

Received: 2013.10.18
Accepted: 2014.01.27
Published: 2014.04.04

Kwasy mikołowe – rola biologiczna i potencjalne zastosowanie w wykrywaniu oraz różnicowaniu rodzaju *Mycobacterium*

Mycolic acids – biological role and potential application in *Mycobacterium* detection and differentiation

Konrad Kowalski¹, Przemysław Trzepiński², Magdalena Druszczyńska², Janusz Boratyński¹

¹ Laboratorium Chemii Biomedycznej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirsfelda we Wrocławiu

² Zakład Immunologii Komórkowej, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie

Kwasy mikołowe stanowią jeden z podstawowych elementów strukturalnych ściany komórkowej bakterii z podrzędu *Corynebacterineae*. Związki te są długołańcuchowymi α -hydroksy β -alkilo kwasami tłuszczowymi, a w ich obrębie wyróżnia się dwa łańcuchy węglowodorowe: dłuższy łańcuch meromikołowy oraz krótszy łańcuch α -węglowodorowy. Prątki rodzaju *Mycobacterium* cechują się obecnością kwasów mikołowych o długości 60-90 atomów węgla zawierając jednocześnie w pełni nasycony łańcuch α -alkilowy o ściśle zdefiniowanej długości 22, 24 lub 26 atomów węgla. Obecnie prowadzone badania wskazują, że nie tylko obecność kwasów mikołowych w ścianie komórkowej mikobakterii jest istotna dla wirulencji mikobakterii. Udowodniono, że wzajemny stosunek poszczególnych typów kwasów mikołowych, ich długość oraz stopień cyklopropanizacji może ulegać zmianie w zależności od etapu infekcji czy warunków hodowli prątków. Jednocześnie wykazano, że niektóre typy mikolanów są podstawowe w procesie powstawania biofilmu, oporności na leki przeciwpłatkowe czy oddziaływań z układem odpornościowym. Najnowsze badania wskazują na zastosowanie analizy profili kwasów mikołowych jako alternatywy dla klasycznych metod diagnostyki chorób, takich jak gruźlica, trąd czy mikobakteriozy.

Słowa kluczowe:

kwasy mikołowe • *Mycobacterium* • biomarkery

Summary

Mycolic acids are one of the basic structural elements of the cell wall of bacteria from *Corynebacterineae* suborder. These compounds are long-chain α -hydroxy β -alkyl fatty acids with two hydrocarbon chains: longer meromycolic and shorter α -chain meromycolic α -chain. The genus *Mycobacterium* is characterized by the presence of mycolic acids in length from 60 to 90 carbon atoms having a fully saturated α -chain with a defined length of 22, 24 or 26 carbon atoms. Current research indicates that not only the presence of mycolic acids in the cell wall of mycobacteria is essential for the virulence of mycobacteria. It is proved that the relationship between different types of mycolic acids, their length and the degree of cyclopropanation may vary depending on the stage of infection and mycobacterial culture conditions. At the same time it has been shown that some mycolic acid types are crucial for biofilm formation, antimycobacterial drug resistance or interactions with the immune system. Recent studies also indicate that analysis of mycolic acid profiles could be an alternative to conventional methods of diagnosis of diseases such as tuberculosis, leprosy or mycobacteriosis.

Keywords:

