

GLIKOZYLACJA BIAŁEK W KOMÓRKACH BAKTERYJNYCH I JEJ POTENCJALNE ZASTOSOWANIA

Agnieszka Wyszyńska*, Rafał Jabłuszewski

Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Wpłynęło we wrześniu 2020 r., zaakceptowano w styczniu 2021 r.

Streszczenie: Glikokoniugaty bakteryjne są szeroko rozpowszechnione i mają różnorodne funkcje biologiczne. Przykładem są glikoproteiny, które uczestniczą w adhezji, inwazji czy unikaniu mechanizmów obronnych gospodarza. Systemy umożliwiające tę modyfikację są od niedawna obiektem intensywnych badań naukowych. Ich aktywność opiera się na działaniu glikozylotransferaz – enzymów, które przenoszą reszty cukrowe bezpośrednio na białko akceptorowe (glikozylacja sekwencyjna) lub na lipidowy nośnik, z którego glikan na docelowe białko przenosi transferaza oligosacharydowa (glikozylacja *en-bloc*). Wprowadzenie genów odpowiadających za glikozylację białek do komórek *E. coli* i uzyskanie funkcjonalnych, rekombinowanych glikoprotein, spowodowało rozwój glikoinżynierii bakteryjnej. Transferazy oligosacharydowe wykazują aktywność wobec szerokiej gamy substratów, co można wykorzystać m.in. do produkcji szczepionek polisacharydowych.

1. Potranslacyjne modyfikacje białek. 2. Glikozylacja – charakterystyka. 3. Glikozylacja białek w komórkach organizmów eukariotycznych. 4. Glikozylacja białek u bakterii. 4.1. O-glikozylacja w komórkach bakteryjnych. 4.2. N-glikozylacja u organizmów prokariotycznych. 5. Praktyczne zastosowania glikozylacji białek – glikoinżynieria. 6. Podsumowanie

PROTEIN GLYCOSYLATION IN BACTERIAL CELLS AND ITS POTENTIAL APPLICATIONS

Abstract: Bacterial glycoconjugates are widespread and have diverse biological functions. Multiple bacterial glycoproteins are involved in adhesion, invasion or evasion of host defense mechanisms. A range of glycosylation pathways has recently been an object of intense research. Their activity is based on the glycosyltransferases – enzymes that transfer sugar moieties directly to the acceptor protein (sequential glycosylation) or to a lipid carrier from which the glycan is transferred by an oligosaccharyltransferase onto the target protein (*en-bloc* glycosylation). Successful implementation of complete glycosylation systems in *Escherichia coli* cells resulted in rapid development of bacterial glycoengineering. Oligosaccharyltransferases are characterized by a broad substrate specificity which may be exploited to produce glycoconjugate vaccines.

1. Post-translational protein modifications. 2. Characteristics of glycosylation. 3. Protein glycosylation in eukaryotic cells. 4. Protein glycosylation in bacteria. 4.1. O-glycosylation in bacterial cells. 4.2. N-glycosylation in bacterial cells. 5. Practical applications of protein glycosylation – glycoengineering. 6. Summary

Słowa kluczowe: *Campylobacter*, glikoproteiny, glikoinżynieria, glikozylacja

Keywords: *Campylobacter*, glycoproteins, glycosylation, glycoengineering

1. Potranslacyjne modyfikacje białek

Łańcuch nukleotydowy o długości 150 par zasad potencjalnie może kodować 10^{195} różnych białek. Liczba ta wynika jedynie z jego długości [35]. Różnorodność białek istotnie wzrasta na poziomie translacji, co jest efektem m.in. wykorzystania aminokwasów niekanonicznych: selenocysteiny, selenometioniny oraz pirolizyny [116]. Ponadto znaczącą część proteomu tworzą białka, których łańcuch/y boczny/e ulega/ją potranslacyjnym modyfikacjom (PTM; Post-Translational Modification). Z ponad 200 zidentyfikowanych do tej pory chemicznych modyfikacji białek do najczęściej spotykanych należą: fosforylacja, glikozylacja, acylacja, metylacja, acetylacja, oksydacja, hydroksylacja, deaminacja oraz tworzenie wiązania dwusiarczkowego [54].

PTM wpływają na strukturę białek, regulują ich aktywność enzymatyczną i interakcje z innymi molekułami. Wykazano, że około jedna trzecia białek występujących w komórkach ssaków zawiera kowalencyjnie związane fosforany, których poziom jest kontrolowany przez aktywność kinaz i fosfataz białkowych. Fosforylacja umożliwia kontrolę różnych procesów komórkowych, w tym cyklu komórkowego, wzrostu, apoptozy. Jest również istotnym elementem transdukcji sygnałów.

Niniejsza publikacja traktuje o glikozylacji – jednej z najbardziej rozpowszechnionych potranslacyjnych modyfikacji białek. Chociaż jej znaczenie w komórkach organizmów eukariotycznych było, i nadal jest, źródłem intensywnych badań, glikozylacja u prokariotów stosunkowo niedawno zwróciła uwagę społeczności naukowej. Odkrycie glikoprotein u bakterii przyniosło

* Autor korespondencyjny: dr hab. Agnieszka Wyszyńska, Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. 22 554 13 41; e-mail: agawysz@biol.uw.edu.pl

dopiero lata 70. XX wieku [83]. Różnorodność białek prokariotycznych modyfikowanych przez dołączenie grup cukrowych wskazuje jednak, że glikozylacja w tych organizmach jest raczej normą niż wyjątkiem.

2. Glikozylacja – charakterystyka

Glikozylacja białek polega na enzymatycznym przyłączaniu glikanu do określonych reszt aminokwasowych polipeptydu. Do tej pory opisano cztery jej rodzaje: O-glikozylację, N-glikozylację, S-glikozylację oraz C-mannozyzację [10]. Przyłączenie jednostki cukrowej do atomu tlenu grupy hydroksylowej w bocznym łańcuchu seryny (Ser) i/lub treoniny (Thr) ma miejsce w przypadku O-glikozylacji. Dołączenie reszty cukrowej do azotu grupy aminowej asparaginy charakteryzuje natomiast N-glikozylację. Warunkiem koniecznym jest obecność asparaginy (Asn) w obrębie sekwencji konsensusowej Asn-X-Ser/Thr, gdzie X to dowolny aminokwas z wyjątkiem proliny. W przypadku komórek *Campylobacter* wykazano, że w pozycji – 2 od modyfikowanej asparaginy musi dodatkowo występować kwasowy aminokwas, tj. kwas glutaminowy (Glu) lub kwas asparaginowy (Asp) [63]. Opisano również S-glikozylację, w której grupa cukrowa wiąże się z cysteiną, oraz występującą tylko u ssaków C-mannozyzację, którą cechuje dołączenie mannozy do atomu węgla C2 grupy indolowej tryptofanu poprzez wiązanie C-C [83, 97]. Jak dotąd S-glikozyłowane białka opisano w komórkach m.in. *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* czy *Enterococcus faecalis* [79, 85, 108]. W glikoproteinach zidentyfikowanych w obrębie *Bacteria* i *Archaea* dominuje typ wiązania O-glikozydowego.

Glikoproteiny charakteryzuje ogromna różnorodność, co w dużej mierze wynika z właściwości monosacharydów budujących grupy cukrowe. Mogą one występować w różnych postaciach epimerycznych (glukoza, mannoza i galaktoza), ulegać dodatkowym modyfikacjom polegającym na przyłączeniu grup siarczanowych, acetylowych czy fosforanowych, jak również łączyć się ze sobą na wiele sposobów (zarówno pod względem pozycji, jak i stereochemii wiązania). Olbrzymią różnorodność warunkuje także zdolność cukrów do tworzenia rozgałęzień, a to sprawia, że glikany związane z białkami są unikalne pod względem składu i/lub architektury, zatem idealnie nadają się do przechowywania szerokiego zestawu informacji biologicznych i biorą aktywny udział w komunikacji międzykomórkowej [27].

Ustalenie budowy cukrowego składnika glikoprotein nie jest łatwym zadaniem. Dopiero pojawienie się zaawansowanych technik analitycznych, w tym jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) i wariantów spektrometrii masowej (MS) umożliwiło gwałtowny rozwój glikoproteomiki [32].

3. Glikozylacja białek w komórkach organizmów eukariotycznych

Glikoproteiny mają olbrzymie znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania komórek eukariotycznych. Szacunki mówią, że stanowią one połowę proteomu [44], a 90% z nich zawiera jednostkę cukrową przyłączoną do atomu azotu asparaginy. Obecność reszt cukrowych w strukturze białka zmienia jego właściwości fizyczne, w tym rozmiar, kształt, stopień sfałdowania, rozpuszczalność i ładunek elektryczny. Biologiczna rola tak zmodyfikowanych białek jest niezwykle istotna w procesach rozwoju, wzrostu i funkcji organizmu. Obecność grup cukrowych chroni białka przed proteolizą i decyduje o czasie ich eliminacji przez wątrobę. Glikozylacja, obok wpływu na sekrecję i sortowanie białek, jest także ważna dla mechanizmu wzajemnego rozpoznawania się komórek oraz dla modulowania aktywności różnych enzymów, receptorów błonowych, transporterów, czynników wzrostu i hormonów [19, 23].

Glikany biorą udział w prawie każdym aspekcie wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej. Glikozylacji ulegają m.in. białka głównego układu zgodności tkankowej (MHC, Major Histocompatibility Complex) oraz wszystkie przeciwciała w konserwowanych pozycjach ich łańcuchów ciężkich. Odkryto, że zmiany we wzorze glikozylacji fragmentu Fc (fragment, crystallizable) przeciwciała IgG są istotne w procesie starzenia, a także wielu chorobach autoimmunologicznych i nowotworowych [39, 117]. Nieprawidłowości w glikozylacji przeciwciał towarzyszą reumatoidalnemu zapaleniu stawów (RA, Rheumatoid Arthritis) [16], a wrodzone niedobory glikozylacji białek (CDG, Congenital Disorder of Glycosylation) prowadzą do wystąpienia chorób metabolicznych o różnorodnych objawach i zaburzają funkcje wielu układów i narządów [31]. Większość ze 130 opisanych jak dotąd chorób związanych z defektami enzymów na drodze syntezy glikanów jest dziedziczona w sposób autosomalny recesywny. Główne skutki zaburzeń glikozylacji to opóźnienie wzrostu i rozwoju, hipotonia, dysmorfie twarzy, zaburzenia krzepnięcia krwi i nieprawidłowości układu hormonalnego [15]. Znaczenie tej modyfikacji białek u ludzi podkreśla fakt, że eksperymentalne zablokowanie N-glikozylacji u zwierząt laboratoryjnych jest letalne na wczesnych etapach życia płodowego [89].

