

FARKLI BİR BAKTERİ TOPLULUĞU MİKOBAKTERİLERDE HÜCRE DUVARI YAPISI

Prof. Dr. Fatih KÖKSAL, Doç. Dr. Akgün YAMAN

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana

Giriş

Mycobacteriaceae ailesine mensup olan mikobakteriler; sporsuz, hareketsiz, aside dirençli, bölünme süreleri 12-18 saat olup yavaş üreyen, pleomorfik çomaklardır. Ailenin tek genusu Mycobacterium'lardır (tablo-1). Bu genus içerisinde yer alan mikroorganizmalar çok farklı özelliklere sahiptir. Bazı mikobakteriler toprak ve suda vinilylklorid ve phenanthrene gibi recalsitran organik bileşikleride degrade ederek, steroidler ve düşük alkalenlerin optikal aktif oksidlerini üretirlerken, bazıları da yüksek vertabralı hayvanlarda ölümle sonlanabilen hastalıklara neden olan intrasellüler patojenlerdir. İnsanlarda infeksiyon oluşturan türleri ile mikobakteriler tüm dünyada önlenebilir ölümlerin en önemli sebepleri arasında yer alan tüberküloza neden olurlar. Son derece özelleşmiş olan hücre duvarları yapıları ile her türlü saldırıya karşı korunarak kronik infeksiyonlara yol açabilen mikobakteriler, tarihin ilk çağlarından beri korku ve ilginin odağında yer almışlardır.

Tablo-1: Mikobakterilerin sınıflandırılması

Alem : Prokaryot (Bakteri)

Bölüm : Firmicutes

Sınıf : Actinobacteria

Takım : Actinomycetales

Aile : Mycobacteriaceae

Genus : Mycobacterium

Tür : M. tuberculosis

Özellikle M.tuberculosis kompleksi içerisinde yer alan M.tuberculosis, M.bovis, M.africanum, M.canettii, M.pinnipedii, M.shottsii ve M.microti ile M.lepra gibi yavaş üreyenler başta olmak üzere , Mikobakteriler hücre duvarı komplekslerinin düşük permabilite ve hidrofobisite gibi özellikleri nedeni ile bazı yararlı metabolitlerin kullanabilme güçlüklerine karşılık, hidrofilik antibiyotikler, metal iyonları ve dezenfektanlar gibi kimyasal toksik ajanlar

oksijen radikalleri gibi hücresel toksinlere, asit (pH: 5-6) ve alkali ortama ve alanin boyalara karşı intrinsik dirence sahiptirler. Bu özellikleri ile kendilerini hücre içi ve hücre dışı zararlılara karşı koruyan mikobakteriler, hücre duvarlarında taşıdıkları bazı yapı elemanları ile konağın immun cevabını da etkileyerek asemptomatik taşıyıcılıktan, kronik granülomatöz, tedaviye cevap vermeyen yüksek mortalite ile seyreden infeksiyonlara kadar değişen klinik tablolara yol açarlar. Günümüzde Dünya'da 1.86 milyar kişi M.tuberculosis kompleksi basillerle infektidir ve bunların % 10'unda aktif infeksiyon gelişecek ve çoğu genç yetişkinlerden olmak üzere hastaların en az % 23'ü kaybedilecektir.

Son yıllarda özellikle, gelişmiş toplumlarda doğumsal veya HIV, lösemiler, diabet alkol ve uyuşturucu bağımlılığının yarattığı kazanılmış immun yetmezliği olan kişilerin sayısının artışına bağlı olarak M.avium kompleksinde yer alan mikobakterilerin de katılımı ile akciğer tüberkülozu insidansının tekrar artma trendine geçişi, M.tuberculosis suşları arasında çoklu ilaç direnci gösteren izolatların artması ve bu suşlarla oluşan infeksiyonların % 70'inin 4-6 hafta gibi daha kısa bir sürede ölümle sonlanması mikobakterilerle ilgili çalışmaların yeniden hız kazanmasına neden olmuştur. Mikobakterilerde 1960'lı yıllarda 2 ilaca karşı % 1-2 oranında olan direnç, 1991 yılında 4 ilaca karşı % 13 gibi yüksek oranlara ulaşmıştır. Bu nedenle çalışmaların odağını daha etkili, özellikle bakterisidal yeni antibiyotikler ve koruyucu immun cevabı uyatabilecek yeni potent aşılar yaratmak

oluşturmaktadır. Bu amaçlara ulaşabilmek için de mikobakteri hücre duvarı elemanlarının, yapısı, fizyolojik ve kimyasal özellikleri ve biyosentez mekanizmalarının çok iyi analiz edilmesi gereklidir.

Mikobakterilerin hücre duvarı ile ilgili yapılan çalışmalar yine infeksiyonun yüksek morbidite ve mortalite ile seyrettiği 1950'li yıllarda yapılmış ve 1960'lı yıllarda yapı ile ilgili çok önemli bilgiler elde edilmiştir. Ancak gerek teknolojik yetersizlikler gerekse gelişmiş ülkelerde önceliğini yitirmiş olması nedeni ile mikobakterilerle ilgili çalışmalara uzun süre ara verilmiştir. Son yıllarda tıbbi ihtiyacın yanı sıra bir taraftan spektroskopi alanında sağlanan gelişmeler ve bu bağlamda Nükleer Magnetik Rezonans-NMR- ve mass spektrofotometrenin hücre duvarı elemanlarının yapısal analizlerinde daha detaylı bilgileri sağlaması diğer taraftan da moleküler genetik çalışmaları sonucu M.tuberculosis (H37Rv,CDC1551), M.bovis (AF21.22/97) ve M.lepra gibi önemli patojen türlerin gen analizlerinin yapılarak hem yapısal, hem de metabolizma ile ilgili daha detaylı bilgilere ulaşılabilmesi, çalışmaların yeniden hız kazanmasına neden olmuştur.