mycolic acids • *Mycobacterium* • biomarkers

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1097425>

Word count: 3032

Tables: –

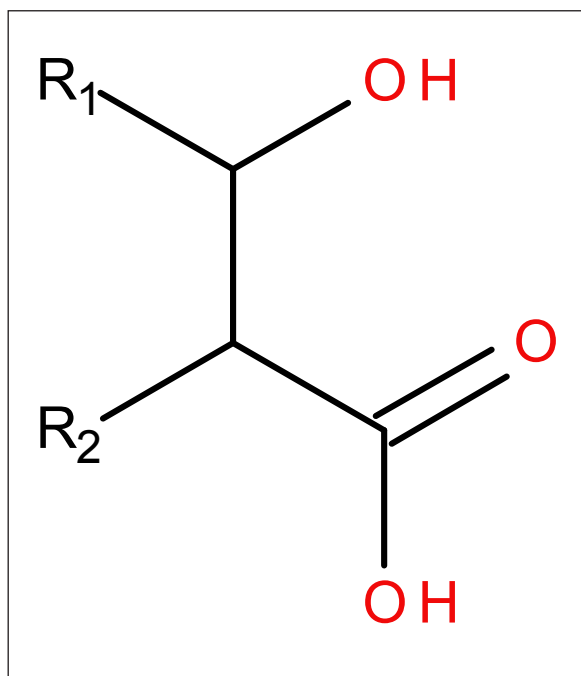
Figures: 2

References: 69

Adres autora: mgr Konrad Kowalski, Laboratorium Chemii Biomedycznej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda, ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: kowalski.biotech@gmail.com

BUDOWA ORAZ STRUKTURA CHEMICZNA

Kwasy mikołowe są długołańcuchowymi α -hydroksy- β -alkilo kwasami tłuszczowymi. Po raz pierwszy zostały wyizolowane z prątków gruźlicy już w 1929 r. przez Andersona, jednak dopiero w 1950 r. Asselineau oraz Lederer opisali ich dokładną budowę chemiczną [3,4]. Pod względem strukturalnym, w ich obrębie wyróżnia się dwa łańcuchy węglowodorowe: dłuższy łańcuch meromikołowy (R_1) oraz krótszy łańcuch α -węglowodorowy (R_2) (ryc. 1). Długość łańcuchów węglowodorowych, stopień ich nasycenia oraz występowanie grup funkcyjnych jest zależne bezpośrednio od rodzaju drobnoustrojów, w których ścianie komórkowej występują kwasy mikołowe. Łańcuch meromikołowy (R_1) cechuje dużo większe zróżnicowanie zarówno pod względem długości łańcucha jak i obecności grup funkcyjnych. W pozycji proksymalnej łańcucha meromikołowego występuje zazwyczaj pierścień cyklopropanowy, podczas gdy w pozycji dystalnej możemy zaobserwować zarówno występowanie kolejnego pierścienia cyklopropanowego, jak i hydrofilowych grup funkcyjnych: metoksylowej oraz ketonowej [25].



Ryc. 1. Ogólny wzór strukturalny kwasu mikołowego

W oparciu o różnicowanie podstawników w pozycji dystalnej łańcucha meromikołowego wyróżniamy trzy klasy kwasów mikołowych, odpowiednio: α -, metoksy- oraz ketomikołany (ryc. 2). Oprócz różnic w budowie chemicznej między poszczególnymi typami związków występują znaczące różnice w konformacji i strukturze przestrzennej. Dowiedziono, że keto- oraz metoksymikołany mogą występować w dwóch konformacjach – *cis* lub *trans* (ryc. 2). Jednocześnie struktura kwasu mikołowego naturalnie wymusza silne oddziaływania między łańcuchem α -alkilowym a meromikołowym prowadząc bezpośrednio do fałdowania dłuższego łańcucha meromikołowego i powstania struktury „spinki”. Udowodniono, że powstawanie złożonych układów konformacyjnych kwasów mikołowych jest o wiele częstsze w przypadku keto- oraz metoksymikołanów [7,27]. To właśnie struktura przestrzenna jaką przybierają te związki w układach emulsyjnych będąca konsekwencją wzajemnego stosunku różnych typów kwasów mikołowych względem siebie, wydaje się obecnie najistotniejsza dla zrozumienia wpływu poszczególnych typów kwasów mikołowych na przepuszczalność ściany komórkowej, oddziaływania z układem odpornościowym czy przeżywalność drobnoustrojów *in vivo*.