W komórkach eukariotycznych proces N-glikozylacji rozpoczyna się w obrębie retikulum endoplazmatycznego (RE). Do difosforanu dolicholu – lipidowego nośnika osadzonego w błonie RE, od strony cytozolowej przyłączany jest rdzeń heptasacharydowy złożony z 5 mannoz i 2 reszt N-acetyloglukozaminy (GlcNAc). W kolejnym etapie ma miejsce odwrócenie orientacji lipidowego nośnika i dobudowanie, już od strony światła RE, kolejnych monosacharydów. Powstały

glikan przenoszony jest na docelowe reszty asparaginy syntetyzowanego białka przy udziale związanego z błoną RE kompleksu białek transmembranowych – transferazy oligosacharydowej (OST, oligosaccharyltransferase). Za enzymatyczną aktywność tego kompleksu białkowego odpowiedzialne jest Stt3p – białko o silnie konserwowanej sekwencji aminokwasowej [60]. N-glikozylowane białko kierowane jest następnie do aparatu Golgiego, gdzie glikan jest dalej przebudowywany przez dodawanie i/lub usuwanie poszczególnych reszt cukrowych, co gwarantuje różnorodność strukturalną [2].

Aparat Golgiego oraz RE to miejsca, w których odbywa się również O-glikozylacja. Proces ten najczęściej zaczyna się od przyłączenia N-acetylogalaktozaminy (GalNAc) do reszt seryny/treoniny. Do niej dobudowywane są kolejne monosacharydy [19]. Przykładem modyfikowanych w ten sposób białek są mucyny, fetuina oraz gonadotropiny [99].

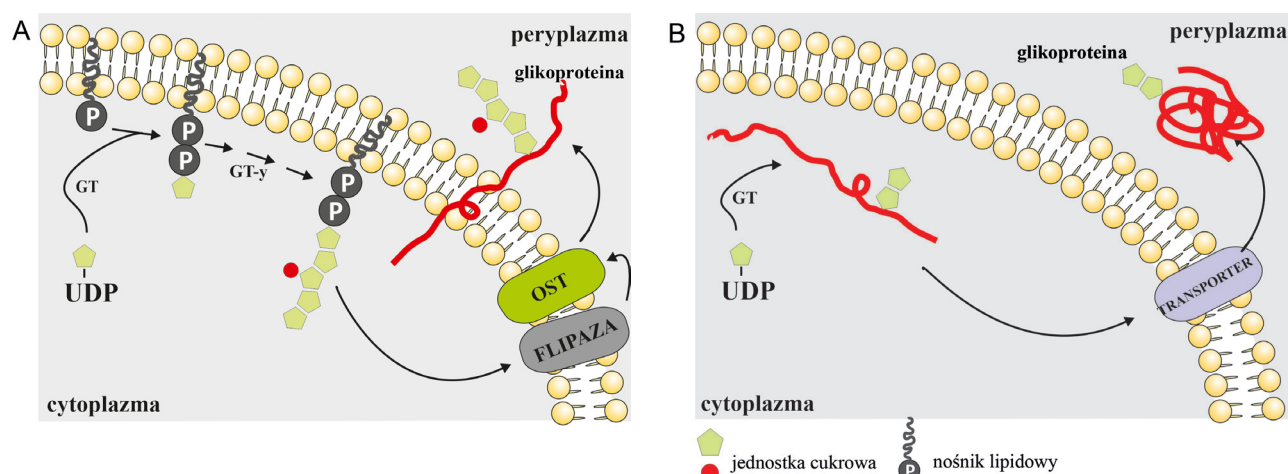
4. Glikozylacja białek u bakterii

Bakterie syntetyzują rozmaite glikokoniugaty. Są to, występujące zarówno u bakterii Gram-ujemnych jak i Gram-dodatnich, peptydoglikan, otoczki polisacharydowe, egzopolisacharyd, czy też charakterystyczne tylko dla jednej z tych grup bakterii: lipopolisacharyd i lipooligosacharyd (Gram-ujemne) oraz kwasy tejchojowe i lipotejchojowe (Gram-dodatnie). Dzięki powierzchniowej lokalizacji i ogromnej różnorodności tworzą one unikalny „kod kreskowy” na powierzchni bakterii, a tym samym pośredniczą w specyficznych interakcjach z otoczeniem. Wiele z tych struktur w przypadku mikroorganizmów chorobotwórczych jest wykorzystywana jako MAMP (Microbe-Associated Molecular Patterns) i pełni kluczową rolę w modulowaniu działania układu immunologicznego.

Do roku 1999 w glikoproteinach zidentyfikowanych w obrębie domeny *Bacteria* stwierdzano wyłącz-

nie obecność wiązania O-glikozydowego. Okazało się jednak, że w skład proteomów bakteryjnych wchodzi także N-glikoproteiny. Pierwszą bakterią, u której opisano szlak N-glikozylacji, był *Campylobacter jejuni*, przedstawiciel Epsilonproteobacteria [101, 115]. Dziś wiadomo, że niemal wszystkie bakterie należące do Epsilonproteobacteria (m.in. *Helicobacter*, *Wolinella*, *Nitratiruptor*), podobnie jak *Campylobacter* posiadają przynajmniej jeden ortolog transferazy oligosacharydowej (OST), enzymu potrzebnego do przeprowadzenia tej modyfikacji. Takie enzymy wykryto również u przedstawicieli Deltaproteobacteria (np. *Desulfovibrio*), co wskazuje, że system ten jest dużo bardziej powszechny niż początkowo sądzono [83].

Struktura glikanu przyłączonego do białka zależy od zestawu enzymów obecnych w komórce, w której zachodzi modyfikacja. W dobudowywaniu łańcucha oligosacharydowego mogą brać udział hydrolazy, glikozydazy, acetylasy, ale największe znaczenie mają glikozylotransferazy (GT), o czym świadczy ich rozpowszechnienie. Szacunki wskazują, że stanowią one od 1 do 3% wszystkich białek proteomu bakteryjnego. Aktualna klasyfikacja obejmuje 110 rodzin wyodrębnionych na podstawie rodzaju przenoszonego cukru, np. galaktozylotransferazy, mannozylotransferazy [72]. Do utworzenia wiązania glikozydowego określonego typu potrzebna jest zatem konkretna glikozylotransferaza. Miejszem ich działania jest cytoplazma a substratami zaktywowane nukleotydocukry. Produkt działania jednej glikozylotransferazy staje się akceptorem dla następnej, w wyniku czego dochodzi do wydłużenia oligosacharydu. Syntetyzowane glikany są zwykle dość proste, co oznacza, że składają się z jednego rodzaju lub kilku różnych monosacharydów. Po zsyntetyzowaniu glikoproteiny są transportowane przez błonę cytoplazmatyczną. Ten sposób tworzenia glikanu nazwano glikozylacją sekwencyjną (Ryc. 1A) [105]. Nieco inny przebieg ma glikozylacja blokowa (glikozylacja *en-bloc*).



Ryc. 1. Schemat przedstawiający przebieg glikozylacji

Na rycinie przedstawiono przebieg glikozylacji sekwencyjnej (A) oraz *en bloc* (B). Skróty: GT – glikozylotransferaza; UDP – urydynodifosforan; OST – transferaza oligosacharydowa.

Tabela I

Przykłady białek N- i O-glikozylowanych w mechanizmie zależnym i niezależnym od obecności transferazy oligosacharydowej

	Enzym	Aktywność enzymu	Akceptor glikanu	Wybrane modyfikowane białka	Glikan	Piśmienictwo
O-glikozylacja						
<i>Neisseria meningitidis</i>	PglL	OST*	S/T (LCR)	PilE, AniA	diNAcBac- i GATDH-, >30	[64, 90]
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	PglO	OST	S	PilE, MtrC, MtrD, DsbA, HemX, CcoP	diNAcBac-	[5]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TfpO/TfpW	GT	S/T	PilA	α ,5N β OHC ₄ 7NFmPse,4 β Xyl1, 3 β FucNAc	[25, 43]
<i>Francisella tularensis</i>	PglA	OST	S	PilA	HexNAc-Hex-Hex-HexNAc-HexN	[8]
<i>Campylobacter jejuni</i>	ND	ND	S/T	flagelina	Pochodne Pse5Ac7Ac i Leg5Am7Ac	[103]
<i>Listeria monocytogenes</i>	GmaR	GT	T	flagelina	β -GlcNAc	[98]
<i>Helicobacter pylori</i>	ND	ND	S/T	flagelina (FlaA, FlaB)	Pse5Ac7A, Pse5Am7A, Leg5AmNMe7A, pochodne D-Bac	[46]
<i>Clostridium botulinum</i>	ND	ND	S	flagelina	α Leg5GluNMe7Ac	[104]
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	PglL	OST	LCR bogate w S, A, P	>23	HexNAc-HexNAc-Hex, b-Gal-(1-3)-a-GalNAc-(1-3)-b-GalNAc-	[69]
<i>Acinetobacter baumannii</i>	PglL	OST	S/T	PilA oraz białka o nieznannej funkcji	GlcNAc3NAcA4OAc4 (β GlcNAc-6-) α Gal6 β Glc3 β GalNAc	[51]
<i>Campylobacter jejuni</i>	ND	ND	T	MOMP	Gal β 1,3GalNAc β 1,4GalNAc β 1, 4GalNAc α 1	[74]
<i>Escherichia coli</i>	Aah	GT	S/T	AIDA-I, Ag43, TibA	Hep	[9]
N-glikozylacja						
<i>Campylobacter jejuni</i>	PglB	OST	(D/E)-X-N-Y-(S/T)	ZnuA, EptC, MreC, Cme, ok. 78 białek	GalNAc ₃ (Glc)GalNAc ₂ diNAcBac	[14, 82]
<i>Helicobacter pullorum</i>	PglB1	OST	N-X-(S/T)	HgpA + inne peryplazmatyczne/ błonowe	HexNAc-216-217-217-HexNAc	[56]
<i>Haemophilus influenzae</i>	HMW ₁ C, HMW ₂ C	GT	N-X-(S/T)	HMW ₁ A, HMW ₂ A	Glc i Gal	[28, 38]

* α -5N β OHC₄7NFmPse: pochodna kwasu pseudoaminowego (5-N-b-hydroxybutyryl-7-Nformyl-pseudaminic acid); α Leg5GluNme7Ac: pochodna kwasu legionaminowego (7-acetamido-5(N-methyl-glutam-4-yl)-amino-3,5,7,9-tetradecy-D-glycero- α -D-galacto-nonulosonic acid); β -GlcNAc3NAcA4OAc: 4-O-acylowana pochodna kwasu glukurynowego; bacillozoamina: 2,4-diamino-2,4,6-trideoksy-D-glukoza; diNAcBac: 2,4-diacetamido bacillozoamina; FucNAc: N-acetylofukozamina; Gal: galaktoza; GalNAc: N-acetylogalaktozamina; GATDH: 2-gliceramido 4-acetamido 2,4,6-trideoksyheksoza; Glc: glukoza; GlcNAc: N-acetyloglukozamina; GT: glikozylotransferaza; Hep: heptoza; Hex: heksoza; HexNAc: N-acetyloheksozamina; LCR: Low complexity region (region o niskiej złożoności); Leg: kwas legionoaminowy; Man: mannoza; ManNAc: N-acetylomannozamina; Me: grupa metylowa; NB: nie badano; OST: transferaza oligosacharydowa; P: fosforan; Pse5Ac7Ac: kwas pseudoaminowy; Pse5Am7Ac: 5-acetamidyno-7-acetamido-Pse; Xyl: ksyloza.