Genom :

Mikobakterilerle ilgili yapılan çalışmalar M.tuberculosis, B.bovis ve M.lepra türlerinin gen analizlerinin yapılmasından sonra hız kazanmış, bakterinin fizyolojik biyokimyasal antijenik ve genetik özellikleri hakkındaki bilgilerimiz daha da berraklaşmış, bu bilgilerin ışığında yeni profilaksi ve tedavi çalışmaları hız kazanmıştır. Yapılan gen analizleri Mikobakterilerin genomunun B.subtulis ve E.coli gibi kolay ve hızlı üreyen

bakterilere göre daha küçük olduğunu göstermiştir. *M.tuberculosis* H37Rv suşunun gen büyüklüğü 4.411.529 bp olup yaklaşık olarak 3.986 proteini kodlamaktadır(Cole 1998). Buna karşılık *M.tuberculosis* CDC1551 suşunun gen büyüklüğü ise 4.403.836 bp olarak tespit edilmiş olup yaklaşık olarak 4.187 proteini kodladığı bildirilmiştir. *M.lepra* genomu ise 3.300.000 bp kadardır(Fleishmann 2001). Bu suşlarda tanımlanabildiği kadarı ile genomun büyük kısmının(%59) replikasyonla ilgili olduğu, kalan bölgenin %30'unun lipid ve polyketide (phthiocerol dimycocerosate) sentetaz ile ilgili genler, %10'ununda PE-(proline glutamate) ve PPE (proline-proline-glutamate) olarak tanımlanan iki akraba gen ailesine ait olduğu belirlenmiştir. Ayrıca non-coding diziler (13E12 ailesi), insertion dizileri (IS) ve mikobakterieler için özel olan, Mikobakteri tekrarlayan üniteleri (MIRU) kodlayan gen bölgeleri de deşifre edilmiştir. Hızlı üreyen bakterilerden *B.subtilis* genlerin % 75'inin replikasyondan sorumlu olması, mikobakteri geninde 1 tane rRNA operonu bulunmasına karşılık *E.coli*'de 7 adet rRNA operonunun olması mikobakterilerin neden yavaş ürediklerini açıklamaktadır. Mikobakterilerde PE ve PPE proteinlerini kodlayan gen dizileri dışında kalan bölgelerde G+C oranının da alışımlı bakterilerden daha yüksek oluşu(G+C=%80), bunların farklı bir gen ailesi oluşturduğunu göstermektedir. Ancak mikobakterilerde enerji üretim ve dönüşümünü sağlayan gen yapılarının çoğunun *E.coli* ve *pseudomonas*'lar gibi Gram negatif bakterilerle büyük ölçüde homolog oluşu,

Gram negatif bakterilere bir yakınlık olarak değerlendirilebilir.

Mikobakterilerde lipid metabolizması ile ilgili genlerin çokluğu bu bakterilerin metabolizmalarında karbon kaynağı olarak lipidleri kullandıklarını göstermektedir. *E.coli*, *FadA*, *FadB*, *FadC* ve *FadD* genlerinin dahil olduğu Fad sistemin aktivasyonu ile yağ asitlerini karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir. Bu sistem acetyl-coA üretmek için yağ asitlerinin β -oksidasyonunu katalize eder. Oksitlenmiş yağ asitleride bir aktif glyoxalate üzerinden Krebs siklusuna girerler. β -oksidasyon işleminin ilk adımı yağ asitlerinin bir koenzim A ya bağlanmalarıdır. Bu işlem *E.coli*'de *FadD*(acyl-CoA-synthetase) tarafından katalize edilir. Bu enzim(*FadD*) *E.coli* genomunda tek kopya olarak bulunur. *M.tuberculosis* genomunda da *E.coli*'deki *FadD* geni ile homolog 36 ve *FadE* geni ile homolog 36 gen bölgesi bulunmaktadır. *FadD* genlerinin çoğunun polyketide sentetaz enzimini kodlayan gen bölgelerinin operonlarını transkribe ettiği gösterilmiştir. Bu mikobakterilerdeki *FadD* genlerinin çoğunun lipid yıkımından çok sentezi ile ilişkili olduğunu göstermektedir. β -oksidasyonla ilgili genlerin çokluğu mikobakterilerin çok çeşitli lipidleri karbon kaynağı olarak kullanabilecek mekanizmalara sahip olduğunu ispatlamaktadır. Enfeksiyon esnasında karşılaşılabilecek farklı lipidlere karşı farklı *FadD* genleri mevcut olup, sıklıkla konağa ait doku lipidleri, dokuda yetersizlik halinde de hücre duvarında bulunan lipidler kaynak olarak kullanılır.

M.tuberculosis genomundaki diğer önemli gen toplulukları olan PE ve PPE genleri,

hücre duvarı lipidlerinin sentezinde önemli rol oynayan ve immun sistemi baskılayan suda çözülme-yen çok sayıda protein kodlarlar. Bu gen bölgeleri adlarını kodladıkları proteinleri amino N uçlarındaki motiflerden alırlar. Konservatif özelliğe sahip bu motiflerden PE (pro- glu) yaklaşık olarak 110 amino asit büyüklüğünde ve PPE (pro-pro-glu) ise yine yaklaşık olarak 180 amino asit büyüklüğünde yapılardır. Bu proteinlerin C terminal uzantıları ise 100-1400 amino asit arasında değişen büyüklüğe sahiptir. Protein analiz çalışmaları ile mikobakterilerde 38 PE proteini, 61 PE-PGRS proteini ve 68 PPE protein tespit edilmiştir. PE ailesi proteinler arasında filogenetik analiz yöntemi ile çok sayıda alt grup tespit edilmiştir. Tüm PE nin %50'sinden fazlasını oluşturan, Gly-Gly-X tekrarlayan dizisine sahip olan glisin zengin polymorphic glycin repetitive sequence (PGRS) grubun en büyüğüdür. PPE ailesinde yer alan proteinlerde 3 alt grup içerisinde toplanmıştır bunların ilki; NxGxGNxG tekrarlayan (major polymorphic tandem repeated-MPTR) dizileri taşıyan gruptur. İkinci alt grupta ise GxxSVPxxW tekrarlayan bölgelere sahip proteinler yer alırken 3. gruptaki proteinlerin benzer tekrarlayan bölgeleri yoktur.

PE ve PPE genleri tarafından kodlanan proteinler hücre duvarı sentezinde rol oynayan antijenik özelliğe sahip proteinlerdir. Bu proteinlerin yapısındaki değişiklikler konağın immun cevabından korunmada etkili olmaktadır. M.marinum suşlarında PE/PGRS alt grubuna ait genleri çıkartıldıktan sonra yapılan kurbağa enfeksiyonu çalışmaları, mutant bakterinin kurbağa makrofajı

içerisinde çoğalmasının yavaşladığını ve yaşam süresinin kısaldığını, dokulara yayılımı ve granülom oluşturma yeteneklerinin de azaldığını göstermiştir. PPE ailesi proteinlerden en az bir tanesinin M.tuberculosis'in invivo şartlarda çoğalması için gerekli olduğu gösterilmiştir.