KWASY MIKOŁOWE RODZAJU *MYCOBACTERIUM*

Kwasy mikołowe stanowią jeden z podstawowych elementów strukturalnych ścian komórkowych bakterii z podrzędu *Corynebacterineae*, do których poza prątkami *Mycobacterium* należą m.in. drobnoustroje, takie jak *Corynebacterium*, *Nocardia* czy *Rhodococcus* [32]. Pod względem organizacji zręb struktury ściany komórkowej prątków to warstwa peptydoglikanu połączonych wiązaniami fosfodiesterowymi z położonym wyżej arabinogalaktanem. Pentaarabinozowe podjednostki arabinogalaktanu wiążą jednocześnie kwasy mikołowe ekspozując ich łańcuchy węglowodorowe na zewnątrz komórki. Tak ściśle ułożenie łańcuchów estryfikowanych kwasów mikołowych nadaje ścianie komórkowej dużą hydrofobowość, której stopień zależy od długości łańcuchów meromikołowych, ich stopnia nasycenia i występowania hydrofilowych grup funkcyjnych [10,51]. Na powierzchni hydrofobowej warstwy kwasów mikołowych tworzy się ponadto niekowalencyjnie z nią związana warstwa tzw. „wolnych lipidów”. Cechuje ją wysokim stopniem heterogenności

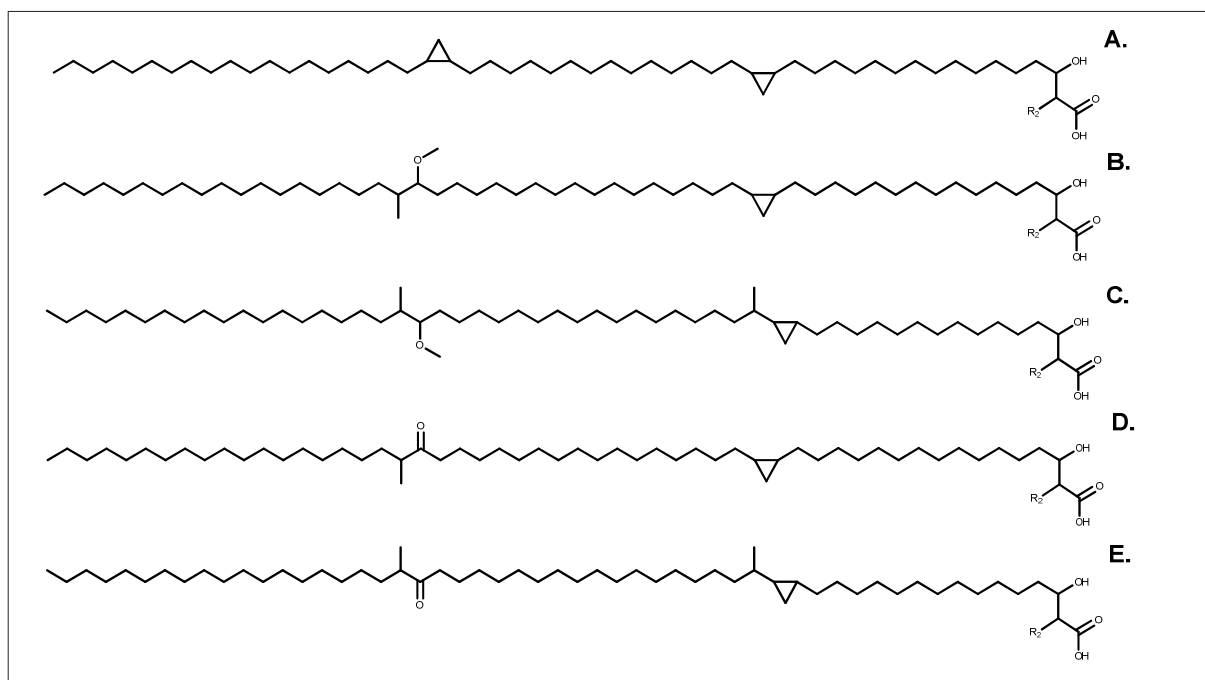
zarówno pod względem składu jakościowego, jak i ilościowego w zależności od gatunku drobnoustroju oraz warunków hodowli. Wśród związków najpowszechniej występujących w warstwie wolnych lipidów wymienia się: glikolipidy, sulfolipidy, glikopeptydylipidy, lipooligosacharydy, glikolipidy fenolowe, lipoarabinomannan, glikofosfolipidy, związki zawierające w swojej budowie kwasy mikolowe: dimikolany trehalozy, woski kwasów mikolowych [35,58]. O ogromnej różnorodności składu ściany komórkowej świadczy obecność u *Mycobacterium* ponad 250 genów biorących udział w syntezie związków o charakterze lipidowym w porównaniu do około 50 genów u *Escherichia coli* [16].

