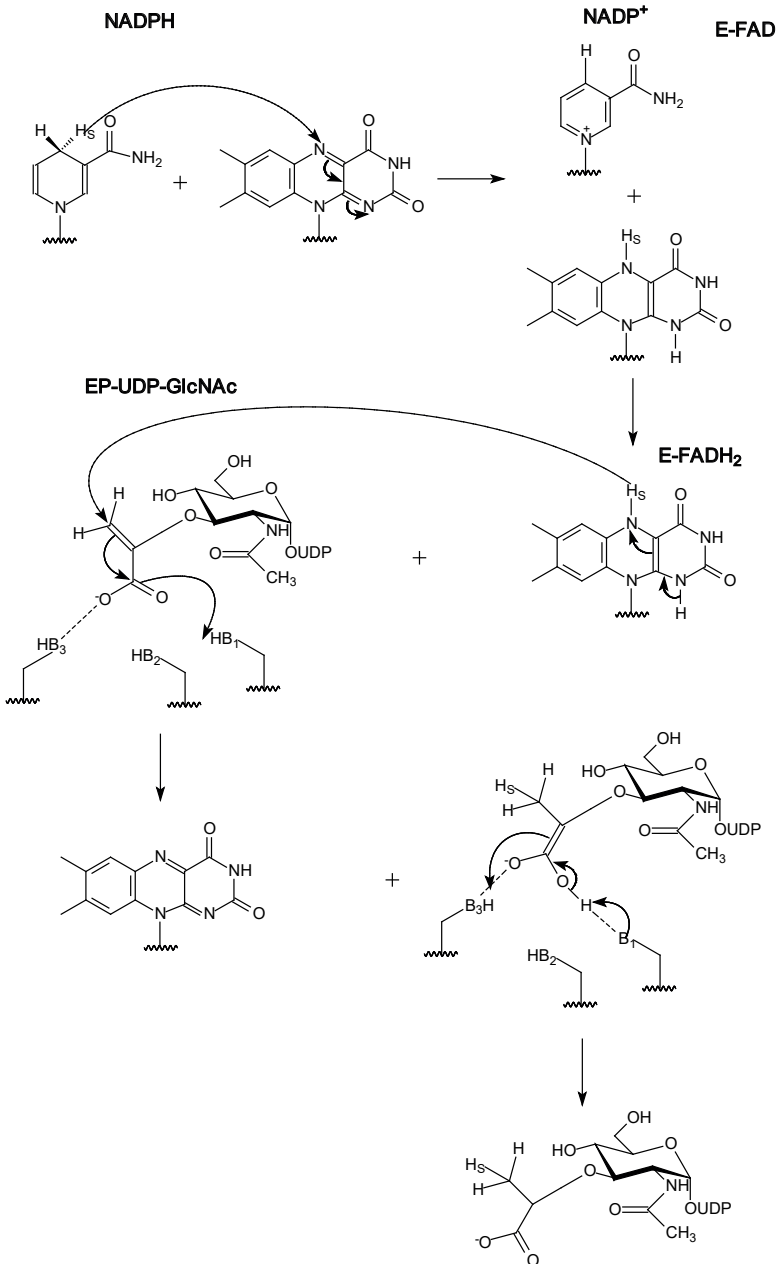
UDP-GlcNAc stanowi istotny, jeśli nie najważniejszy produkt całej biosyntezy. Ponieważ stanowi nie tylko podstawę do syntezy usieciowanej formy peptydoglikanu, poprzez przekształcenie go w pochodną kwasu UDP-N-acetylo-D-muraminowego (UDP-MurNAc), lecz również innych elementów ściany komórkowej bakterii (lipopolisacharydów, kwasów teichojowych itp.).

Ważnym elementem mureiny oprócz pochodnej D-glukozaminy jest pochodna kwasu N-acetylo-D-muraminowego (UDP-MurNAc). Synteza tego fragmentu przebiega w dwóch etapach, z których pierwszy katalizowany jest przez transferazę MurA, a kolejny przez reduktazę MurB. Transferaza enoilopirogroniowa (MurA) tworzy wiązanie eterowe pomiędzy α -fosfoenolopirogronianem, pochodzącego z PEP, a trzecim atomem węgla (C-3) pochodnej UDP-GlcNAc (Schemat 3).



Schemat 3. Otrzymywanie kwasu *N*-acetylo-*D*-muraminowego (UDP-MurNAc) [22]
 Scheme 3. Preparation of *N*-acetyl-*D*-muramic acid (UDP-MurNAc) [22]

W kolejnym etapie powstający UDP-*N*-acetylo-*D*-glukozamino-3-enoilopirronian redukowany jest przez NADPH do *D*-mleczanu, co dokonuje się przy udziale reduktazy MurB (Schemat 4) [22].