Hücre duvarı:

Mikobakterilerin hücre duvarı yapısı alışıla gelmiş Gam negatif veya Gam pozitif bakteri hücre duvarlarından oldukça farklı, kompleks bir yapıdır. Bu kompleksde en iç tabaka diğer bakterilerde de görülen plazma membranıdır. Orta tabakanın koru ve duvarın iskeleti peptidoglikan arabinogalaktan (AGP)'in mikolik asit esterinden oluşan *mycolylarabinogalaktan peptidoglikan* (mAGP) oluşturur. Benzer kor yapısı mikobakteriler dışında korinobakteriler ve nokardiyalarda da görülür. Mikolik asitlerin dışında çok sayıda farklı polar veya apolar yapıda nonkovalent bağlı lipid ve glikolipidler hücre duvarında yer alır. Ökaryotlu hücreler için biyolojik aktif olan bu lipidler ve glikolipidlerin bolluğu ve asimetric dizilişleri hücre duvarına aşırı derecede hidrofobisite kazandırır. Non kovalent bağlı lipidler arasında, α,α' trehalose dimycolates(TDM) ve α,α' trehalose monomycolates(TMM) gibi açillenmiş trehalozlar, glycerol monomycolates ve phospholipidler önemlidir. Sadece yavaş üreyen mikobakterilerde görülen galaktosamin(GalNH₂), kor bölgede yer alan arabino- galaktan molekülündeki arabinoz ünitesine bağlı, alışıla gelmiş N-acetyl komponenti olmaktan çok serbest amin şeklinde görülmektedir.

Mikobakterilerin en dışında ise özellikle infekte makrofajlardan hazırlanan preparatlarda açık olarak gösterilebilen ağırlıklı olarak polisakkarit ve proteinlerden az miktarda da lipidleri içeren kapsül yer almaktadır. Bu yapılar içerisinde alfa-1,4 glukoz, bir arabinomannan ve mannan içeren içeren lipomannan (LM) ve Lipoarabinomanna (LAM) gibi kapsüller polisakkaritler, son derece önem arz eder. Mikobakterilerin hücre duvarında Gram negatif bakterilerde görülen porin proteinleride bulunur.

Plazma membranı: Mikobakterilerin plazma membranları diğer bakterilerin plazma membranları ile benzer özelliklere sahiptir. Membran tipik olarak protein ve fosfolipidlerden oluşan çift katmanlı bir yapıdadır. Kuramsal olarak bir periplazmik boşluk sayesinde orta tabaka yani peptidoglikandan ayrılır.

Orta tabaka: Hücre duvarının orta tabakası peptidoglikan, AG, mikolik asitler, Acyl trehaloselar, oligosakkarid içeren lipidler ve phophatidylinositol'ün glycosyl derivatları yer almaktadır. Bu yapılara antijenik özelliğe sahip glikoproteinler ile porin yapılarda katılmaktadır.

Peptidoglikan yapı: Mikobakterilerde hücre duvarının en önemli karakteristiği kemotip-IV peptidoglikan yapısıdır. Klasik bakteriyel peptidoglikandan farklı olan bu yapı *N-acetyl-glocosamine*(NAGA) ve *N-glycosylmuramic asit*'in(NGMA), betaglikozid ve fosfodiester bağlarla bağlanmasından oluşan bir heteropolimerdir. Muramik asidin glikolik asit ile glikozillenmiş residülerinin(NGMA) yaklaşık olarak %10-12

sinde 6. pozisyonda yer alan *L-alanyl-D-isoglutaminy-meso-diaminopimelyl-D-alanin*'den oluşan bir tetrapeptid yan zincir yardımı ile fosfodiester bağlarla bağlanmışlardır. Diğer bakterilerin peptidoglikanlarından farklı olarak mikobakteri peptidoglikanında, bir başka ifade ile kemotip-IV peptidoglikanda iki önemli farklılık görülmektedir. Bunların ilki muramik asidin asetillenmiş yapısı yerine glikolik asitle glikozillenmiş formunun yapıda yer alması, diğeri de tetrapeptid yan zincirler diaminopimelik asidin(DAP) yer almasıdır. Tetrapeptid köprüler arasındaki bağlantıda yer alan pentapeptid zincirler bir tetrapeptid zincirin DAP'ı takip eden zincirin D-alanin'i arasında bağlantı kurmaktadır. M.lepra'da tetrapeptid yapıdaki L-alanin çıkmış yerine glisin girmiştir. Bu değişikliğin bakteriye ne kazandırdığı veya kaybettirdiği bilinmemektedir. Farklı bir ligaz geninin gösterilememesi bu değişimin in vivo şartlarda çevreden etkilenecek olduğu şeklinde değerlendirilmiştir. NAGA ile NGMA arasındaki kros bağlanmada görülen transglikolizasyon ve transpeptidasyon işlemleri Penisilin Bağlayan Protein(PBP) olarak tanımlanan bir dizi enzim tarafından yönetilir.

Mikobakterilerdeki peptidoglikan tabaka kor bölgesinin iskeletini oluşturmak üzere Gram pozitif bakterilerdeki teikoik asidin bağlanmasına benzer bir disakkarit fosforil (diglycosylphosphoryl) köprü ile bir heteropolisakkarit olan AG'ı kovalent olarak bağlar Mikobakterilerde kor bölgenin sentezi bu disakkarit fosforil köprünün sentezi için bir decaprenyl-P'nin sentezlenmesi ile başlar.

Galaktoz köprü ile peptidoglikana bağlandıktan sonra arabinozu bağlar. Çok dallı arabinoz ve galaktoz zincirleri birlikte uzamaya başlar ve sitoplazmik membran yolu ile orta tabakaya taşınırlar. Daha sonra mikolik asitler bağlanır ve orta tabakanın(kor'un) sentezi tamamlanır.

Peptidoglikan yapı bakteriye şeklini verir, hücre duvarına bütünlük ve sertlik kazandırır. Tetrapeptid yapıda yer alan DAP nedeni ile lizozimlere karşı dirençlidir ve kesin deliller olmamakla beraber muramik asit rezidündeki N-glycosyl gruplar organizmayı degradasyona karşı korur.