Wówczas, w wyniku aktywności glikozylotransferaz, na nośniku lipidowym, jakim jest zakotwiczony w błonie cytoplazmatycznej difosforan undekaprenyłu, powstaje jednostka oligosacharydowa, która następnie w całości zostaje przeniesiona na łańcuch białkowy. Składanie glikanu zachodzi od strony cytoplazmatycznej, po czym struktura ta ulega odwróceniu, a transfer grupy cukrowej na białko, będący wynikiem aktywności transferazy oligosacharydowej (OST), zachodzi w peryplazmie (Ryc. 1B) [105].

Jeszcze do niedawna uważano, że według mechanizmu sekwencyjnego powstają O-glikoproteiny, natomiast mechanizm blokowy, a więc również obecność OST, jest typowy dla N-glikozylacji. Aktualna wiedza

wskazuje, że możliwa jest także N-glikozylacja sekwencyjna. Została ona opisana dla białka HMW1C *Haemophilus influenzae* [37] oraz w komórkach *Actinobacillus pleuropneumoniae* [95]. W ostatnich latach u przedstawicieli rodzaju *Neisseria* opisano także O-glikozylację wg. mechanizmu *en bloc* [105]. Przykłady białek glikozylowanych w mechanizmie zależnym i niezależnym od OST przedstawiono w tabeli I.

4.1. O-glikozylacja w komórkach bakteryjnych

Dominującym typem glikozylacji w świecie organizmów prokariotycznych jest glikozylacja typu O. Występuje w komórkach wielu gatunków bakterii, z których

duża część to organizmy chorobotwórcze (np. *Neisseria*, *Borrelia*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Campylobacter* i in.). Podlegają jej przede wszystkim białka powierzchniowe, będące jednocześnie istotnymi czynnikami wirulencji (piliny, flageliny, adhezyny).

O-glikozylacji niezależnej od obecności transferazy oligosacharydowej (OST) ulega głównie flagelina, białko budujące włókna rzęski bakteryjnej, a więc struktury potrzebne komórce bakteryjnej do poruszania się. Szczególną rolę pełnią one u bakterii patogennych – ich brak często uniemożliwia kolonizację tkanek gospodarza. W toku ewolucji u organizmów wyższych powstały mechanizmy umożliwiające rozpoznawanie białkowych monomerów budujących włókno rzęski, co wskazuje na jej istotne znaczenie jako czynnika wirulencji.

Systemy glikozylacji flageliny odnaleziono u wielu bakterii Gram-ujemnych oraz Gram-dodatnich rodzajów *Clostridium* i *Listeria* [104]. Wykazują one bardzo dużą różnorodność, co objawia się m.in. w liczbie miejsc akceptorowych czy budowie przyłączanych glikanów. Na przykład *Listeria monocytogenes* glikozyluje flagelinę tylko w jednym miejscu, a w przypadku *Campylobacter* przyłączony składnik cukrowy może stanowić nawet 10% masy tego białka. W komórkach *C. jejuni* do flageliny FlaA może bowiem zostać dołączonych aż 19 grup cukrowych, co czyni ją jednym z najmocniej zmodyfikowanych w ten sposób, zidentyfikowanych do tej pory, białek [103]. Mechanizm przyłączenia glikanu wydaje się bardziej zależeć od dostępności seryny lub treoniny na powierzchni pofałdowanego białka, aniżeli od określonej sekwencji konsensusowej. Badania techniką spektrometrii mas wykazały, że glikany są przyłączane w centralnym, wysoko zmiennym regionie flageliny i są eksponowane do środowiska [103].

Większość szczepów z niedoborem glikozylacji nie jest w stanie wytworzyć funkcjonalnej rzęski; wydaje się więc, że glikan umożliwia złożenie struktury i zapewnia jej stabilność [71, 83]. Inaczej jest u *Pseudomonas aeruginosa*. Modyfikacja ta nie wpływa bowiem ani na powstawanie rzęski, ani na ruchliwość komórek *Pseudomonas*. Odnotowano natomiast, że glikozylowana flagelina, w porównaniu do białka pozbawionego tej modyfikacji, wywołuje znacznie wyższą odpowiedź immunologiczną, a szczepy *Pseudomonas* z niedoborem glikozylacji mają obniżoną zjadliwość [6, 109].

W komórkach *Campylobacter* występuje jeden z lepiej zbadanych systemów O-glikozylacji flageliny. Glikany przyłączane do tego białka to jednostki monosacharydowe składające się z jednego z dwóch rzadkich 9-węglowych cukrów, pochodnych kwasu sjałowego: kwasu pseudaminowego (Pse5Ac7Ac, kwas 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradeoksy-L-manno-nonulosonowy) lub kwasu legionaminowego (Leg5Am7Ac, kwas 5-acetamidyno-7-acetamido-3,5,7,9-tetradeoksy-D-glicero-D-galakto-nonulosonowy), które mogą być

dotatkowo modyfikowane przez dołączenie np. grupy acetylowej, acetamidynowej czy N-acetyloglutaminy [36]. Szczepy *Campylobacter* mogą produkować oba te cukry, albo tylko jeden z nich, co oczywiście zależy od zestawu posiadanych genów w obrębie locus O-glikozylacji. Region ten charakteryzuje się dużą zmiennością. Tak na przykład w komórkach *C. jejuni* NCTC11168 obejmuje on blisko 50 genów, natomiast w obrębie locus O-glikozylacji szczepu 81-176, należącego do tego samego gatunku, znajdują się tylko 24 geny [41]. Oprócz genów biorących udział w biosyntezie kwasu pseudoaminowego (geny *neu*, neuraminic acid genes) [17, 93] i/lub genów zaangażowanych w biosyntezę kwasu legionaminowego (geny *ptm*, post-translational modification genes) [94] w obrębie tego regionu występują m.in. geny rodziny 1318 (*maf*, motility accessory factor), geny rodziny 617 oraz geny kodujące podjednostki strukturalne flageliny FlaA i FlaB [87]. Zarówno geny rodziny 1318 jak i 617 mogą podlegać zmienności fazowej: zawierają w swej sekwencji nukleotydowej powtórzenia, tzw. nieprzewidywalne loci, których obecność doprowadza do poślizgu polimerazy w trakcie replikacji [59, 106]. Może to powodować zmiany strukturalne w glikoproteinach rzęsek.

Glikozylacja flageliny w komórkach *Campylobacter* ma znaczenie dla jej struktury i właściwości immunogennych. Jest niezbędna do biosyntezy funkcjonalnych rzęsek, co umożliwia kolonizację przewodu pokarmowego gospodarza, warunkuje autoaglutynację, formowanie biofilmu, jak również sekrecję czynników wirulencji [29, 40, 67, 77, 103]. Różne rodzaje składników cukrowych na powierzchni flageliny *Campylobacter* umożliwiają specyficzne oddziaływanie komórek tego patogenu ze środowiskiem bądź z organizmem gospodarza [47, 100]. Odporność wrodzona działa w oparciu o istnienie receptorów PRR (Pattern Recognition Receptors), rozpoznających struktury drobnoustrojów zwane PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns). Jednym z przedstawicieli PRR są receptory TLR (Toll-like receptor), które odgrywają główną rolę w rozpoznaniu zagrożenia i inicjacji odpowiedzi immunologicznej. Za rozpoznawanie flageliny odpowiedzialny jest receptor TLR5. W odróżnieniu do większości flagelin bakteryjnych, flagelina *Campylobacter* nie jest zdolna do aktywacji receptora TLR5, a zatem unika rozpoznania przez wrodzony układ odpornościowy. Stwierdzono jednak, że glikozylacja flageliny nie odgrywa roli w mechanizmie unikania odporności [24].

O-glikozylacji często podlega białko budujące pilusy typu IV. Przykładem jest pilina chorobotwórczych gatunków *Neisseria*, *Neisseria meningitidis* i *Neisseria gonorrhoeae* [64, 110]. Pilusy *Neisseria* to struktury, które odgrywają rolę w agregacji, ruchliwości, przyłganiu i inwazji do komórek gospodarza, tworzeniu biofilmu i modulowaniu odpowiedzi immunologicznej

gospodarza [76]. Stwierdzono, że glikozylacja piliny *N. gonorrhoeae* ma kluczowe znaczenie dla skutecznego zakażenia szyjki macicy [53]. Glikozylotransferazy (np. PglA) *Neisseria* mogą podlegać zmienności fazowej. Prowadzi to do powstania wielu glikoform piliny, czego efektem jest zdolność patogenu do unikania odpowiedzi odpornościowej gospodarza [11]. Badania ostatniej dekady wykazały, że *N. gonorrhoeae*, oprócz piliny, jest w stanie glikozylować co najmniej 19 białek. Niektóre z nich stanowią składniki pomp efflux, których działanie polega na aktywnym wypompowywaniu różnych substancji antybakteryjnych z komórki (m.in. antybiotyków, barwników, detergentów, toksyn) [4, 5, 110]. W komórkach *Neisseria* glikozylacja może przebiegać z udziałem transferazy oligosacharydowej [5, 64, 90]. Enzymy te zostały zidentyfikowane również w genomach *Burkholderia* [69] i *Acinetobacter* [51]. Zaobserwowano, że glikozylacja zachodzi w regionach białka bogatych w reszty alaniny, seryny i proliny, wciąż jednak nie jest znany motyw rozpoznawany przez ten enzym.