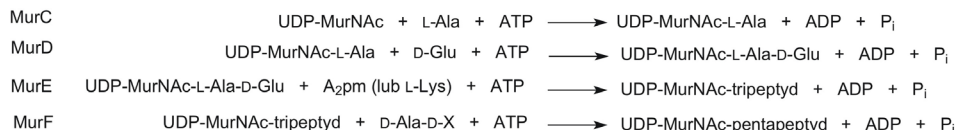


Schemat 4. Mechanizm działania reduktazy MurB [22]

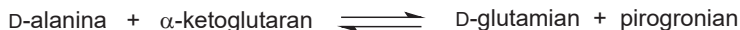
Scheme 4. Mechanism of action MurB reductase [22]

Istotnym momentem formowania peptydoglikanu jest przyłączenie poszczególnych reszt aminokwasowych. Proces ten zachodzi przy udziale specyficznych enzymów oraz ATP. Przebiega on w kilku etapach. Wolna grupa karboksylowa pochodząca z cząsteczki UDP-MurNac pełni rolę akceptora wiązania peptydowego. Do niej przyłączana jest pierwsza reszta aminokwasowa, którą dla większości bakterii jest L-alanina. Odbywa się to przy udziale ligazy MurC. W kolejnym etapie dołączany jest kwas D-glutaminowy (Schemat 5a), będący produktem genu *murI*, odpowiedzialnego za syntezę D-glutaminianu z α -ketoglutaranu (Schemat 5b).

a)



b)

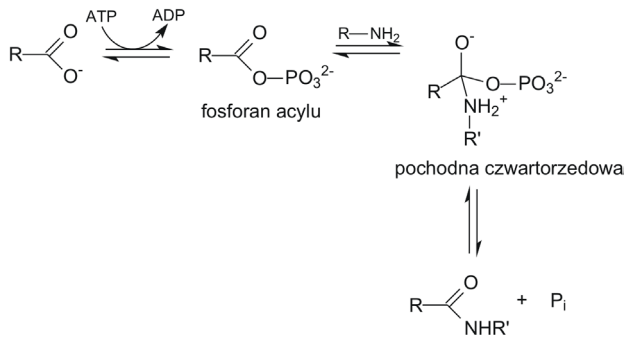


Schemat 5. Mechanizm przyłączenia kolejnych reszt aminokwasowych do kwasu *N*-acetylo-D-muraminowego [22]

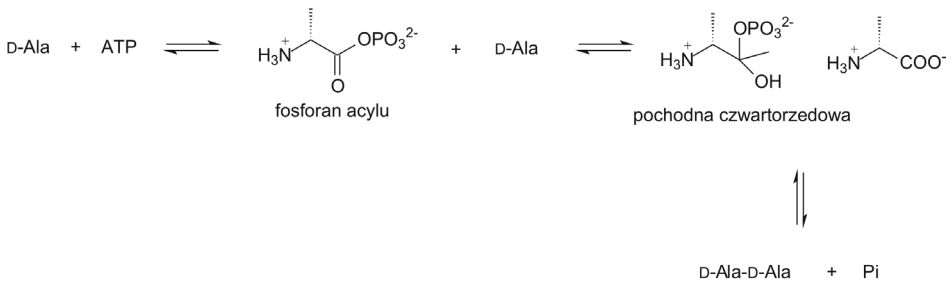
Scheme 5. The substitution of amino acid residues to *N*-acetyl-D-muramic acid [22]

W pozycji trzeciej najczęściej przyłączaną resztą jest L-lizyna. U części bakterii w jej miejsce podstawiana jest reszta kwasu *mezo*-diaminopimelinowego ($A_2\text{pm}$ lub Dap), a w sporadycznych przypadkach miejsce to zastąpione jest przez resztę L-homoseryny, resztę 3-hydroksy- $A_2\text{pm}$, kwasu diaminobutyłowy (ang. *diaminobutyric acid*) czy L-ornitynę.[22] Warto zwrócić uwagę, że pierwsze reszty aminokwasów przyłączane są oddzielnie, jako samodzielne jednostki, natomiast ostatnie dwie reszty w postaci fragmentu dipeptydowego (D-Ala-D-Ala) (Schemat 5a i 6). Fragment ten powstaje w wyniku działania dwóch enzymów racemazy (DdlB), która przekształca resztę L-alaniny w jej D-pochodną oraz ligazy D-alanina:D-alanina (DdlB) syntezującej fragment dipeptydowy. Podczas biosyntezy tego fragmentu ma miejsce zastąpienie C-terminalnej reszty D-alaniny inną resztą aminokwasową, np. D-waliną, glicyną, D-hydroksymaślanem, a w przypadku *S. aureus* najczęściej jest to reszta D-mleczanu. Stanowi to swoisty system odporności bakterii przeciwko stosowanym terapiom antybiotykowym. Istnieją również bakterie, w których *N*-terminalna reszta D-alaniny została zastąpiona przez resztę D-waliny, D-seryny lub D-aminomaślan lub glicynę.