Podrząd *Corynebacterineae* charakteryzuje się wielką różnorodnością pod względem profili kwasów mikolowych zawartych w ścianach komórkowych, a ich wielkość oraz struktura jest jednym z wykładników ich pokrewieństwa rodzajowego. Tylko pod względem wielkości cząsteczek mikolanów w całym podrzędzie wykrywa się związki o wielkości 22-110 atomów węgla [33]. Kwasy mikolowe charakterystyczne dla rodzaju *Mycobacterium* składają się z 60-90 atomów węgla zawierając jednocześnie w pełni nasycony łańcuch α -alkilowy o ściśle zdefiniowanej długości 22, 24 lub 26 atomów węgla [35]. Dokładne analizy strukturalne dowiodły, że prątki *Mycobacterium tuberculosis* oraz *Mycobacterium bovis* cechują się zdecydowaną dominacją kwasów mikolowych o długości łańcucha α -alkilowego równego 26 atomom węgla bez względu na ich typ [54,57]. W przeciwieństwie do prątków gruźlicy, prątki atypowe charakteryzują się przewagą mikolanów o krótszych łańcuchach alfa [54]. Obserwacje te wskazują na potencjalną możliwość odróżnienia prątków

wywołujących gruźlicę od tych będących czynnikiem etiologicznym mikobakterioz lub trądu tylko na podstawie zawartości kwasów mikolowych o specyficznej długości łańcucha α -alkilowego. Zróżnicowanie ściany komórkowej prątków pod względem udziału poszczególnych typów mikolanów jest zagadnieniem bardziej złożonym. Ocenia się, że w profilu kwasów mikolowych charakterystycznym dla *M. tuberculosis* zdecydowanie dominują α -mikolany, których zawartość szacuje się na ponad 70%, podczas gdy typy keto- oraz metoksy- stanowią odpowiednio po 10-15% wszystkich kwasów mikolowych [25]. Jednocześnie przyjmuje się, że prątki atypowe cechują się zdecydowanie większą zawartością form keto- oraz metoksy- [23]. Warto zauważyć, że liczne dane uzyskiwane w oparciu o wykorzystanie nowoczesnych technik badawczych, począwszy od chromatografii cienkowarstwowej po spektrometrię mas, wskazują na zróżnicowanie zawartości poszczególnych typów kwasów mikolowych w ścianie komórkowej tych samych prątków w zależności od warunków wzrostu, metabolizmu komórki czy etapu infekcji.

WZROST W UKŁADACH *IN VITRO* I *IN VIVO* A PROFIL KWASÓW MIKOLOWYCH

W 2002 r. po raz pierwszy uzyskano mutanty *M. tuberculosis* H37Rv pozbawione genu *mmaA4* kodującego metylotransferazę biorącą udział w syntezie metoksy- i ketomikolanów. Szczep ten charakteryzował się osłabieniem płynności ściany komórkowej, co obniżało jej przepuszczalność dla związków zarówno o charakterze hydrofobowym, jak i hydrofilowym, ale jednocześnie zachował zdolność do infekcji oraz namnażania



Ryc. 2. Klasy kwasów mikolowych rodzaju *Mycobacterium* [25]. **A.** Kwas α -mikolowy. **B.** Kwas metoksymikolowy w konformacji *cis*. **C.** Kwas metoksymikolowy w konformacji *trans*. **D.** Kwas ketomikolowy w konformacji *cis*. **E.** Kwas ketomikolowy w konformacji *trans*