4.2. N-glikozylacja w komórkach bakteryjnych

Identyfikacja N-glikozylowanych białek w komórkach bakterii była dość nieoczekiwanym odkryciem. Genomika porównawcza pokazała jednak, że systemy glikozylacji białek są znacznie bardziej powszechne, niż wcześniej sądzono. *Campylobacter jejuni* to mikroorganizm z najlepiej poznanym i opisanym systemem N-glikozylacji oraz pierwsza bakteria, której system został w pełni odtworzony w *Escherichia coli* [112].

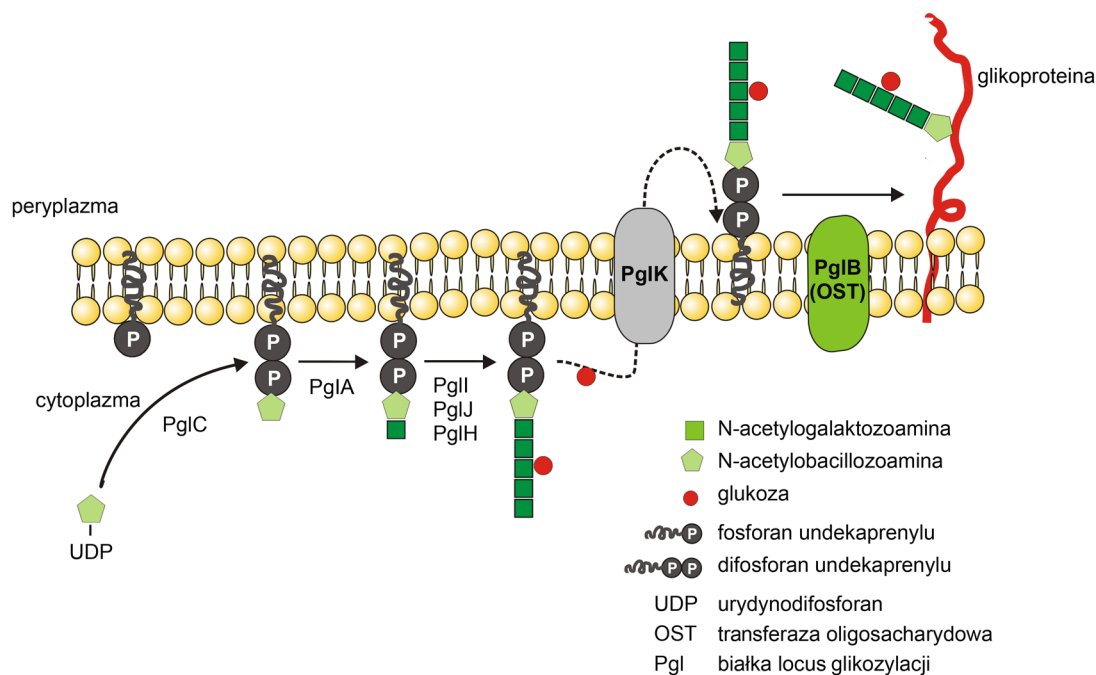
C. jejuni jest czynnikiem etiologicznym stanów zapalnych jelit u ludzi. Większość przypadków kamylobakteriozy jest wynikiem spożycia zanieczyszczonego tymi bakteriami, nieodpowiednio przygotowanego mięsa drobiowego. Znacząca część stosunkowo małego genomu (ok. 1,6 Mbp) tego gatunku bakterii związana jest z biosyntezą glikanów, co powoduje, że komórki *Campylobacter* charakteryzuje dość duży repertuar glikokoniugatów. Na ich powierzchni występują lipooligosacharydy (LOS), z których niektóre imitują budowę ludzkich glikolipidów, peptydoglikan, polisacharydy otoczkowe (CPS) ze złożonymi i nietypowymi cukrami i, jak mówią szacunki, ponad 70 białek, które są potranslacyjnie modyfikowane poprzez przyłączenie N-glikanów [14, 83].

Geny kodujące enzymy uczestniczące w procesie N-glikozylacji są konserwowane i tworzą tzw. locus *pgl*. U *C. coli* i *C. lari* – gatunków najbliższych spokrewnionych z *C. jejuni*, klaster genów *pgl* wygląda niemal identycznie. Organizacja tego regionu w genomach *C. upsaliensis*, *C. fetus* i *C. curvus* charakteryzuje większa różnorodność. U gatunków tych pomiędzy *pglD*

i *pglE* stwierdzono otwarte ramki odczytu (ORF; open reading frame), których produkty prawdopodobnie nie uczestniczą w procesie N-glikozylacji białek. W genomach *C. gracilis*, *C. hominis*, *C. fetus*, *C. rectus*, *C. showae* i *C. curvus* dodatkowe ORF-y kodują prawdopodobnie glikozylotransferazy i enzymy zaangażowane w biosyntezę oligosacharydów. Natomiast niektóre gatunki *Campylobacter*, np. *C. concisus*, *C. curvus* i *C. gracilis* posiadają dwa ortologi genów *pglB*, zlokalizowane w obrębie locus *pgl* (*C. concisus*, *C. curvus*) lub poza nim (*C. gracilis*) [55].

W komórkach *C. jejuni* struktura glikanu jest formowana w ciągu reakcji katalizowanych przez glikozylotransferazy, gdzie donorami są cukry związane z urydyno-5'-fosforanem (UDP), a kolejne elementy są przenoszone na Und-PP (difosforanu undekaprenylu) [61]. W pierwszym etapie, w wyniku działania trzech enzymów PglF, PglE i PglD, które przeprowadzają odpowiednio reakcje dehydratacji, transaminacji oraz transacetylacji, z UDP-GlcNAc powstaje 2,4-diacetamino-2,4,6-trideoksy- α -D-glukoza, nazywana inaczej UDP-2,4-diacetaminobacillozaminą (UDP-diNAcBac). Glikozylotransferaza, PglC, przyłącza powstałą UDP-diNAcBac do nośnika lipidowego, zakotwiczonego w błonie wewnętrznej od strony cytoplazmy, w wyniku czego powstaje diNAcBac- α 1-PPUnd. Potem następuje seria reakcji przeniesienia GalNAc (N-acetylogalaktozaminy) katalizowanych przez glikozylotransferazy PglA, PglJ i PglH, czego efektem jest wydłużenie łańcucha glikanowego (Und-PP-Bac2,4diNAc-(GalNAc)_n) [34]. PglH zachowuje się w tym procesie jak polimeraza, dodając trzy kolejne cząsteczki GalNAc do tworzonego glikanu, łączone wiązaniami 1,4-glikozydowymi. Ostatnim etapem biosyntezy heptasacharydu, katalizowanej przez PglI, jest przyłączenie β -1,3-glukozy do jednej z reszt GalNAc [55, 81]. Schemat procesu N-glikozylacji w komórkach *Campylobacter* przedstawia Ryc. 2. Powstały oligosacharyd (LLO; lipid-linked oligosaccharide) transportowany jest przez wewnętrzną błonę do przestrzeni peryplazmatycznej przez ATP-zależną flipazę PglK [3, 88]. Za przeniesienie oligosacharydu na docelowe białko odpowiada natomiast transferaza oligosacharydowa PglB [112] – homolog podjednostki Stt3p wchodzącej w skład OST u drożdży [60]. W komórkach *Campylobacter* modyfikowana jest asparagina występująca w motywach Asp/Glu-X₁-Asn-X₂-Ser/Thr, gdzie X₁ i X₂ reprezentują dowolny aminokwas z wyjątkiem proliny [63]. Motyw akceptorowy musi jednak znajdować się na powierzchni białka, w regionie nieuporządkowanym. Bakteryjna transferaza oligosacharydowa, w odróżnieniu od eukariotycznej, jest w stanie transportować glikany na pofałdowane białka [62, 70].

Organizmy eukariotyczne przeprowadzają kontrolę jakości N-glikoprotein; glikany są dalej modyfikowane

Ryc. 2. Schemat szlaku N-glikozylacji u *C. jejuni*

lub przycinane w ER i aparacie Golgiego. Przez długi czas uważano, że taka kontrola i przebudowa nie występują w komórkach organizmów prokariotycznych. W ostatnich latach jednak w komórkach *Campylobacter* zaobserwowano, że glikan może być modyfikowany przez dołączenie fosfoetanolaminy, który to proces jest katalizowany przez transferazę EptC [22, 96].

Znaczenie procesu N-glikozylacji w komórkach mikroorganizmów nie zostało jak dotąd dokładnie wyjaśnione. Jednak, podobnie jak w przypadku organizmów eukariotycznych, oligosacharydowe grupy mogą wywierać wpływ na strukturę i funkcję białka modyfikowanego przez ich dołączenie. Wyniki wielu badań wskazują, że mogą mieć one znaczenie w interakcji z komórkami gospodarza lub otaczającym środowiskiem – pełnią one rolę determinant antygenowych i uczestniczą w zjawiskach biologicznego rozpoznawania i adhezji. Tak na przykład *Campylobacter* ze znieaktywowanym locus N-glikozylacji wykazuje obniżoną adhezję i inwazyjność do linii komórek jelitowych. Zaobserwowano również, że brak glikozylacji wpływa na ograniczenie kolonizacji jelit kurcząt [1, 45, 58, 73]. Badania van Sorge'a pokazują, że N-glikozylacja u *C. jejuni* może prowadzić do zmiany odpowiedzi immunologicznej gospodarza w kontakcie z patogenem. Odkryto, że przyłączony heptasacharyd jest rozpoznawany przez lektynę MGL (macrophage galactose binding lectin). Receptor ten jest zaangażowany w wiązanie glikozylowanych antygenów, ich obróbkę oraz indukcję sygnałów modyfikujących aktywność komórek układu odpornościowego. MGL rozpoznaje zarówno glikoproteiny *C. jejuni* jak i lipooligosacharydy

z przyłączonymi terminalnie podstawnikami GalNAc. Obecność mutantów *C. jejuni*, które nie produkowały ligandów dla MGL, powodowała wzrost produkcji interleukiny 6 [107]. Dokładne skutki braku tej modyfikacji ustalono w odniesieniu do nielicznych białek. Jednym z nich jest VirB10, komponent systemu sekrecji typu IV u *C. jejuni*. Glikozylacja tego białka ma zasadnicze znaczenie dla stabilności układu wydzielania i pobierania DNA [66].