a)



b)



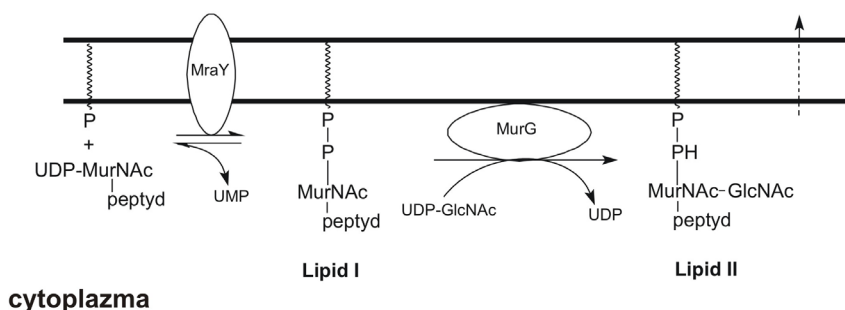
Schemat 6. Mechanizm powstawania fragmentu dipeptydowego (D-alanylo-D-alaniny) [22]

Scheme 6. Formation dipeptide fragment (D-Ala-D-Ala) [22]

Bardzo ważny jest fakt, że wcześniej opisane etapy biosyntezy zachodzą w cytoplazmie komórki bakteryjnej. Mają one na celu namnażanie tak ważnych dla prawidłowego rozrostu mureiny prekursorów, które to następnie przetransportowane zostają z wewnętrznej części komórki bakteryjnej na zewnętrzną warstwę ściany komórkowej. Na ten proces składa się kilka etapów. W pierwszym momencie do powstałego MurNac-pentapeptydu przyłączony zostaje fosforan undekaprenyłu (zwany również baktroprenolem). Występuje on w błonie cytoplazmatycznej i pełni rolę przenośnika lipidowego jednostek budulcowych (peptydoglikanu, lipopolisacharudów czy kwasów teichojowych Rys. 7). W wyniku działania specyficznej translokazy (MraY) powstaje kompleks, noszący nazwę lipidu I (C55-PP-MurNac-pentapeptyd). Związek ten reaguje z UDP-GlcNac. Reakcja ta katalizowana jest przez glikozylotransferazy (MurG), w wyniku czego tworzy się wiązanie β(1→4) O-glikozydowe. Reakcja zachodzi pomiędzy grupą hydroksylową przy 4 atomie węgla pochodnej MurNac a 1 atomem węgla z pochodnej GlcNac, co prowadzi do powstania lipidu II (pochodnej disacharydowopentapeptydowej). Na tym etapie ma miejsce tworzenie się krótkiej liniowej formy peptydoglikanu. Do łańcucha bocznego reszty L-lizyny przyłączane są kolejne reszty aminokwasowe. W przypadku *S. aureus* są to reszty glicyny w wyniku czego powstaje mostek pentapeptydowy.

Powstały lipid II transportowany jest na zewnętrzną stronę błony komórkowej, gdzie następnie jest wbudowywany w istniejącą strukturę peptydoglikanu. Obecne tam transglikozyazy (białka PBP oraz lityczna transglikolaza Mlt) katalizują reakcję zachodzącą pomiędzy grupą hydroksylową przy 4 atomie węgla pochodnej MurNAc pochodzącej z przetransportowanego disacharydopentapeptydu, a anomerycznym atomem węgla z GlcNAc istniejącej mureiny. W wyniku zachodzącego procesu odłączana jest cząsteczka baktroprenolu (C55-PP). W wyniku reakcji hydrolizy związek ten jest regenerowany i w postaci C55-P przenoszony na zewnętrzną stronę błony cytoplazmatycznej, gdzie ulega dalszym reakcjom z pochodną muramylopentapeptydową.

błona cytoplazmatyczna



Rysunek 7. Mechanizm transportowania prekursora peptydoglikanu [22]

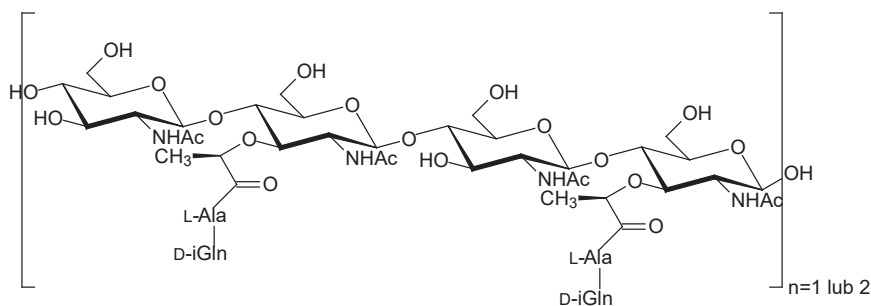
Figure 7. The mechanism of transport peptidoglycan precursor [22]

W zewnętrznej warstwie ściany komórkowej oprócz reakcji transglikozyzacji prowadzącej do wydłużenia się formy łańcuchowej mureiny, zachodzą również procesy transpeptydacji. Polegają one na tworzeniu się poprzecznych wiązań peptydowych pomiędzy nowymi jednostkami budulcowymi a istniejącymi fragmentami peptydoglikanu. Sprawia to, że struktura mureiny przyjmuje usieciowaną postać, podobną do sakulusu (woreczka mureinowego). Transpeptydacja opiera się na usunięciu C-terminalnej reszty D-alaniny, a w jej miejsce przyłączane są istniejące mostki peptydowe.