w układach *in vitro* [21]. W przeciwieństwie do niego mutanty *M. tuberculosis* z nadekspresją genu kodującego enzym MMAS-1 cechujące się dominacją kwasów metoksymikolowych i marginalnym udziałem form keto- oraz alfa- charakteryzowały się zwiększoną przepuszczalnością ściany komórkowej dla związków o charakterze hydrofilowym, w tym dla takich leków jak ampicylina czy rifamycyna [68]. Nie miały one jednak zdolności do infekcji oraz namnażania w układach *in vitro*, co zasugerowało negatywny wpływ dużej zawartości metoksymikolanów na aktywność biologiczną prątków. W układach *in vivo* udowodniono jednocześnie, że zmniejszony poziom ketomikolanów w ścianie komórkowej koreluje z obniżeniem stopnia wirulencji mikobakterii [21]. Jednocześnie u *M. tuberculosis* wyizolowanych od ludzi z aktywną postacią gruźlicy płuc wykryto nadekspresję genu *mmaA4*, co wspiera tezę o głównej roli podwyższonego wytwarzania ketomikolanów w rozwoju zakażeń mikobakteryjnych [46]. Poza aktywnością genu *mmaA4* istotny wpływ na atenuację prątków gruźlicy mają mutacje w obrębie genów kodujących enzymy odpowiadające za prawidłową syntezę pierścieni cyklopropanowych łańcucha meromikolowego – *pcaA* oraz *cmaA2*. Unieczynnienie tych genów w połączeniu z brakiem aktywności genu *mmaA4* powoduje znaczny spadek wirulencji mikobakterii z powodu występowania w strukturze ściany komórkowej jedynie pozbawionych pierścieni cyklopropanowych α -mikolanów. Jednocześnie pozbawienie prątków jedynie genów *pcaA* oraz *cmaA2* skutkujące obecnością wszystkich typów kwasów mikołowych, lecz pozbawionych pierścieni cyklopropanowych, prowadzi do jedynie nieznacznego osłabienia wirulencji prątków. Dodatkowo wykazano, że mikobakterie z nokautem genów *pcaA* oraz *cmaA2* indukują intensywną odpowiedź immunologiczną ujawniającą się nasilonym wytwarzaniem TNF- α , IFN- γ oraz IL-12p35 [5]. Dowiedziono, że aktywność genu *mmaA4* wydaje się niezbędna zarówno do zahamowania wytwarzania IL-12p40, głównej cytokiny w odpowiedzi odpornościowej względem wewnątrzkomórkowych patogenów, jak i dla wzrostu prątków w postaci biofilmu [17,50].

Tworzenie biofilmu bakteryjnego u prątków z rodzaju *Mycobacterium* zależne jest bezpośrednio od ekspresji białka opiekuńczego oraz oddziaływania z enzymem KasA, który jest jednym z elementów wieloenzymowego kompleksu syntazy kwasów tłuszczowych typu II (FASII) odpowiadającego za syntezę kwasów mikołowych. Początkowo oceniano, że podstawą do tworzenia macierzy zewnątrzkomórkowej mikobakterii są lipopolisacharydy oraz glikopaptydolipidy oraz pochodne kwasów mikołowych (estry i diacyloglicerole), których nasiloną syntezą korelowała z intensywnym tworzeniem biofilmu przez te drobnoustroje [13,15,38,47,48]. Dopiero dokładna analiza składu biofilmu w układzie *in vitro* dowiodła obecności wolnych kwasów mikołowych jako jednego z głównych składników macierzy zewnątrzkomórkowej [39]. Obecność

wolnych kwasów mikołowych jako składnika biofilmu nie jest jednak skutkiem lizy prątków, ale ich aktywnego transportu na zewnątrz komórki. W transporcie tym biorą udział konserwatywne transmembranowe transportery lipidowe MmpL3 oraz MmpL11 przenoszące poza obręb ściany komórkowej pochodne kwasów mikołowych w postaci odpowiednio mikolanów trehalozy oraz estrów kwasów mikołowych i diacylogliceroli [43]. Bezpośrednim prekursorem wolnych kwasów mikołowych w biofilmie mikobakteryjnym jest dimikolan trehalozy (TDM) zwany też czynnikiem wiązkowym, który ulega zewnątrzkomórkowej hydrolizie przez swoistą esterazę serynową – Msmeg_1529 [41]. Uwolnione w wyniku hydrolizy kwasy mikołowe należące głównie do keto- i metoksymikolanów są niezbędne do właściwego uformowania się biofilmu mikobakterii w układach *in vivo* [50]. Dowiedziono również, że obecność wolnych kwasów mikołowych w postaci keto- lub metoksy- jako składników macierzy zewnątrzkomórkowej może odpowiadać w dużym stopniu za oporność biofilmów mikobakterii na działanie leków przeciwprątkowych [1,41,50]. Obecnie podkreśla się dużą heterogenność komórek populacji mikobakterii wzrastających w postaci planktonicznej lub biofilnie, jak i tych znajdujących w czasie infekcji w ziarniniakach płucnych [49,69]. Już wcześnie badania przebiegu gruźlicy u świnek morskich wykazały powstawanie ziarniny w płucach wywołanej wziewną immunizacją dimikolanem trehalozy [26]. Późniejsze badania wykorzystujące do donosowego zakażenia zwierząt preparaty alfa-, keto- oraz metoksymikolanów dowiodły powstawania ziarniniaków tylko w przypadku zastosowania postaci kwasów [56]. Niebagatelną rolę ketomikolanów na powierzchni prątków udowodniono również w przypadku rozwoju makrofagów piankowatych, jednego z etapów tworzenia ziarniniaków [45]. Wykazano jednocześnie, że poddanie makrofagów ekspozycji na działanie kwasów mikołowych może skutkować ich przekształceniem się w makrofagi piankowate o upośledzonych zdolnościach do późniejszej reakcji na niektóre antygeny wziewne, takie jak np. owoalbumina, co indukuje miejscową tolerancję immunologiczną [30,31].