Arabinogalakattan(AG): Arabinogalakattanın yapısı ile ilgili 50 yılı aşkın süredir yapılan çalışmalar bu polimer yapının *D-galactofuranos*'lar ve *D-arabinofuranos*'lardan oluştuğunu göstermiştir. Bunlar doğada son derece nadir görülürler ve yapısal olarak diğer bakterilerde görülen polisakkaritlerden oldukça farklıdır. Bu polisakkarit polimerlerinde bazı yapısal motif farklılıkları görülmekle beraber tekrarlayan birimlere rastlanmaz. Gerek AG'de gerekse LAM'da arabinan'ın yapısı benzerdir ve muhtemelen arabinanın kaynağı β -D-Araf-monophosphodecaprenol(DPA)'dür. AG'in homogalakattan rezidüleri, ki bunlar *M.tuberculosis* de yaklaşık olarak 30 üniteden oluşur, peptidoglikan yapıdaki muramik asidin C-6 pozisyonuna, diglycosylphosphoryl köprü, Rha(13)D-GlcNac-L-P ile bağlanır. Arabinan(Ara_r) genel olarak 5 halkadan oluşur. Bu halkalar daha sonra 3-5 halkalı yan dallara ayrılırlar(Ara_{r-α}). Arabinan'ın 3. halkası da homogalakattan zincire indirgeyici ucu ile

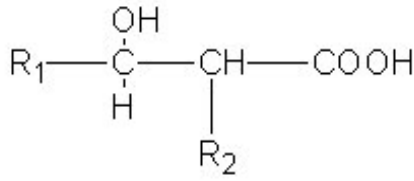
bağlanır. Arabinanın dallanma gösteren halkaların indirgeyici olmayan uçları *hexaarbinofuranosyl* [(β D- Ara_r -(1-2)- α -D- Ara_r -]_{2-3,5})- α -D- Ara_r -(1-5))- α -D- Ara_r motifler taşır. Mikolik asitlerin farklı türleri arabinan zincirin son pentarabinofuranosyl ünitesinin üzerindeki uçların yaklaşık olarak 2/3'üne mAG yi oluşturmak üzere 4'lü gruplar halinde bağlanır .

Mikolik asitler: Mikolik asitler α dallanma gösteren β hidroksillenmiş büyük yağ asitleridir. Mikobakteriler dışında, *Corynebacterium*'lar, *Gordona*, *Nocardia* ve *Rhodococcus* türlerindedir ve hücre duvarı yapısına girdikleri mikroorganizmalar arasında yapısal olarak 3 kategoriye ayrılırlar. Bunlar; büyüklükleri 28-40 karbon kadar olan ve korinebakterlerde görülen korinomikolik asitler(corynomycolic asitler), büyüklükleri 40-60 karbon kadar olup nokardiyalarda görülen nokardomikolik asitler veya nocardic asitler ve büyüklükleri 60-90 karbon kadar olup mikobakterilerde görülen mikobakteriyel mikolik asitler veya eumycolic asitlerdir.

Mikolik asitler ilk olarak 1929 yılında R.J Anderson tarafından *M.tuberculosis* suşlarında gösterilmiş ve iyi pürifiye edilemedikleri için sabunlaştırılamayan mum olarak tanımlanmışlardır. Devam eden çalışmalarda Stodola RJ (1939) ve R.J Anderson (1939) *M.tuberculosis* suşlarının balmumu maddesinin daha saf pürifikasyonlarından mikolik asitleri izole ederek isimlendirdiler. Mikolik asitlerin yapısal özellikleri ilk defa 1950 yılında Asselineau J tarafından ayrıntılı şekilde tanımlanarak formüle edildi(şekil-1). Daha

sonra NMR ve spektrografik yöntemlerde sağlanan gelişmeler gerek yapısal özellikler gerekse biyosentez konusunda daha ayrıntılı bilgilerin elde edilmesini sağladı.

Şekil-1: Mikolik asit yapısı (Asselineau J-1950)



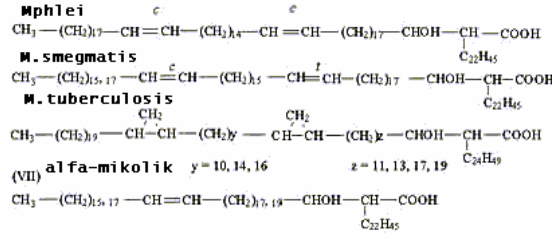
Mikolik asitler doğada polisakkaritlere esterleşmiş yapılar halinde bulunurlar. Mikobakteri hücre duvarı içerisinde AG'nın arabinan parçası üzerinde tetramyclopentarinofuranosyl esteri şeklinde peptidoglikana dik olarak yerleşirler. mAGP dışında hücre duvarında mikolik asitler trehalos'la esterleşmiş şekilde TMM ve TDM'de, mikolatfosfolipidler ve diğer mikolatlanmış lipidler halinde bulunurlar. Mikolik asitler mikobakterilerde tüm hücre duvarı kuru ağırlığının % 50'si ile hücre lipidlerinde %60'ını oluştururlar. TMM ve TDM dışında hücre duvarına non kovalent bağlarla bağlanmış asimetrik dağılım gösteren lipid fraksiyonları ile birlikte hücre duvarında hidrofobik bir bariyer oluştururlar. Mikobakterilerde mAGP kompleksinde iki farklı mikolik asit türü görülür. Bunlardan ilki oksitlenmiş grupları içermeyen 60 karbon büyüklüğündeki α -mikolik asitlerdir. Bu yapıda bir çift bağ veya siklopropan halka yer

alır. *M.tuberculosis* de dahil olmak üzere bir çok mikobakteri türünde görülen major mikolik asitler olup tüm mikolik asitlerin % 25'den fazlasını oluştururlar. *M.fallax*, *M.triviale* ve *M.brumae* da ise sadece α -mikolik asitler görülür. Diğer mikolik asit türleride de α -mikolik asit zincirine oksitlenmiş fonksiyonel gruplar eklenmiş meromikolik asitlerdir. Mikolik asitlerin moleküler yapısı $\text{R}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CHR}_1\text{COOH}$ şeklinde olup, bu yapıda R_1 20-24 karbonlu linear bir alkane, R_2 ise 30-60 karbon atomuna sahip daha kompleks bir aldehit yapıyı temsil eder. Meromikolik asitler β hidroksillenmiş bölgedeki fonksiyonel gruplara göre isimlendirilirler. $\text{C}=\text{O}$ grubu içerenler keto- (veya oxo-) mikolatlar, $\text{CH}_3\text{OCH}=\text{}$ grubu içerenler metoksi-mikolatlar, bir metil grubu ile trans-O içeren epoksi-mikolatlar, COOH içerenler karboksi-mikolatlar veya sıklıkla anıldığı gibi, dicarboxy-mikolatlar olarak tanımlanırlar. Bunlar ince tabaka kromatografisi ile metil esterleri olarak kolaylıkla analiz edilebilirler ve mikobakterilerin ayırımına yardımcı olurlar(Şekil-2).