1.5. SYNTEZA CHEMICZNA

Ze względu na istotne role biologiczne jakie spełniają fragmenty mureiny, a także problem z ich izolowaniem z materiału biologicznego wiele ośrodków naukowych podjęło się próby ich chemicznej syntezy. Do badań biologicznych zaczęto wykorzystywać fragmenty peptydoglikanu syntezowane chemicznie, co gwarantowało zarówno jednolitą i pewną strukturę, a zarazem wysoką czystość stosowanych związków.

Przez długi okres czasu dużym zainteresowaniem cieszyły się syntezy fragmentów muramylo-dipeptydowych (MDP), będących najkrótszymi fragmentami peptydoglikanu adiuwantowo czynnymi. Okazało się jednak, że dłuższe fragmenty peptydoglikanu wykazują się innymi właściwościami biologicznymi w porównaniu z MDP, dlatego też, synteza takich fragmentów stała się źródłem zainteresowania kilku ośrodków badawczych. W 2001 roku pojawiła się praca opisująca syntezę fragmentu tetrasacharydowego oraz oktasacharydowego peptydoglikanu (Rys. 8). Składały się one z powtarzających się jednostek disacharydowych, zbudowanych z reszty *N*-acetylo-*D*-glukozaminy (GlcNAc) i kwasu *N*-acetylo-*D*-muraminowego (MurNAc) połączonych wiązaniem $\beta(1\rightarrow4)$ *O*-glikozydowym [34]. Do grupy karboksylowej pochodzącej z reszty MurNAc przyłączone zostały fragmenty dipeptydowe *L*-alaniny-*D*-izoglutaminy (*L*-Ala-*D*-iGln) [35].

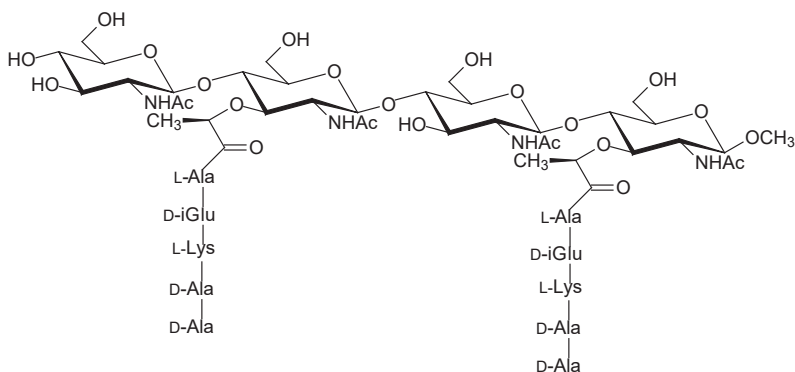


Rysunek 8. Fragment tetra- i oktasacharydowy peptydoglikanu [34, 35]

Figure 8. Tetra- and octasacchride peptidoglycan fragments [34, 35]

Prowadzone badania nad czynnikami wywołującymi szok septyczny (ang. *septic shock*) nasuwały wniosek, że odpowiedzialne są za niego ogólnoustrojowe stany zapalne wywołane w skutek obecności peptydoglikanu (PGN) we krwi pacjentów.

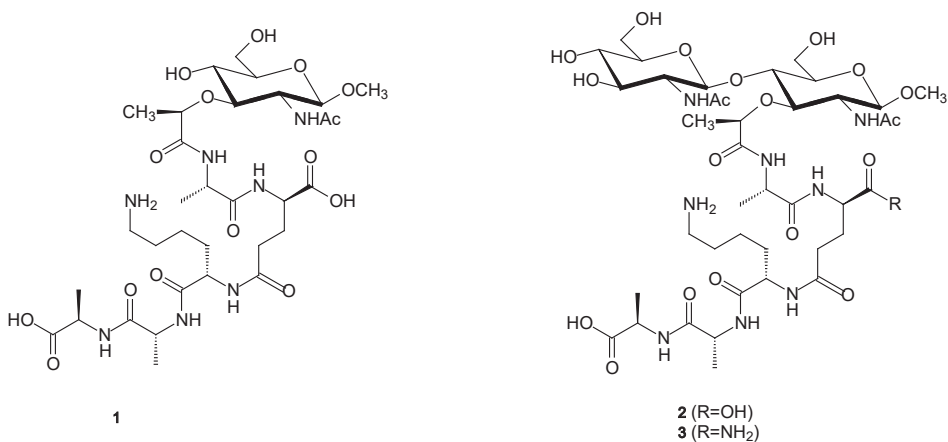
Badania nad coraz bardziej złożoną strukturą mureiny doprowadziły do publikacji w 2004 r., w której Heseka i jego współpracownicy przedstawili syntezę tetrasacharydu, w którym do reszty kwasu mlekowego kwasu *N*-acetylo-*D*-muramyloowego przyłączony był pentapeptyd. Otrzymane przez nich połączenie stanowi podłużny fragment peptydoglikanu ze ściany komórkowej bakterii Gram-dodatniej [36].