Ostatnio przeprowadzona proteomika ilościowa w szczepie *C. jejuni* z mutacją w genie kodującym transferazę oligosacharydową *pglB* wykazała znaczną reorganizację proteomu *C. jejuni*. Usunięcie *pglB* spowodowało zmianę poziomu 185 białek. W przypadku 137 z nich komplementacja przywróciła poziom obserwowany w komórkach typu dzikiego. Odnotowano zmiany w poziomie białek powiązanych z reakcją na stres (ClpB, GroEL, GroES, GrpE i DnaK), chemotaksją, tworzeniem biofilmu, oddychaniem oraz pozyskiwaniem, wykorzystaniem i wykrywaniem składników odżywczych. Brak N-glikozylacji w komórce doprowadził na przykład do wyższego poziomu PutP/PutA odpowiadających za transport i wykorzystanie proliny, i obniżenie poziomu białek DctA/DctB związanych z importem asparagianu i eksportem bursztynianu. Konsekwencją było przestawienie metabolizmu z wykorzystania asparaginy na wykorzystanie proliny. Mutanty *pglB* znacznie gorzej przeżywały szok termiczny i osmotyczny. Stwierdzono również, że N-glikozylacja jest niezbędna do pełnej aktywności reduktazy azotanowej Nap. Zaobserwowano, że mniejsza ilość tego enzymu nie miała jednak związku ze zmianą poziomu ekspresji

kodującego ją genu. Na tej podstawie zasugerowano, że N-glikozylacja odgrywa rolę w ochronie białek przed działaniem proteaz [13]. Również badania Abouelhadid i wsp. przeprowadzone w roku 2019 wskazują że zakłócenie N-glikozylacji koreluje ze znacznym wzrostem liczby nie tylko peryplazmatycznych, ale także cytoplazmatycznych białek opiekuńczych i proteaz. W badaniach tych potwierdzono poważne upośledzenie funkcji NapAB i zmniejszenie aktywności pompy efflux CmeABC będące konsekwencją braku glikozylacji [1, 26]. Jednocześnie fakt, że niektóre glikoproteiny są stabilne w komórkach niezdolnych do dołączania glikanów, wskazuje, że grupy cukrowe pełnić mogą odmienne role w różnych proteinach.

5. Praktyczne zastosowania glikozylacji białek – glikoinżynieria

W ostatniej dekadzie zainteresowano się możliwością praktycznego wykorzystania bakteryjnych systemów glikozylacji [52, 114]. Z chwilą wprowadzenia genów odpowiadających za tę modyfikację (*pgl*) do komórek *E. coli* i uzyskania funkcjonalnych, rekombinowanych glikoprotein, zaczęła intensywnie rozwijać się glikoinżynieria bakteryjna. Osiągnięcie to próbuje się wykorzystać w dwojaki sposób: do produkcji szczepionek polisacharydowych, jak również poprawy farmakokinetycznych właściwości białek terapeutycznych. W wielu szczepach glikozylowane białka pełnią ważną rolę w procesach patogenezy, co czyni je również potencjalnym celem terapeutycznym – część z enzymów tworzących system O-glikozylacji jest nieobecna w komórkach eukariotycznych.

Komórki *E. coli* zdolne do przeprowadzenia N-glikozylacji uzyskano w 2002 roku. Wacker i wsp. do komórek *E. coli*, oprócz plazmidu niosącego gen kodujący wytypowane do modyfikacji białko, wprowadzili także plazmid niosący locus biosyntezy heptasacharydu *Campylobacter* oraz plazmid z transferazą oligosacharydową PglB pochodzącą z tego gatunku [112]. Grupa cukrowa była syntetyzowana w cytoplazmie na nośniku lipidowym, a po przeniesieniu do peryplazmy, PglB przekazywał polisacharyd do sekwencji akceptorowej docelowego białka [21, 102]. Glikozylacja przebiegała więc według schematu opisanego dla *Campylobacter*. Kolejne badania wykazały, że na terenie glikokompetentnej komórki *E. coli*, transferaza oligosacharydowa (PglB_{Cj}) może przenosić różne glikany, nie tylko te powstające w komórkach *Campylobacter* [21]. I tak na przykład wykazano, że PglB transportuje polisacharyd O16 w komórkach *E. coli* tak samo wydajnie jak swój endogenny substrat – heptasacharyd Glc(GalNAc)₅Bac u *C. jejuni* [30]. Jedynym ograniczeniem jest wymagana obecność grupy acetylowej przy węglu C2 na reduku-

jącym końcu glikanu [111]. Zaobserwowano również, że warunkiem, który musi zostać spełniony by powstająca jednostka cukrowa została przyłączona do białka, jest obecność sekwencji konsensusowej (Asp/Glu-X-Asn-Y-Ser/Thr). W ten sposób uzyskano między innymi glikozylowaną formę podjednostki B toksyny cholery (CtxB) [63]. Białko PglB wykazuje aktywność wobec stosunkowo szerokiej grupy substratów. Jest ono w stanie przenosić glikan nie tylko na dojrzałe białko, ale również krótsze peptydy, o ile zawierają rozpoznawany przez tę transferazę motyw. Technologię tę określa się jako Protein Glycan Coupling Technology (PGCT) [102].

Jednym z potencjalnych zastosowań glikoinżynierii bakteryjnej jest produkcja nowoczesnych szczepionek polisacharydowych. Użycie polisacharydów otoczkowych w charakterze antygenów szczepionkowych wymaga kowalencyjnego przyłączenia do białka nośnikowego, którego przykładem jest CRM₁₉₇ – nietoksyczna, ale immunogenna wersja toksyny błoniczej *Corynebacterium diphtheriae*. Zapewnia to zdolność do indukowania odpowiedzi związanej z limfocytami T [68], co przekłada się na większą skuteczność szczepionki u dzieci poniżej drugiego roku życia – grupy wiekowej, w której polisacharydy bez białkowego składnika wywołują bardzo słabą odpowiedź immunologiczną [7]. Metodę tę z powodzeniem wykorzystano do opracowania szczepionek przeciwko m.in. *Haemophilus influenzae* typu b (Hib) [75] i *Neisseria meningitidis* [12]. Obecnie tworzone są one poprzez chemiczne połączenie białka z polisacharydem wyizolowanym z danego patogenu lub sztucznie zsyntetyzowanym. Podejście to jest jednak kosztowne i czasochłonne, a otrzymane glikany nie mają jednorodnej struktury. Otrzymywanie glikoprotein w układach *in vivo* np. w *E. coli* pozwoliłoby na obniżenie kosztów produkcji szczepionek koniugowanych oraz na ujednoczenie przyłączanych łańcuchów cukrowych.

Technologię PGCT wykorzystano m.in. do stworzenia glikoprotein, które mogłyby zostać wykorzystane jako antygen w szczepionce przeciwko brucelozie [50]. *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* i *Brucella suis*, wywołujące brucelozę u ludzi mogą również zarażać zwierzęta domowe, powodując poronienia i bezpłodność, a tym samym prowadzić do znacznych strat ekonomicznych [86]. Do białka AcrA *C. jejuni* dołączono antygen O pochodzący z *Yersinia enterocolitica* O9, który jest identyczny z antygenem O *B. abortus*. Syntezy tej dokonano z użyciem transferazy oligosacharydowej PglB *C. jejuni*. Odpowiedź immunologiczna po podaniu glikoproteiny myszom nie była wystarczająca, by ochronić je przed infekcją wirulentnym szczepem *B. abortus*. Wykazano jednak jej użyteczność w wykrywaniu infekcji u bydła, ludzi i świń. Do kulek magnetycznych opłaszczonych rekombinowanym białkiem wiązały

się przeciwciała skierowane przeciwko antygenowi O *B. abortus* obecne w surowicy zainfekowanych zwierząt, co pozwalało odróżnić osobniki chore od zdrowych [20, 50]. W podobny sposób glikoinżynieria została wykorzystana do wykrywania zespołu hemolityczno-mocznicowego (HUS) [78], wywołwanego przez szczepy *Escherichia coli* wytwarzające toksynę Shiga (STEC). Strategię tą zastosowano również do opracowania szczepionek przeciwko *Shigella dysenteriae* typ 1 [49, 91], *Shigella flexneri* typ 2a [57], *Burkholderia pseudomallei* [33], *Francisella tularensis* [21], *Staphylococcus aureus* [113] oraz *Campylobacter* [80]. Testowanie kilku z nich przyniosło obiecujące wyniki na modelach zwierzęcych [21, 113] a w przypadku szczepionki przeciwko *S. dysenteriae* rozpoczęto badania kliniczne [48, 92].

Wysiłki zmierzające do opracowania glikokompetentnych *E. coli* zakończyły się powodzeniem, jednak w dalszym ciągu wyzwaniem pozostaje uzyskanie wysokiej wydajności N-glikozylacji. Na skuteczność tego procesu wpływa wiele czynników, w tym między innymi obecność sekwencji konsensusowej, aktywność transferaz oligosacharydowych (OST), szlaki metaboliczne gospodarza i warunki hodowli. Garcia-Quintanilla i wsp., by uzyskać większą ilość białka zmodyfikowanego polisacharydami *Burkholderia pseudomallei*, unieczynnili w genomie *E. coli* geny *wecA* i *waalL* [33]. Obecność w komórkach glikokompetentnej *E. coli* inicjującej glikozylotransferazy (*wecA*), która przenosi GlcNAc na nośnik lipidowy (difosforan undekaprenylu, Und-PP), zakłócała syntezę na tym samym lipidzie glikanu, będącego przedmiotem badania. Usunięcie ligazy *WaaL*, która może przenosić substrat na LPS, także pozytywnie wpłynęło na wydajność glikozylacji. Korzystając z wysokoprzepustowych analiz, Ollis i wsp. zidentyfikowali warianty PglB o zmienionej specyficzności wobec substratu białkowego. Szczególnie interesujące warianty rozpoznawały sekwencję N-X-S/T wykorzystywaną przez eukariotyczne OST, co daje możliwość wykorzystania technologii PGCT do produkcji eukariotycznych glikoprotein [84].