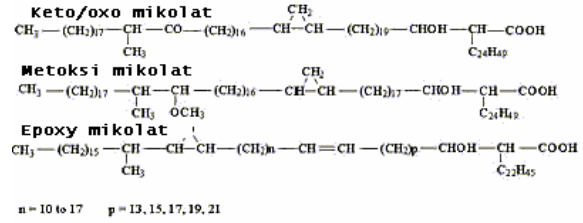
Meromikolat üzerindeki fonksiyonel grupların mikobakterilerin virulansı ve konakla ilişkisi üzerine önemli etkileri görülür. *M.kansasii* ve *M. tuberculosis* gibi patojen mikobakterilerde siklopropan halka, çift bağların yerini almıştır. Buna karşılık hızlı üreyen apatojen *M.smegmatis*'de siklopropan görülmez. Siklopropan'ın çift bağ yerine geçişi mikolik asit methyltransferase gen ailesine ait genlerin aktivitesi ile sağlanır.

Sekil-2: α -mikolik asitler ve meromikolatın üzerinde yer alan fonksiyonel gruplar

A- α -mikolik asitler(IV)



B-Meromikolik asitler



Siklopropan sentetaz enzimlerini kodlandığı bu gen bölgelerindeki delesyonel mutasyonların enfeksiyonun kronikleşmesini engellediği fare çalışmaları ile gösterilmiştir. Diğer taraftan Ketomikolat'lar M.tuberculosis'in makrofaj içerisinde yaşamasına yardım eder. İn vivo şartlarda üretimleri 5 kat artan ketomikolatların yokluğu makrofaj benzeri fagositik hücrelerde mikobakterilerin ölümünü kolaylaştırır. Metosimikolatların üretiminde oksijen bağımlı olup düşük oksijen tansiyonunda üretimleri 2 kat azalır. M.lepra'da ise metoksimikolat sentezinden sorumlu *mmaA3* geni bulunmadığı için metoksimikolat hiç yoktur. M.tuberculosis'in akciğerlerde en çok havalanan bölgeye yerleşmelerinin nedenlerinden biri olarak mikolik asit üretiminin oksijen bağımlılığı gösterilebilir. Mikolik asitlerin aside dirençli oluşu fagolizozomal füzyonda vakuol içerisindeki asit ortamda mikobakterilerin hayatta kalmasını sağlar. Ancak fonksiyonel gruplara sahip meromikolatlar; yüksek hidrofobisite nedeni ile hücre duvarı permeabilitesini azaltarak zararlı kimyasal toksik maddeler, enzimler, hidrofilik

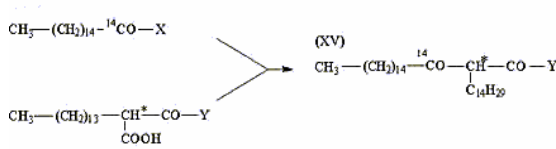
antibiyotikler ve serbest radikaller gibi kationik bileşiklere karşı ciddi bir bariyer olan mikolik asitler ve diğer hücre duvarı lipidleri arasında, bulundukları bölgelerde hücre duvarına esneklik kazandırarak hidrofilik maddeler ve özellikle hidrofilik antibiyotikler için geçiş alanları oluşturular. Ayrıca mikolik asitler ilk bilinen CD1 antijenler olup bazı özel memeli Th lenfosit subgrupları tarafından bu reseptörler yardımı ile antijen olarak tanımlanırlar. Yani konağın mikroorganizmaya karşı immun cevabını da etkilerler. Buna karşılık serbest komplemanın bağlanmasını engelleyerek klasik fagositozu önlerler.

Mikobakterilerde mikolik asit sentezi ile ilgili mekanizmalar ve sentezi yönlendiren enzim sistemleri hakkında kesin ve yeterli bilgiye sahip değiliz. Ancak yapılan çeşitli çalışmalarda kısmen faraziylere dayandırılan modeller önerilmiştir. Bu modellerde mikolik asit sentezinin; katılım (condensation), uzama (elongation), desaturasyon ve siklopropanasyon evrelerinden sonra gerçekleştiği ileri sürülmüştür. Ancak bu evrelerin hangisinin daha önce gerçekleştiği

ve nasıl tetiklendiği konusu açıklığa kavuşturulmamıştır. Genetik çalışmalar *M. tuberculosis* genomunda 5 genin (*acpM*, *kasA*, *kasB*, *inhA* ve muhtemelen, *mabA*) mikolik asit sentezinden, 8 genini (*cma1*, *cma2*, *mmaA1*, *mmaA2*, *mmaA3*, *mmaA4*, *umaA1*, *uma2*) modifikasyonlardan ve 4 geninde (*fbpA*, *fbpB*, *fbpC1*, *fbpC2*) mycolyltransferas'ların sorumlu olduğu gösterilmiştir. Ancak bu genlerin bile tam olmadığı düşünülmektedir.

a) Katılım : Korinomikolatlarla yapılan çalışmalar göstermiştir ki "mikolik asit katılımı" bir plamitoyl derivatı ile bir tetradecyl-malonyl derivatı arasındaki Claisen tipi reaksiyon sonucu gerçekleşir (Şekil-3).

Şekil-3: korinomikolik asit sentezinde katılım reaksiyonu



b) Uzama: Yapılan deneysel çalışmalar bir yağ asidinden bir mero-mycolic asit oluşumunun klasik olarak C2 ilavesi ile olduğunu ve burada çift bağlara ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir. Bu uzama işlemi 15 dakika içerisinde gerçekleşebilmektedir. Bu iki işlemden hangisinin önce gerçekleştiği bilinmemektedir. Bu işlemleri güdüleyen enzimler hakkında da kesin bilgi olmamakla beraber sitozolik enzimler olan FASI ve FASII enzim sisteminin memeli yağ asitleri sentezinde olduğu gibi mikolik asitlerin

sentezinde de etkili olduklarını gösteren deliller vardır. Ancak hala biyosentezde rol oynayan enzimlerin sitozolik enzimler mi, hücre duvarına bağlı enzimler mi yoksa suda çözülmeleyen partüküllerdeki enzimler mi olduğu sorusu tam olarak açıklık kazanmamıştır.

c) Desaturasyon ve siklopropanasyon:

Mikolik asit sentezi tamamlandıktan sonra çift bağların yerine siklopropan halkasının bağlanması *cma1*, *cma2* gen ürünü proteinler, meromikolik asit yapısındaki keto, epoksi gibi modifikasyonlarda *mmaA1*, *mmaA2*, *mmaA3*, *mmaA4*, *umaA1*, ve *uma2* genlerinin kontrolünde gerçekleşir.