Rysunek 9. Fragment terasacharydowy otrzymany przez Heseka i in. [36]

Figure 9. Tertasaccharide fragment prepared by Heseka et al. [36]

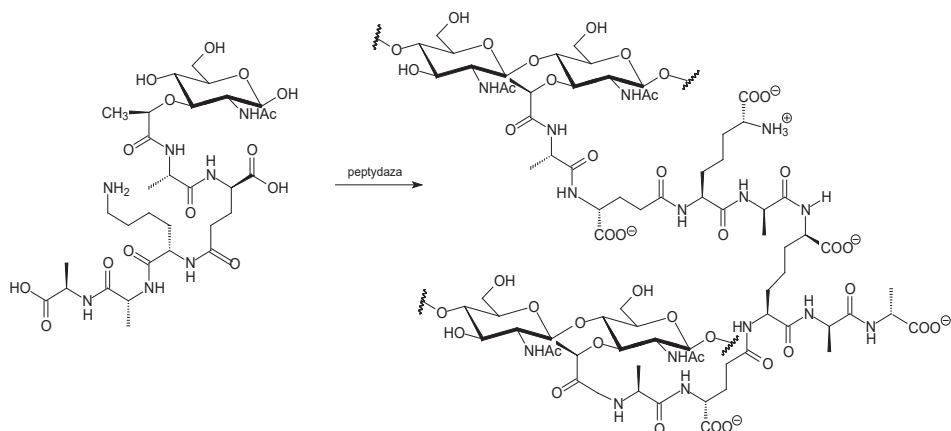
Oprócz tego otrzymali krótsze fragmenty peptydoglikanu, odpowiednio mono-, disacharydowe, które wykorzystali do badania wzajemnego oddziaływania z wankomycyną [37].



Rysunek 10. Pochodne mono- i disacharydowe peptydoglikanu [37]

Figure 10. Mono- and disaccharide derivatives of the peptidoglycan fragment [37]

Dodatkowo fragmenty disacharydowe posłużyły im do przygotowania dime-rów peptydoglikanu (Schemat 7).



Schemat 7. Dimery peptydoglikanu [38]

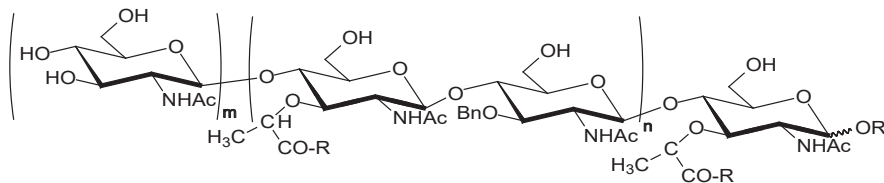
Scheme 7. Dimers of peptidoglycan [38]

Dużym zainteresowaniem oprócz syntezy określonych fragmentów peptydoglikanu, cieszą się również badania biologiczne otrzymanych związków. Związane jest to z bardzo dobrymi właściwościami immunopotentatywnymi (ang. *immunopotentiating*) fragmentów mureiny. Podejrzewa się, że PGN odpowiedzialny jest za stymulację receptorów TLR 2 oraz membrany CD14 (mCD14). Badania prowadzone przez dwie niezależne grupy badawcze Dziarskiego [38] i Boneca [39] doprowadziły do wysunięcia sprzecznych wniosków.

Inamura wraz ze współpracownikami [40] podjęli próbę zbadania wpływu długości łańcucha zarówno peptydowego oraz cukrowego na aktywność mCD14 i TLR2. W tym celu wykorzystano fragmenty tetrasacharydowe z przyłączonym fragmentem di-, tri-, tetra- oraz pentapeptydowym, a także oktasacharyd z podstawionym fragmentem dipeptydowym. Okazało się, że niepodstawione fragmenty glikanu nie wykazują się właściwościami immunostymulacyjnymi. Wskazuje to, że obecność fragmentów peptydowych jest konieczna do wywołania odpowiedzi immunologicznej. Największą aktywnością odznaczał się fragment trisacharydowy z przyłączoną pochodną tripeptydową (Tab. 1).