Około 70% białek terapeutycznych, zatwierdzonych klinicznie lub będących w fazie opracowania, to glikoproteiny. Przykładem są: erytropoetyna, przeciwciała monoklonalne, tkankowy aktywator plazminogenu czy ludzka DNAza [18, 65]. N-glikozylacja może być zastosowana do poprawy właściwości farmakokinetycznych i biofizycznych białek. Zmiany te mogą prowadzić do opracowania leków o podwyższonej aktywności *in vivo*, o dłuższym okresie półtrwania, ale także mogą pozytywnie wpływać na stabilność, rozpuszczalność białek czy warunkować odporność na proteolizę. Dzięki glikozylacji białka terapeutyczne mogą być kierowane do konkretnych komórek lub tkanek, bądź może dochodzić do modulowania ich aktywności biologicznej poprzez oddziaływanie z określonymi receptorami.

Chociaż systemy ekspresyjne ssaków są obecnie preferowanym gospodarzem do wytwarzania glikoprotein terapeutycznych, bakterie mające zdolność do wprowadzania takich modyfikacji pojawiają się jako realna alternatywa w ich produkcji [42]. Więcej informacji na temat możliwości wykorzystania bakteryjnych technik glikoinżynierijnych przedstawia opracowanie Harding i Feldman z 2019 [42].

6. Podsumowanie

Glikoproteiny, traktowane początkowo jako specyficzne jedynie dla komórek organizmów eukariotycznych, są szeroko rozpowszechnione zarówno wśród Archaea, jak i Bacteria. W ciągu ostatnich dwóch dekad scharakteryzowano wiele bakteryjnych szlaków glikozylacji. Kluczowe w tych szlakach enzymy – transferazy oligosacharydowe oraz glikozylotransferazy, wykorzystano do projektowania szczepionek glikokoniugatowych. Szlaki biosyntezy glikoprotein, jako że pełnią one wiele funkcji w patogenezie, okazały się także atrakcyjnym celem dla nowych strategii przeciwbakteryjnych. Niewątpliwie rosnąca wiedza na temat glikozylacji białek przyczynia się do powstania narzędzi umożliwiających tworzenie struktur glikanów, które wcześniej były nieosiągalne. A w dłuższej perspektywie manipulacje ścieżkami glikomodyfikacji pozwoli, być może, wytwarzać rekombinowane białka zawierające ludzkie glikany, co z kolei wzmocni ich wartość terapeutyczną.

Podziękowania

Artykuł został sfinansowany ze środków grantu NCN 2016/21/B/NZ6/01141.

Piśmiennictwo

1. Abouelhadid S., North S.J., Hitchen P., Vohra P., Chintoan-Uta C., Stevens M., Dell A., Cuccui J., Wren B.W.: Quantitative Analyses Reveal Novel Roles for N-Glycosylation in a Major Enteric Bacterial Pathogen. *MBio*, **10**, (2019)
2. Aebi M.: N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim. Biophys. Acta*, **1833**, 2430–2437 (2013)
3. Alaimo C., Catrein I., Morf L., Marolda C.L., Callewaert N., Valvano M.A., Feldman M.F., Aebi M.: Two distinct but interchangeable mechanisms for flipping of lipid-linked oligosaccharides. *EMBO J.*, **25**, 967–976 (2006)
4. Anonsen J.H., Vik A., Borud B., Viburiene R., Aas F.E., Kidd S.W., Aspholm M., Koomey M.: Characterization of a Unique Tetrasaccharide and Distinct Glycoproteome in the O-Linked Protein Glycosylation System of *Neisseria elongata* subsp. *glycolytica*. *J. Bacteriol.* **198**, 256–267 (2016)
5. Anonsen J.H., Vik A., Egge-Jacobsen W., Koomey M.: An extended spectrum of target proteins and modification sites in the general O-linked protein glycosylation system in *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Proteome Res.* **11**, 5781–5793 (2012)

6. Arora S.K., Neely A.N., Blair B., Lory S., Ramphal R.: Role of motility and flagellin glycosylation in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections. *Infect. Immun.* **73**, 4395–4398 (2005)
7. Baraldo K., Mori E., Bartoloni A., Norelli F., Grandi G., Rappuoli R., Finco O., Del Giudice G.: Combined conjugate vaccines: enhanced immunogenicity with the N19 polypeptide as a carrier protein. *Infect. Immun.* **73**, 5835–5841 (2005)
8. Barel M., Charbit A.: Role of Glycosylation/Deglycosylation Processes in *Francisella tularensis* Pathogenesis. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **7**, 71 (2017)
9. Benz I., Schmidt M.A.: Glycosylation with heptose residues mediated by the *aah* gene product is essential for adherence of the AIDA-I adhesin. *Mol. Microbiol.* **40**, 1403–1413 (2001)
10. Bhat A.H., Maity S., Giri K., Ambatipudi K.: Protein glycosylation: Sweet or bitter for bacterial pathogens? *Crit. Rev. Microbiol.* **45**, 82–102 (2019)
11. Borud B., Viburiene R., Hartley M.D., Paulsen B.S., Egge-Jacobsen W., Imperiali B., Koomey M.: Genetic and molecular analyses reveal an evolutionary trajectory for glycan synthesis in a bacterial protein glycosylation system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 9643–9648 (2011)
12. Broker M., Dull P.M., Rappuoli R., Costantino P.: Chemistry of a new investigational quadrivalent meningococcal conjugate vaccine that is immunogenic at all ages. *Vaccine*, **27**, 5574–5580 (2009)
13. Cain J.A., Dale A.L., Niewold P., Klare W.P., Man L., White M.Y., Scott N.E., Cordwell S.J.: Proteomics Reveals Multiple Phenotypes Associated with N-linked Glycosylation in *Campylobacter jejuni*. *Mol. Cell Proteomics*, **18**, 715–734 (2019)
14. Cain J.A., Dale A.L., Sumer-Bayraktar Z., Solis N., Cordwell S.J.: Identifying the targets and functions of N-linked protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*. *Mol. Omics*, **16**, 287–304 (2020)
15. Chang I.J., He M., Lam C.T.: Congenital disorders of glycosylation. *Ann. Transl. Med.* **6**, 477 (2018)
16. Chludzinska A., Chrostek L., Cylwik B.: The alterations of proteins glycosylation in rheumatic diseases. *Pol. Merkur. Lekarski*, **33**, 112–116 (2012)
17. Chou W.K., Dick S., Wakarchuk W.W., Tanner M.E.: Identification and characterization of NeuB3 from *Campylobacter jejuni* as a pseudaminic acid synthase. *J. Biol. Chem.* **280**, 35922–35928 (2005)
18. Cook M.C., Kaldas S.J., Muradia G., Rosu-Myles M., Kunkel J.P.: Comparison of orthogonal chromatographic and lectin-affinity microarray methods for glycan profiling of a therapeutic monoclonal antibody. *J. Chromatogr. B. Technol. Biomed. Life Sci.* **997**, 162–178 (2015)
19. Corfield A.: Eukaryotic protein glycosylation: a primer for histochemists and cell biologists. *Histochem. Cell Biol.* **147**, 119–147 (2017)
20. Cortina M.E., Balzano R.E., Rey Serantes D.A., Caillava A.J., Elena S., Ferreira A.C., Nicola A.M., Ugalde J.E., Comerci D.J., Ciocchini A.E.: A bacterial glycoengineered antigen for improved serodiagnosis of porcine brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* **54**, 1448–1455 (2016)
21. Cuccui J., Thomas R.M., Moule M.G., D'Elia R.V., Laws T.R., Mills D.C., Williamson D., Atkins T.P., Prior J.L., Wren B.W.: Exploitation of bacterial N-linked glycosylation to develop a novel recombinant glycoconjugate vaccine against *Francisella tularensis*. *Open Biol.* **3**, 130002 (2013)
22. Cullen T.W., O'Brien J.P., Hendrixson D.R., Giles D.K., Hobb R.I., Thompson S.A., Brodbelt J.S., Trent M.S.: EptC of *Campylobacter jejuni* mediates phenotypes involved in host interactions and virulence. *Infect. Immun.* **81**, 430–440 (2013)
23. Cummings R.D.: Stuck on sugars – how carbohydrates regulate cell adhesion, recognition, and signaling. *Glycoconj. J.* **36**, 241–257 (2019)
24. de Zoete M.R., Keestra A.M., Wagenaar J.A., van Putten J.P.: Reconstitution of a functional Toll-like receptor 5 binding site in *Campylobacter jejuni* flagellin. *J. Biol. Chem.* **285**, 12149–12158 (2010)
25. DiGiandomenico A., Matewish M.J., Bisailon A., Stehle J.R., Lam J.S., Castric P.: Glycosylation of *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilin: glycan substrate specificity. *Mol. Microbiol.* **46**, 519–530 (2002)
26. Dubb R.K., Nothaft H., Beadle B., Richards M.R., Szymanski C.M.: N-glycosylation of the CmeABC multidrug efflux pump is needed for optimal function in *Campylobacter jejuni*. *Glycobiology*, **30**, 105–119 (2020)
27. Eichler J., Koomey M.: Sweet New Roles for Protein Glycosylation in Prokaryotes. *Trends Microbiol.* **25**, 662–672 (2017)
28. Elango D., Schulz B.L.: Phase-Variable Glycosylation in Non-typeable *Haemophilus influenzae*. *J. Proteome Res.* **19**, 464–476 (2020)
29. Ewing C.P., Andreishcheva E., Guerry P.: Functional characterization of flagellin glycosylation in *Campylobacter jejuni* 81–176. *J. Bacteriol.* **191**, 7086–7093 (2009)
30. Feldman M.F., Wacker M., Hernandez M., Hitchen P.G., Marolda C.L., Kowarik M., Morris H.R., Dell A., Valvano M.A., Aebi M.: Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **102**, 3016–3021 (2005)
31. Freeze H.H.: Understanding human glycosylation disorders: biochemistry leads the charge. *J. Biol. Chem.* **288**, 6936–6945 (2013)
32. Gabius H.J., Roth J.: An introduction to the sugar code. *Histochem. Cell Biol.* **147**, 111–117 (2017)
33. Garcia-Quintanilla F., Iwashkiw J.A., Price N.L., Stratilo C., Feldman M.F.: Production of a recombinant vaccine candidate against *Burkholderia pseudomallei* exploiting the bacterial N-glycosylation machinery. *Front. Microbiol.* **5**, 381 (2014)
34. Glover K.J., Weerapana E., Chen M.M., Imperiali B.: Direct biochemical evidence for the utilization of UDP-bacillosamine by PglC, an essential glycosyl-1-phosphate transferase in the *Campylobacter jejuni* N-linked glycosylation pathway. *Biochemistry*, **45**, 5343–5350 (2006)
35. Godzik A.: Metagenomics and the protein universe. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21**, 398–403 (2011)
36. Goon S., Kelly J.F., Logan S.M., Ewing C.P., Guerry P.: Pseudaminic acid, the major modification on *Campylobacter* flagellin, is synthesized via the Cj1293 gene. *Mol. Microbiol.* **50**, 659–671 (2003)
37. Grass S., Licht C.F., Townsend R.R., Gross J., St Geme J.W., 3rd: The *Haemophilus influenzae* HMW1C protein is a glycosyltransferase that transfers hexose residues to asparagine sites in the HMW1 adhesin. *PLoS Pathog.* **6**, e1000919 (2010)
38. Gross J., Grass S., Davis A.E., Gilmore-Erdmann P., Townsend R.R., St Geme J.W., 3rd: The *Haemophilus influenzae* HMW1 adhesin is a glycoprotein with an unusual N-linked carbohydrate modification. *J. Biol. Chem.* **283**, 26010–26015 (2008)
39. Gudelj I., Lauc G., Pezer M.: Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cell Immunol.* **333**, 65–79 (2018)
40. Guerry P.: *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends Microbiol.* **15**, 456–461 (2007)
41. Guerry P., Ewing C.P., Schirm M., Lorenzo M., Kelly J., Pattarini D., Majam G., Thibault P., Logan S.: Changes in flagellin glycosylation affect *Campylobacter* autoagglutination and virulence. *Mol. Microbiol.* **60**, 299–311 (2006)