Matür α mikolik asitler ve meromikolik asitler bir taşıyıcı fosfolipite bağlanarak mycolyl-mannosylphosphorylpolyprenol şeklinde plazma membranı yolu ile ya hücre duvarını oluşturmak üzere AG ile veya TMM ve TDM oluşturmak üzere trehaloz ile esterleşmek için hücre duvarına taşınırlar. Özellikle *M. smegmatis* ile yapılan çalışmalar plazma membranından pürifiye edilen polyprenolphosphate yapının mycolyl-mannosylphosphoryl- polyprenol'ün taşıyıcısı olduğunu göstermiştir. Hücre duvarındaki mikolik asitlerin bir kısmında taşıyıcısı fosfolipidler üzerinde görülürler. Gerek AG'ye gerekse TMM ve TDM'ye mikolik asitlerin esterleşmek üzere taşıyıcı fosfolipidlerden alınarak transferi Ag85 kompleksi içerisinde yer alan 4 mycolyltransferase genleri (*fbpA*, *fbpB*, *fbpC1* ve *fbpC2*) tarafından güdülenir. Bu genlerden *fbpA*, *fbpB* ve *fbpC*'in özellikle hücre duvarında mikolik asitlerin AG'ye transferi ve esterleşmesinde rol oynadığı gösterilmiş,

ancak membrana bağlı bir protein kodlayan *fbpC1*'in reaksiyonlar için sinyal proteinleri kodladığı bildirilmiştir.

Mycolyl transferase genleri : Mikolik asit transportu ve esterleşmesinde *fbpA*, *fbpB*, *fbpC1* ve *fbpC2* genleri tarafından sentezlenen çok sayıda enzim rol oynar. Ancak bu enzimlerde 85A, 85B ve 85C predominanttır. Birbirlerine benzeyen bu enzimlerin amino asit dizileri % 68-80 oranında homologdur. 85B proteini 30kDa, 85A ve 85C proteinleri ise 32 kDa ağırlığındadır. Ag 85 kompleksi içerisinde yer alan 85A, 85B ve 85C'nin üretim oranı 2-3-1 şeklindedir. Mikobakterilerin sekrete ettikleri proteinlerin yaklaşık olarak ¼'ünü oluştururlar. Bu enzimlerin neden TMM, TDM ve hücre duvarı AG'ını ortak substrat olarak kullanabildiği net olarak açıklanamamıştır. Ancak daha öncede belirtildiği gibi özellikle *fbpC* gen bölgesi delesyonel mutasyona uğratılmış mikobakterilerde TMM ve TDM miktarında bir değişiklik olmamasına rağmen mikolik asit sentezini önemli ölçüde azalarak permeabilitenin artması 85C'nin hücre duvarı sentezinde daha önemli olduğunu ima etmektedir. Buna karşılık son derece güçlü antijen olan 285 merlik 85B'nin konağın immun cevabı üzerine inhibitör etkisi olduğu ve infekte makrofajlarda bol miktarda sekrete edildiği gösterilmiştir. 85B'nin üretiminin, mRNA daki translasyon bölgesinin 28 merlik bir antisensele kapatılması halinde durduğu, böyle mutant mikobakterilerinde fare makrofajlarında üremelerini tamamen durdurduğu gösterilmiş, böylece bu proteinin de mikobakteri çoğalması için en az 85C kadar önemli olduğu ispatlanmıştır.

Mikobakterilerin hücre duvarında orta katmanda yer alıp zaman zaman kapsüler yapının üzerinde de görülen çok sayıda farklı nonkovalent bağlı lipoglikanlar mevcuttur, bunlardan önemli olanları şunlardır:

Acyl trehaloselar : Trehaloz içeren glikolipidler mikobakteri lipidleri içerisinde en çok ilgi çeken moleküllerden birisi olmuştur. Mikobakterilerin hücre duvarının orta tabakası ile kapsül tabakası içerisinde yer alan bu glikolipidlerin 2 türü bulunmaktadır. Bunlar ; TMM ve TDM'nin yer aldığı mikolik asit esterleri ve polyacyl trehalozlar'dır.

a) TMM ve TDM : α,α' trehalose dimycolates (TDM) (6,6'-dimycolyl- α,α' -d-trehalose) ve α,α' trehalose monomycolates (TMM) hücre duvarına nonkovalent olarak bağlanmış glikolipidlerin en önemlileridir. Mikobakterilerin çoğunda her ikisine birlikte rastlanırken M.lepra'da sadece TMM bulunur. TMM ve TDM hücre duvarının en dış tabakalarında lokalize olabildiği gibi türe bağlı olarak daha alt tabakalarda da yerleşebilir. Kord faktör olarak da tanımlanan TDM, 85 kompleksi proteinlerin yardımı ile TMM den bir mikolik asidin diğer TMM'ye transferi ile üretilir. İşlem sonunda bir trehaloz molekülü serbest kalır. Besiyerlerinde görülen serpentin kord fenomeninden sorumlu olan TDM güçlü bir toksindir. TDM granülamotöz inflamasyon ve timik atrofiye neden olmaktadır. Lökosit göçünü durdurmaktadır. Farelerde mitokondiri için toksik olduğu gösterilmiştir. Diğer taraftan immun sistem için güçlü bir uyarıcı olup muhtemelen bu özelliği ile antitümöral etkinlik yaratmaktadır.

b-Polyacyltrehalozlar : Bu grup içerisinde; sulfatlanmış trehalozlar veya sulfolipidler

(SL) olarak tanımlanan yüksek dallanma gösteren yağ asitleri esterleri, di-tri acy trehalos'lar (DAT, TAT) ve M.phlei suşlarında polyunsature yağ asitleri ile acylenmiş trehaloslar yer almaktadır. Sulfatlanmış trehalozlar olarak tanımlanan SLI, SL II ve SL III M.tuberculosis'de katyonik nötral kırmızının absorpsiyonunu engelleyen mekanizmanın araştırılması esnasında bulunmuşlardır. Oldukça büyük (64 karbonlu) olan ve karboksil uçlarında aşırı dallanma gösteren bu sülfat esterlerine doğal ortamlarda sık rastlanmaz. Bunlar makrofaj içerisinde fagolizozomal füzyon'un oluşumunu engellerler. M.tuberculosis suşlarında görülen phthioceranic ve hydroxy phthioceranic asitler bu gruba girmektedir. Palmitate ve stearate gibi sature yağ asitleri ile açillenmiş sulfolipidlerde Mikobakterilerde önemli yapı elemanlarıdır.