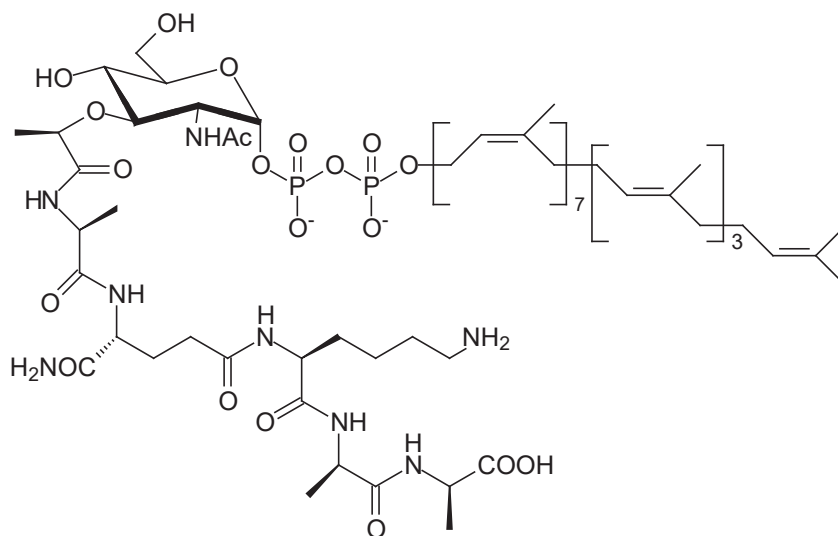
Tabela 1. Fragmenty peptydoglikanu otrzymane przez Inamurę i jego współpracowników mające wpływ na aktywność mCD14 i TLR2 [40]

Table 1. Peptidoglycan fragments prepared by Inamura, et al. with affecting the activity of mCD14 and TLR2 [40]



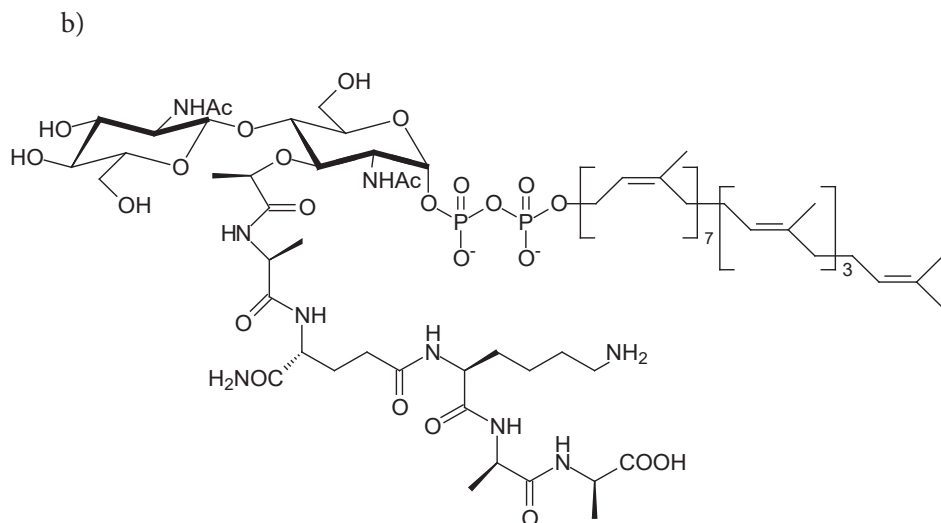
| Związek | R' | R |
|---------|--------------|------------------------------------|
| 4 | H | L-Ala-D-iGln |
| 5 | H | L-Ala-D-iGln-L-Lys |
| 6 | H | L-Ala-D-iGln-L-Lys-D-Ala |
| 7 | α -Pr | L-Ala-D-iGln-L-Lys(Ac) |
| 8 | α -Pr | L-Ala-D-iGln-L-Lys(Ac)-D-Ala |
| 9 | α -Pr | L-Ala-D-iGln-L-Lys-D-Ala-D-Ala |
| 10 | α -Pr | L-Ala-D-iGln-L-Lys(Ac)-D-Ala-D-Ala |
| 11 | α -Pr | OH |

a)



Rysunek 11. Struktura lipidu I oraz lipidu II otrzymanego przez prof. van Nienwenhze i Blaszczyka [41]

Figure 11. Structure of lipid I and II prepared by van Nienwenhze i Blaszczyk [41]



Rysunek 11. Ciąg dalszy

Figure 11. Continuation

Przeprowadzono także próby otrzymania prekursorów biosyntezy peptydoglikanu. Grupie profesora Blaszcak udało się przeprowadzić z wielkim sukcesem syntezę zarówno fragmentu lipidu I oraz lipidu II (Rys. 11) [41].