42. Harding C.M., Feldman M.F.: Glycoengineering bioconjugate vaccines, therapeutics, and diagnostics in *E. coli*. *Glycobiology*, **29**, 519–529 (2019)
43. Harvey H., Bondy-Denomy J., Marquis H., Sztanko K.M., Davidson A.R., Burrows L.L.: *Pseudomonas aeruginosa* defends against phages through type IV pilus glycosylation. *Nat. Microbiol.* **3**, 47–52 (2018)
44. Helenius A., Aebi M.: Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 1019–1049 (2004)
45. Hendrixson D.R., DiRita V.J.: Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. *Mol. Microbiol.* **52**, 471–484 (2004)
46. Hopf P.S., Ford R.S., Zebian N., Merckx-Jacques A., Vijayakumar S., Ratnayake D., Hayworth J., Creuzenet C.: Protein glycosylation in *Helicobacter pylori*: beyond the flagellins? *PLoS One*, **6**, e25722 (2011)
47. Howard S.L., Jagannathan A., Soo E.C., Hui J.P., Aubry A.J., Ahmed I., Karlyshev A., Kelly J.F., Jones M.A., Stevens M.P. i wsp.: *Campylobacter jejuni* glycosylation island important in cell charge, legionaminic acid biosynthesis, and colonization of chickens. *Infect. Immun.* **77**, 2544–2556 (2009)
48. Huttner A., Hatz C., van den Dobbelen G., Abbanat D., Hornacek A., Frolich R., Dreyer A.M., Martin P., Davies T., Fae K. i wsp.: Safety, immunogenicity, and preliminary clinical efficacy of a vaccine against extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in women with a history of recurrent urinary tract infection: a randomised, single-blind, placebo-controlled phase 1b trial. *Lancet Infect. Dis.* **17**, 528–537 (2017)
49. Ihssen J., Kowarik M., Dilettoso S., Tanner C., Wacker M., Thony-Meyer L.: Production of glycoprotein vaccines in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* **9**, 61 (2010)
50. Iwashkiw J.A., Fentabil M.A., Faridmoayer A., Mills D.C., Peppler M., Czibener C., Ciocchini A.E., Comerci D.J., Ugalde J.E., Feldman M.F.: Exploiting the *Campylobacter jejuni* protein glycosylation system for glycoengineering vaccines and diagnostic tools directed against brucellosis. *Microb. Cell Fact.* **11**, 13 (2012)
51. Iwashkiw J.A., Seper A., Weber B.S., Scott N.E., Vinogradov E., Stratilo C., Reiz B., Cordwell S.J., Whittal R., Schild S. i wsp.: Identification of a general O-linked protein glycosylation system in *Acinetobacter baumannii* and its role in virulence and biofilm formation. *PLoS Pathog.* **8**, e1002758 (2012)
52. Jaffe S.R., Strutton B., Levarski Z., Pandhal J., Wright P.C.: *Escherichia coli* as a glycoprotein production host: recent developments and challenges. *Curr. Opin. Biotechnol.* **30**, 205–210 (2014)
53. Jennings M.P., Jen F.E., Roddam L.F., Apicella M.A., Edwards J.L.: *Neisseria gonorrhoeae* pilin glycan contributes to CR3 activation during challenge of primary cervical epithelial cells. *Cell Microbiol.* **13**, 885–896 (2011)
54. Jensen O.N.: Interpreting the protein language using proteomics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 391–403 (2006)
55. Jarvis A.J., Butler J.A., Lawson A.J., Langdon R., Wren B.W., Linton D.: Characterization of the structurally diverse N-linked glycans of *Campylobacter* species. *J. Bacteriol.* **194**, 2355–2362 (2012)
56. Jarvis A.J., Wood A.G., Cain J.A., Butler J.A., Frost H., Lord E., Langdon R., Cordwell S.J., Wren B.W., Linton D.: Functional analysis of the *Helicobacter pullorum* N-linked protein glycosylation system. *Glycobiology*, **28**, 233–244 (2018)
57. Kampf M.M., Braun M., Sirena D., Ihssen J., Thony-Meyer L., Ren Q.: *In vivo* production of a novel glycoconjugate vaccine against *Shigella flexneri* 2a in recombinant *Escherichia coli*: identification of stimulating factors for *in vivo* glycosylation. *Microb. Cell Fact.* **14**, 12 (2015)
58. Karlyshev A.V., Everest P., Linton D., Cawthraw S., Newell D.G., Wren B.W.: The *Campylobacter jejuni* general glycosylation system is important for attachment to human epithelial cells and in the colonization of chicks. *Microbiology*, **150**, 1957–1964 (2004)
59. Karlyshev A.V., Linton D., Gregson N.A., Wren B.W.: A novel paralogous gene family involved in phase-variable flagella-mediated motility in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*, **148**, 473–480 (2002)
60. Kelleher D.J., Karaoglu D., Mandon E.C., Gilmore R.: Oligosaccharyltransferase isoforms that contain different catalytic STT3 subunits have distinct enzymatic properties. *Mol. Cell.* **12**, 101–111 (2003)
61. Kelly J., Jarrell H., Millar L., Tessier L., Fiori L.M., Lau P.C., Allan B., Szymanski C.M.: Biosynthesis of the N-linked glycan in *Campylobacter jejuni* and addition onto protein through block transfer. *J. Bacteriol.* **188**, 2427–2434 (2006)
62. Kowarik M., Numao S., Feldman M.F., Schulz B.L., Callewaert N., Kiermaier E., Catrein I., Aebi M.: N-linked glycosylation of folded proteins by the bacterial oligosaccharyltransferase. *Science*, **314**, 1148–1150 (2006)
63. Kowarik M., Young N.M., Numao S., Schulz B.L., Hug I., Callewaert N., Mills D.C., Watson D.C., Hernandez M., Kelly J.F. i wsp.: Definition of the bacterial N-glycosylation site consensus sequence. *EMBO J.* **25**, 1957–1966 (2006)
64. Ku S.C., Schulz B.L., Power P.M., Jennings M.P.: The pilin O-glycosylation pathway of pathogenic *Neisseria* is a general system that glycosylates AniA, an outer membrane nitrite reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **378**, 84–89 (2009)
65. Lalonde M.E., Durocher Y.: Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *J. Biotechnol.* **251**, 128–140 (2017)
66. Larsen J.C., Szymanski C., Guerry P.: N-linked protein glycosylation is required for full competence in *Campylobacter jejuni* 81–176. *J. Bacteriol.* **186**, 6508–6514 (2004)
67. Lertsethakarn P., Ottemann K.M., Hendrixson D.R.: Motility and chemotaxis in *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**, 389–410 (2011)
68. Lesinski G.B., Westerink M.A.: Novel vaccine strategies to T-independent antigens. *J. Microbiol. Methods.* **47**, 135–149 (2001)
69. Lithgow K.V., Scott N.E., Iwashkiw J.A., Thomson E.L., Foster L.J., Feldman M.F., Dennis J.J.: A general protein O-glycosylation system within the *Burkholderia cepacia* complex is involved in motility and virulence. *Mol. Microbiol.* **92**, 116–137 (2014)
70. Lizak C., Gerber S., Numao S., Aebi M., Locher K.P.: X-ray structure of a bacterial oligosaccharyltransferase. *Nature*, **474**, 350–355 (2011)
71. Logan S.M.: Flagellar glycosylation – a new component of the motility repertoire? *Microbiology*, **152**, 1249–1262 (2006)
72. Lombard V., Golaconda Ramulu H., Drula E., Coutinho P.M., Henrissat B.: The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* **42**, D490–495 (2014)
73. Lu Q., Li S., Shao F.: Sweet Talk: Protein Glycosylation in Bacterial Interaction With the Host. *Trends Microbiol.* **23**, 630–641 (2015)
74. Mahdavi J., Pirinccioglu N., Oldfield N.J., Carlsohn E., Stoof J., Aslam A., Self T., Cawthraw S.A., Petrovska L., Colborne N. i wsp.: A novel O-linked glycan modulates *Campylobacter jejuni* major outer membrane protein-mediated adhesion to human histo-blood group antigens and chicken colonization. *Open Biol.* **4**, 130202 (2014)
75. Makela P.H., Kayhty H., Leino T., Auranen K., Peltola H., Ekstrom N., Eskola J.: Long-term persistence of immunity after immunisation with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *Vaccine*, **22**, 287–292 (2003)