2,3-Di-O-acyl-trehalose (DAT) *M. tuberculosis*'in en dış kompartımanlarında lokalize olan tür spesifik bir glikolipiddir. Yapısı iki yağ acyl zinciri içeren bir amphipathic molekül ve 2 α -glukozdan oluşmaktadır. DAT humoral immun cevabı provoke eder ve pulmoner tuberkülozlu hastaların % 80'inde bu maddeye karşı antikor cevabı görülür. Ancak ortaya çıkan cevap son derece spesifik (%97) olup serolojik tanıda marker olarak kullanılabilir. DAT T lenfositlerde proliferasyonu inhibe ederek proinflamatuvar sitokinlerin salınımını engellemektedir.

Oligosakkarid içeren lipidler: Bu grupta lipooligosakkaritler(LOS) ve mikozidler yer almaktadır. LOS'da oligosakkaritler uzun zincirli yağ asitleri tarafından açillenmişlerdir. Hücre yüzeyinde yer alan bu lipidler

immunojeniktir ve mikobakteri fajları için hedef reseptörlerdir. Bunlar kapsülünü kaybetmiş bakterilerde hücre duvarının en dışında yer alırlar. Mikozidler alışılmışın dışında lipidlere bağlı oligosakkaritlerdir. Mikobakteriler için spesifik olan bu glikolipterin 2 türü bulunmaktadır. Bunlar fenol glikolipidler(PGL) veya mikozid A,B,G ve glikopeptidolipitler (GPL) veya mikozid C dir.PGL terminal bölgede yer alan fenol nedeni ile alışılmışın dışında bir yapı sergilerve kısmen kapsül tabakaya çıkarlar. Oligosakkarit yapının verdiği güçlü antijenik özelliğe sahiptirler. Bu gruptan M.tuberculosis'de phthiocerol dimycocerosat-balmumu bulunur. Phthiocerol dimycocerosate lenfosit cevabını baskılar. Sülfolipitlerin bulunmadığı M.lepra'da phthiocerol dimycocerosate'ın açilenmiş trisakkariti; β -D-3,6,di-O-methyl Glu(1-4)- α -2,3-di-O-methyl-L-Rha-(1-2)- α -3-O-methyl-L-Rha yer alır. Bu güçlü bir immunojendir ve M.lepra infeksiyonlarının serolojik tanısında antijen olarak kullanılırlar. Bu trisakkarit M.lepra ile Schwann hücreler arasındaki ilişkide etkili olup, basilin hücre içine girişine yardım eder. GPL'ise daha çok M.avium kompleksi içerisinde yer alan mikobakterilerde görülür. Bunlarda güçlü immunojen olup bir protein taşıyıcı ile birlikte iken lenfosit proliferasyonunu provoke ederler.

Phosphatidylinositol'ün glycosyl derivatları: Mycothiol, phosphatidylinositol(PI) phosphatidylinositol-mannosid (PIM) ve glikozillenmiş phosphatidylinositol türevleri mikobakterilerle konak arasındaki immunolojik ilişkilerin

düzenlenmesinde ve bakterinin konak makrofajları içerisinde yaşamasında önemli rol oynarlar. Bu anyonik polisakkaritler memeli hücreleri dışında sadece *M.tuberculosis* kompleksi içerisinde yer alan mikobakterilerle inositol ve mannos içeren diğer mikobakterilerde görülürler ve hücre duvarına non kovalent olarak bağlanırlar. PIM biyosentezi *pgsA* geni tarafından kontrol edilen *mannosyltransferase* ve *acyltransferase* enzimlerinin kontrolünde genlerinin kontrolünde prokürsör PI'den başlar. PI'nin mannosillenmesi ve daha sonrada mannozun açillenmesi ile PIM₁ oluşur. *M.tuberculosis* suşlarında *pgsA* geni dışında mannosillenmeyi sağlayan ikinci bir *mannosyltransferase* geni *pimB* bulunur. Bu gen ile PIM₁ e bir mannos daha ilave edilerek PIM₂ yaratılır. PI'nin birden fazla mannosillenme ve açillenme bölgesi bulunmaktadır(PIM₁₋₆). Ancak bunların kesin sayısı bilinmemektedir.

LM ve LAM Gram pozitif bakterilerdeki teikoik asitlerle benzer ultrastrüktürel ve fizyolojik fonksiyonlara sahip oldukları için atipik lipoteikoik asitler olarak da kabul edilebilirler. Ancak Gram negatif bakterilerdeki LPS ile de bazı yapısal benzerlikleri vardır. Bu iki lipoglikanın biyosentezi hakkında farklı hipotezler bulunmaktadır. Bir hipoteze göre PI'nin fosfolipazların etkisi ile parçalanması ve yeniden yapılandırılması sonucu bu iki lipogalakattan üretilmiştir. Diğer hipotezde ise PIM'e bir polyprenyl taşıyıcı yardımı ile mannos ve/veya arabinoz ilavesi ile bu lipoglikanların oluştuğu ileri sürülür. Muhtemelen LM ve LAM'ın temel moleküler