UWAGI KOŃCOWE

Synteza fragmentów peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii jest procesem bardzo złożonym i wymaga zastosowania wielu ortogonalnych względem siebie osłon grup funkcyjnych przyłączanych reszt aminokwasowych, czy grup hydroksylowych fragmentu cukrowego. Jednakże otrzymanie tego typu fragmentów na drodze chemicznej pozwala na uzyskanie materiału biologicznego o wysokiej czystości. Proces ten jest jednym z elementów niezbędny do poznania istoty wirulentności i toksyczności ściany komórkowej bakterii.

PODZIĘKOWANIE

Praca współfinansowana przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (POIG.01.01.02-14-102/09) oraz DS 530-8455-D 501-15.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] W. Weidel, H. Pelzer, *Adv. Enzymol. RAMB*, 1964, **26**, 193.
- [2] a) W.W. Navarre, O. Schneewind, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999, **63**, 174; b) A.K. Rai, S.B. Rai, D.K. Rai, *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 2003, **626**, 53; c) J. Heijenoort, *Glycobiology*, 2001, **11**, 25R; d) N. Kubasch, R.R. Schmidt, *Eur. J. Org. Chem.*, 2002, 2710.
- [3] S. Inamura, Y. Fujimoto, A. Kawasaki, Z. Shiokawa, E. Woelk, H. Heine, B. Lindner, N. Inohara, S. Kusumoto, K. Fukase, *Org. Biomol. Chem.*, 2006, **4**, 232.
- [4] a) S. Bauer, C.J. Kirchning, H. Hacker, V. Redecke, S. Hausmann, S. Akira, H. Wagner, G.B. Lipford, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, **98**, 9237; b) A.J. Ulmer, T.E. Rietschel, H. Heine, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 2002, **14**, 53.
- [5] a) B. Pulendran, K. Palucka, J. Banchereau, *Science*, 2001, **293**, 253; b) R. Medzhitov, C.A. Janeway Jr., *Science*, 2002, **296**, 298; *Chem.*, 1973, **27**, 349.
- [6] T.E. Rietschel, J. Schletter, B. Weidemann, V. El-Samalouti, U.Z.T. Mattern, U. Seydel, H. Brade, D.H. Flad, S. Kusumoto, D. Guta, R. Dziarski, J.A. Ulmer, *Microb. Drug Resist.*, 1998, 4.
- [7] A.M. Kołodziejczyk, A.S. Kołodziejczyk, *Post. Bioch.*, 1987, **33**, 203.
- [8] K. Dzierzbicka, A.M. Kołodziejczyk, *Polish J. Chem.*, 2003, **77**, 373.
- [9] F. Ellouz, A. Adam, R. Ciorbaru, E. Lederer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, **59**, 1317.
- [10] a) A. Adam, E. Lederek, *Med. Res. Rev.*, 1984, **4**, 111; b) A. Adam, E. Lederer, *Immunology*, 1988, **1**, 205; c) J.P. Devlin, K.D. Hargrave, *Tetrahedron*, 1989, **45**, 4327; d) A. Hasegawa, H. Okumura, M. Kiso, *Res. Bull. Fac. Arg. Gifu University*, 1979, **42**, 169; *C.A.*, 93, 239878z (1980); e) K. Matsumoto, H. Ogawa, T. Kusama, O. Nagase, N. Sawaki, M. Inage, S. Kusumoto, T. Shiba, I. Azuma, *Infect. Immun.*, 1981, **32**, 748; g) S. Kusumoto, M. Inage, T. Shiba, I. Azuma, Y. Yamamura, *Tetrahedron Lett.*, 1978, **49**, 4899.
- [11] a) A. Arendt, A.M. Kołodziejczyk, T. Sokołowska, *Rocz. Chem.*, 1972, **46**, 1707; b) A. Arendt, A.M. Kołodziejczyk, T. Sokołowska, *Rocz. Chem.*, 1974, **48**, 1707.
- [12] A. Arendt, A.M. Kołodziejczyk, T. Sokołowska, *Pol. J. Chem.*, 1974, **48**, 1921.
- [13] S. Kobayashi, T. Fukuda, H. Yukimasa, M. Fujino, I. Azuma, Y. Yamamura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1984, **57**, 3182.
- [14] K. Dzierzbicka, A.M. Kołodziejczyk, *J. Med. Chem.*, 2001, **44**, 3606; K. Dzierzbicka, P. Trzonkowski, P. Sewerynek, A. Myśliwski, *J. Med. Chem.*, 2003, **46**, 978.
- [15] a) H. Formanek, S. Formanek, H. Wawra, *Eur. J. Biochem.*, 1974, **46**, 279; b) H. Formanek, K.H. Schleifer, H.P. Seidel, *FEBS Lett.*, 1976, **70**, 150; c) M.V. Kelemen, H. Rogers, *J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1971, **68**, 992.
- [16] a) H. Labischinski, G. Barnickel, H. Bradaczek, P. Giesbrecht, *Eur. J. Biochem.*, 1979, **95**, 147; b) H. Labischinski, G. Barnickel, D. Naumann, P. Keller, *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.*, 1985, **136A**, 45.
- [17] H. Labischinski, H. Maidhof, *Bacterial peptidoglycan: overview and evolving concepts*, [w:] J.M. Ghuyssen, R. Hackenbeck (Red.), *Bacterial cell wall*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands., 1994, 23.
- [18] D. Gally, A.R. Archibald, *J. Gen. Microbiol.*, 1993, **139**, 1907.
- [19] M.A. Snowden, H.R. Perkins, A.W. Wyke, M.V. Hayes, J.B. Ward, *J. Gen. Microbiol.*, 1989, **135**, 3015.
- [20] B.A. Dmitriev, F.V. Toukach, O. Holst, E.T. Rietschel, S. Ehlers, *Journal of Bacteriology*, 2004, **186**, 7141.
- [21] J.T. Park, *J. Biol. Chem.*, 1952, **194**, 877.
- [22] J. van Heijenoort, *Nat. Prod. Rep.*, 2001, **18**, 503.