76. Mandlik A., Swierczynski A., Das A., Ton-That H.: Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends Microbiol.* **16**, 33–40 (2008)
77. McNally D.J., Hui J.P., Aubry A.J., Mui K., Guerry P., Brisson J.R., Logan S.M., Soo E.C.: Functional characterization of the flagellar glycosylation locus in *Campylobacter jejuni* 81–176 using a focused metabolomics approach. *J. Biol. Chem.* **281**, 18489–18498 (2006)
78. Melli L.J., Ciocchini A.E., Caillava A.J., Voza N., Chinen I., Rivas M., Feldman M.F., Ugalde J.E., Comerchi D.J.: Serogroup-specific bacterial engineered glycoproteins as novel antigenic targets for diagnosis of shiga toxin-producing-*Escherichia coli*-associated hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 528–538 (2015)
79. Nagar R., Rao A.: An iterative glycosyltransferase EntS catalyzes transfer and extension of O- and S-linked monosaccharide in enterocin 96. *Glycobiology*, **27**, 766–776 (2017)
80. Nothaft H., Davis B., Lock Y.Y., Perez-Munoz M.E., Vinogradov E., Walter J., Coros C., Szymanski C.M.: Engineering the *Campylobacter jejuni* N-glycan to create an effective chicken vaccine. *Sci. Rep.* **6**, 26511 (2016)
81. Nothaft H., Liu X., McNally D.J., Szymanski C.M.: N-linked protein glycosylation in a bacterial system. *Methods Mol. Biol.* **600**, 227–243 (2010)
82. Nothaft H., Scott N.E., Vinogradov E., Liu X., Hu R., Beadle B., Fodor C., Miller W.G., Li J., Cordwell S.J. i wsp.: Diversity in the protein N-glycosylation pathways within the *Campylobacter* genus. *Mol. Cell Proteomics*, **11**, 1203–1219 (2012)
83. Nothaft H., Szymanski C.M.: Protein glycosylation in bacteria: sweeter than ever. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 765–778 (2010)
84. Ollis A.A., Zhang S., Fisher A.C., DeLisa M.P.: Engineered oligosaccharyltransferases with greatly relaxed acceptor-site specificity. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 816–822 (2014)
85. Oman T.J., Boettcher J.M., Wang H., Okalibe X.N., van der Donk W.A.: Sublancin is not a lantibiotic but an S-linked glycopeptide. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 78–80 (2011)
86. Pappas G., Akritidis N., Bosilkovski M., Tsianos E.: Brucellosis. *N. Engl. J. Med.* **352**, 2325–2336 (2005)
87. Parkhill J., Wren B.W., Mungall K., Ketley J.M., Churcher C., Basham D., Chillingworth T., Davies R.M., Feltwell T., Holtroyd S. i wsp.: The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, **403**, 665–668 (2000)
88. Perez C., Kohler M., Janser D., Pardon E., Steyaert J., Zenobi R., Locher K.P.: Structural basis of inhibition of lipid-linked oligosaccharide flippase PglK by a conformational nanobody. *Sci. Rep.* **7**, 46641 (2017)
89. Pinho S.S., Reis C.A.: Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat. Rev. Cancer*, **15**, 540–555 (2015)
90. Power P.M., Seib K.L., Jennings M.P.: Pili glycosylation in *Neisseria meningitidis* occurs by a similar pathway to wzy-dependent O-antigen biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **347**, 904–908 (2006)
91. Ravenscroft N., Haeuptle M.A., Kowarik M., Fernandez F.S., Carranza P., Brunner A., Steffen M., Wetter M., Keller S., Ruch C. i wsp.: Purification and characterization of a *Shigella* conjugate vaccine, produced by glycoengineering *Escherichia coli*. *Glycobiology*, **26**, 51–62 (2016)
92. Riddle M.S., Kaminski R.W., Di Paolo C., Porter C.K., Gutierrez R.L., Clarkson K.A., Weerts H.E., Duplessis C., Castellano A., Alaimo C. i wsp.: Safety and immunogenicity of a candidate bioconjugate vaccine against *Shigella flexneri* 2a administered to healthy adults: a single-blind, randomized phase I study. *Clin. Vaccine Immunol.* **23**, 908–917 (2016)
93. Salah Ud-Din A.I.M., Roujeinikova A.: Flagellin glycosylation with pseudaminic acid in *Campylobacter* and *Helicobacter*: prospects for development of novel therapeutics. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 1163–1178 (2018)
94. Schoenhofen I.C., Vinogradov E., Whitfield D.M., Brisson J.R., Logan S.M.: The CMP-legionaminic acid pathway in *Campylobacter*: biosynthesis involving novel GDP-linked precursors. *Glycobiology*, **19**, 715–725 (2009)
95. Schwarz F., Fan Y.Y., Schubert M., Aebi M.: Cytoplasmic N-glycosyltransferase of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is an inverting enzyme and recognizes the NX(S/T) consensus sequence. *J. Biol. Chem.* **286**, 35267–35274 (2011)
96. Scott N.E., Nothaft H., Edwards A.V., Labbate M., Djordjevic S.P., Larsen M.R., Szymanski C.M., Cordwell S.J.: Modification of the *Campylobacter jejuni* N-linked glycan by EptC protein-mediated addition of phosphoethanolamine. *J. Biol. Chem.* **287**, 29384–29396 (2012)
97. Shcherbakova A., Tiemann B., Buettner F.F., Bakker H.: Distinct C-mannosylation of netrin receptor thrombospondin type 1 repeats by mammalian DPY19L1 and DPY19L3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 2574–2579 (2017)
98. Shen A., Kamp H.D., Grundling A., Higgins D.E.: A bifunctional O-GlcNAc transferase governs flagellar motility through anti-repression. *Genes Dev*, **20**, 3283–3295 (2006)
99. Spiro R.G.: Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, **12**, 43R–56R (2002)
100. Stephenson H.N., Mills D.C., Jones H., Milioris E., Copland A., Dorrell N., Wren B.W., Crocker P.R., Escors D., Bajaj-Elliott M.: Pseudaminic acid on *Campylobacter jejuni* flagella modulates dendritic cell IL-10 expression via Siglec-10 receptor: a novel flagellin-host interaction. *J. Infect. Dis.* **210**, 1487–1498 (2014)
101. Szymanski C.M., Yao R., Ewing C.P., Trust T.J., Guerry P.: Evidence for a system of general protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*. *Mol. Microbiol.* **32**, 1022–1030 (1999)
102. Terra V.S., Mills D.C., Yates L.E., Abouelhadid S., Cuccui J., Wren B.W.: Recent developments in bacterial protein glycan coupling technology and glycoconjugate vaccine design. *J. Med. Microbiol.* **61**, 919–926 (2012)
103. Thibault P., Logan S.M., Kelly J.F., Brisson J.R., Ewing C.P., Trust T.J., Guerry P.: Identification of the carbohydrate moieties and glycosylation motifs in *Campylobacter jejuni* flagellin. *J. Biol. Chem.* **276**, 34862–34870 (2001)
104. Twine S.M., Paul C.J., Vinogradov E., McNally D.J., Brisson J.R., Mullen J.A., McMullin D.R., Jarrell H.C., Austin J.W., Kelly J.F. i wsp.: Flagellar glycosylation in *Clostridium botulinum*. *FEBS J.* **275**, 4428–4444 (2008)
105. Tytgat H.L., Lebeer S.: The sweet tooth of bacteria: common themes in bacterial glycoconjugates. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **78**, 372–417 (2014)
106. van Alphen L.B., Wuhrer M., Bleumink-Pluym N.M.C., Hensbergen P.J., Deelder A.M., van Putten J.P.M.: A functional *Campylobacter jejuni maf4* gene results in novel glycoforms on flagellin and altered autoagglutination behaviour. *Microbiology*, **154**, 3385–3397 (2008)
107. van Sorge N.M., Bleumink N.M., van Vliet S.J., Saeland E., van der Pol W.L., van Kooyk Y., van Putten J.P.: N-glycosylated proteins and distinct lipooligosaccharide glycoforms of *Campylobacter jejuni* target the human C-type lectin receptor MGL. *Cell Microbiol.* **11**, 1768–1781 (2009)
108. Venugopal H., Edwards P.J., Schwalbe M., Claridge J.K., Libich D.S., Stepper J., Loo T., Patchett M.L., Norris G.E., Pascal S.M.: Structural, dynamic, and chemical characterization

- of a novel S-glycosylated bacteriocin. *Biochemistry*, **50**, 2748–2755 (2011)
109. Verma A., Arora S.K., Kuravi S.K., Ramphal R.: Roles of specific amino acids in the N terminus of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin and of flagellin glycosylation in the innate immune response. *Infect. Immun.* **73**, 8237–8246 (2005)
110. Vik A., Aas F.E., Anonsen J.H., Bilsborough S., Schneider A., Egge-Jacobsen W., Koomey M.: Broad spectrum O-linked protein glycosylation in the human pathogen *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 4447–4452 (2009)
111. Wacker M., Feldman M.F., Callewaert N., Kowarik M., Clarke B.R., Pohl N.L., Hernandez M., Vines E.D., Valvano M.A., Whitfield C. i wsp.: Substrate specificity of bacterial oligosaccharyltransferase suggests a common transfer mechanism for the bacterial and eukaryotic systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 7088–7093 (2006)
112. Wacker M., Linton D., Hitchen P.G., Nita-Lazar M., Haslam S.M., North S.J., Panico M., Morris H.R., Dell A., Wren B.W. i wsp.: N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science*, **298**, 1790–1793 (2002)
113. Wacker M., Wang L., Kowarik M., Dowd M., Lipowsky G., Faridmoayer A., Shields K., Park S., Alaimo C., Kelley K.A. i wsp.: Prevention of *Staphylococcus aureus* infections by glycoprotein vaccines synthesized in *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, **209**, 1551–1561 (2014)
114. Yates L.E., Mills D.C., DeLisa M.P.: Bacterial Glycoengineering as a Biosynthetic Route to Customized Glycomolecules. (w) *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2018, s. 1–34
115. Young N.M., Brisson J.R., Kelly J., Watson D.C., Tessier L., Lanthier P.H., Jarrell H.C., Cadotte N., St Michael F., Aberg E. i wsp.: Structure of the N-linked glycan present on multiple glycoproteins in the Gram-negative bacterium, *Campylobacter jejuni*. *J. Biol. Chem.* **277**, 42530–42539 (2002)
116. Yuan J., O'Donoghue P., Ambrogelly A., Gundllapalli S., Sherrer R.L., Palioura S., Simonovic M., Soll D.: Distinct genetic code expansion strategies for selenocysteine and pyrrolysine are reflected in different aminoacyl-tRNA formation systems. *FEBS Lett.* **584**, 342–349 (2010)
117. Zabczyńska M., Pochec E.: The role of protein glycosylation in immune system. *Post. Biochem.* **61**, 129–137 (2015)