yapıları aynıdır, ancak mannan kor bölgesindeki acylasyon ve fosforilasyon'a arabinoz ilavesi ve ortalama büyüklükler gibi mikroheterojenik değişiklikler LM ve LAM'ın fonksiyonel farklılıklarını yaratmaktadır. LAM ve LM redükte edilmiş uç bölgelerinde P1 kor bölgeye sahiptir. PI mannan kor hücre duvarına-peptidoglikana- gömülüdür, buna karşılık LM ve LAM arabinan hücre yüzeyindedir ve immunopatogenezeyle direkt ilişkilidir. Özellikle mAGP de hücre iskeletini oluşturan bağlayıcı madde olan arabinan LAM'da tamamen immunolojik fonksiyonlar üstlenmiş en önemli yapı elemanı hüviyetindedir. LAM plazma membranına bağlanmıştır ve oradan köken alır. Bağlanma yerinde diacylglycerol rezidü yer alır. *M.tuberculosis*'de bu palmitik ve tuberculostearic acitleri içerir. Arabinanın dallanma gösteren halkaların indirgeyici olmayan uçları *hexaarbinofuranosyl* [(βD-Ara_f -(1-2)-α-D- Ara_f -]_{2-3,5}-α-D- Ara_f -(1-5))-α-D- Ara_f motifler taşır. LAM yapılanmasında bazı moleküllerde bu zincirin terminal β- Ara₄ ve Ara₆ rezidüleri mannoz ile kapılıdır. Bu motifler patojen mikobakterilerdeki LAM da görülür ve bunlara ManLAM adı verilir. Diğer LAM moleküllerinin bir kısmında bu rezidülerde arabinan (AraLAM) bazılarında da phosphomyoinositol(PILAM) yer alır. Mannos *M.tuberculosis* ile konak immun sistemi arasındaki en önemli immun mediatördür. ManLAM'da mannozun en dışta yer alması bu lipoglikanın biyolojik fonksiyonlarını diğerlerinden daha önemli kılmaktadır. ManLAM immun sistemi suprese eder ve makrofaj kökenli sitokinlerin salınımını inhibe ederek patogeneze katkıda bulunur. Diğer

tarafdan ManLAM T hücre aktivasyonunu inhibe eder, mikrobisidal ve tümörisidal aktivite gibi IFN- γ 'nın indüklediği fonksiyonları durdurur, oksijen radikalleri üretilmez, protein kinaz C aktivitesi inhibe olur, TNF alfa,CSF, IL-1a, IL-1b, IL-6 ve IL-10 sekresyonları durur. ManLAM'ın mannos uç rezidüleri makrofajlarda yüzeyde yer alan mannoz reseptörlerini kullanarak makrofajın içersine girer. Bu giriş savunmasız makrofaj içersinde intrasellüler yaşayan mikobakteriler için önemli bir giriş yoludur. Ayrıca M.tuberculosis ManLAM yapısında her molekülde bir tane olmak üzere 5-methylthiopentose bulunur. Bu rezidü infekte makrofajlarda transdüksiyon sinyalini interfere ederek makrofaj içersindeki yaşamı kolaylaştırır. AraLAM ve PILAM ise proinflamatuvar mediatörlerdir.

Kapsül:

Konak hücre içersinde mikobakterilerin etrafı elektron transparent bir kapsül ile çevrilir. Bu madde plazma membranı ve bakteri duvarının dışında yer alır. Bu madde invitro şartlarda üretilen basillerin etrafında klasik mikroskopik inceleme ile gösterilemez. Yeni mikroskopik tekniklerin kullanılması ile bu kalın tabaka aksenik mikobakteri kültürlerinde üreyen mikroorganizmalarda gösterilmiştir.

Kapsül ekstraksiyon çalışmaları kapsülün en dış tabakalarının çok miktarda polisakkarid ve proteinlerden eser miktarda da lipidden oluştuğunu göstermiştir. Bakterinin patojenitesinde kapsüle ait elemanların rolü büyüktür, bu bağlamda bazı kapsüller

glikanların bakterinin konak hücreye adezyon ve penetrasyonunda rol oynadığı sekrete edilen veya yüzeyde eksprese edilen bazı enzimler ve transporterlerin intrasellüler çoğalmada etkin oldukları M.tuberculosis kültür filtratları ile yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Kapsül içersinde indüklenebilir proteazlar ve lipazların varlığı da gösterilmiştir. Kapsül aynı zamanda pasif bir bariyer olup bazı makromoleküllerin iç tabalara ulaşmasını engeller. Dahada ötesi sekrete edilen enzimlerin ve kapsülde lokalize olan enzimlerin oksijen radikallerini detoksifiye ettiği de gösterilmiştir. Bunlardan katalaz/oksidaz ve süperoksid dismutaz mikroorganizmanın korunmasında son derece etkilidir. Sonuç olarak kapsülde bulunan toksik lipidler ve temasla aktive olan diğer litik maddeler makrofaj aktivasyonunu ve lenfosit proliferasyonunu engeller.

Mikobakterilerin bu olağan üstü hücre duvarı yapıları bu bakterileri diğer bakterilerden ayırt eden, intrasellüler yaşam ve kronik infeksiyon yapma, asit ve alkali ortama direnç, antibiyotiklere direnç, dezenfektan, enzimler, serbest radikaller gibi kimyasal toksik maddeler direnç ve ekmek kırıntısı gibi toplu kümeler halindeki kuru kolonileri oluşturma özelliğini kazandırmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Jérôme N., Martine G ve Germain P. Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis, Biochimie, Volume 85, Issues 1-2, 153-166. 2003
2. Brennan P. J Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis, Tuberculosis, Volume 83, Issues 1-3, Pages 91-97. 2003
3. Ronning D.R Crystal structure of the secreted form of antigen 85C reveals potential targets for mycobacterial drugs and vaccines. *Nat. Struct. Biol.* 7141–148. 2000
4. Puech V. Characterization of the in vivo acceptors of the mycoloyl residues transferred by the corynebacterial PS1 and the related mycobacterial antigens 85. *Mol. Microbiol.* 35 1026–1041. 2000
5. Jackson M .Inactivation of the antigen 85C gene profoundly affects the mycolate content and alters the permeability of the *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. *Mol. Microbiol.* 31. 1573–1587. 1999
6. Daffé M. ve Draper P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* 39 131–203. 1998
7. Belisle J.T. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* 276 .1420–1422. 1997
8. Chatterjee D. The mycobacterial cell wall: Structure, biosynthesis and site of drug action. *Current opinion in Chemical Biology* 1:579-588. 1997
9. Belanger A.E. The *embAB* genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93. 11919–11924. 1996
10. Jarlier V. ve Nikaido H., Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.* 123. 11–18 .1994
11. Wiker H.G. ve Harboe M. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Rev.* 56. 648–661 1992
12. Mayer B. G ,Kuldeep R. D. ve Ian D. J. Concerning hydrolysis of mycolate esters, of phthiocerol dimycocerosates and of related mycobacterial lipids: an anecdotal account, *Journal of Chromatography A*, Volume 440, 25 May, 487-498. 1988