- [23] a) Z. Markiewicz, Z.A. Kwiatkowski, *Bakterie Antybiotyki Lekooporność*, 2008, Wydawnictwo Naukowe PWN; b) J. van Heijenoort, [w:] *Bacterial Cell Wall*, J.-M. Ghuyesen, R. Hakenbeck (Red.), Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1994, 39.
- [24] M. Ge, Z. Chen, R. Onishi, J. Kohler, L.L. Silver, R. Kerns, S. Fukuzawa, Ch. Thompson, D. Kahne, *Science*, 1999, **284**, 507.
- [25] a) C. Goffin, J.-M. Ghuyesen, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1998, **62**, 1079; b) J. van Heijenoort, *Glycobiology*, 2001, **11**, 25R.
- [26] a) M. Matsuhashi, in *Bacterial Cell Wall*, ed. J.-M. Ghuyesen and R. Hakenbeck, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1994, 55; b) J.-M. Ghuyesen, G. Dive, [w:] *Bacterial Cell Wall*, J.-M. Ghuyesen, R. Hakenbeck (Red.), Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1994, 103.
- [27] H.M. Pooley, D. Karamata, *In Bacterial Cell Wall*, J.-M. Ghuyesen R. Hakenbeck (Red.), Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1994, 187.
- [28] C.R.H. Raetz, [w:] *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, F.C. Neidhardt, R. Curtis III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, H.E. Umbarger (Red.), ASM Press, Washington, D.C., 1996, 1035.
- [29] P.D. Rick, R.P. Silver, [w:] *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, F.C. Neidhardt, R. Curtis III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, H.E. Umbarger (Red.), ASM Press, Washington, D.C., 1996, 104.
- [30] R.J. White, *Biochem. J.*, 1968, **106**, 847.
- [31] H.C. Wu, T.C. Wu, *J. Bacteriol.*, 1971, **105**, 455.
- [32] L. Jolly, S. Wu, J. van Heijenoort, H. de Lencastre, D. Mengin-Lecreulx, A. Tomasz, *J. Bacteriol.*, 1997, **179**, 5321.
- [33] P. Glanzmann, J. Gustafson, H. Komatsuzawa, K. Ohta, B. Berger-Bächli, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, **262**, 202.
- [34] S. Inamura, K. Fukase, S. Kusumoto, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 7613.
- [35] A.R. Chowdhury, A. Siriwardena, G.J. Boons, *Tetrahedron Lett.*, 2002, **43**, 7805.
- [36] D. Heseck, M. Lee, K. Morio, S. Mobashery, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 2137.
- [37] C. Fuda, D. Heseck, M. Lee, K. Morio, T. Nowak, Sh. Mobashery, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 2056.
- [38] R. Dziarski, D. Gupta, *Infect. Immun.*, 2005, **73**, 5212.
- [39] L.H. Travassos, S.E. Girardin, D.J. Philpott, D. Blanot, M.A. Nahori, C. Werts, I.G. Boneca, *EMBO Rep.*, 2004, **5**, 1000.
- [40] S. Inamura, Y. Fujimoto, A. Kawasaki, Z. Shiokawa, E. Woelk, H. Heine, B. Lindner, N. Inohara, S. Kusumoto, K. Fukase, *Org. Biomol. Chem.*, 2006, **4**, 232.
- [41] M.S. VanNieuwenhze, S.C. Mauldin, M. Zia-Ebrahimi, B.E. Winger, W.J. Hornback, Sh.L. Saha, J.A. Aikins, L.C. Blaszczak, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 3656.

Praca wpłynęła do Redakcji 17 czerwca