Rola biologiczna poszczególnych typów kwasów mikołowych w rozwoju i wirulencji prątków jest bardzo złożona i wciąż brak jest dokładnych danych do jej pełnej charakterystyki. Jednak dotychczas przeprowadzane badania dowodzą, że wszystkie klasy mikolanów są niezbędne do pełnej wirulencji mikobakterii, lecz prawdopodobnie uczestniczą na różnych etapach rozwijającego się zakażenia. Wydaje się, że do wzrostu planktonicznego prątków gruźlicy ważna jest dominacja α -mikolanów, będąca kluczowa jednocześnie w późniejszej zdolności do wnikania do wnętrza makrofagów pęcherzykowych [68]. W kolejnych etapach infekcji, w tym tworzeniu makrofagów piankowatych oraz powstawaniu ziarniniaków gruźliczych większe znaczenie odgrywają postaci keto- i metoksy- [22,45].

WPLYW WARUNKÓW HODOWLI NA PROFIL KWASÓW MIKOLOWYCH

Mikobakterie cechują się zdolnością do modulowania składu poszczególnych typów mikolanów w zależności od warunków środowiska czy etapu infekcji. Wydaje się więc istotne, że warunki hodowli bakterii mogą być istotnym czynnikiem wpływającym na wielkość oraz strukturę chemiczną kwasów mikolowych. Organizmami modelowymi do oceny wpływu zastosowanego źródła węgla na profil mikolanów są najczęściej bakterie z rodzaju *Rhodococcus* znajdujące obecnie szerokie zastosowanie w procesach biodegradacji. Mikroorganizmy te cechują się obecnością kwasów mikolowych o całkowitej liczbie atomów węgla w cząsteczce w zakresie 32-66 oraz dużym stopniu nasycenia łańcuchów zarówno meromikolowego jak i α -alkilowego [32]. Dowiedziono, że zmiana źródła węgla z glukozy na fruktozę, maltozę bądź maltodekstrynę może skutkować znaczącymi zmianami jakościowymi oraz ilościowymi w profilu wytwarzanych kwasów [61]. Znacznie większy wpływ na syntezę kwasów mikolowych wydaje się mieć zastosowanie alternatywnych dla cukrów źródeł węgla. Zastosowanie monooleinianu polioksyetyleno-sorbitolu (Tween 80) jako jedynego źródła węgla spowodowało wyraźne przesunięcie profilu ściany komórkowej *Rhodococcus* w kierunku syntezy kwasów mikolowych o dłuższych i bardziej nienasyconych łańcuchach węglowodorowych [55]. Podobne zmiany zauważono w przypadku szczepów *Rhodococcus erythropolis* zdolnych do rozkładu fenolu, a wzrastających w obecności kwasów humusowych [29]. Udowodniono, że szczep zdolny do wzrostu w obecności fenolu wykazywał znacznie większy udział długołańcuchowych i nienasyconych kwasów mikolowych w porównaniu do szczepu zmodyfikowanego genetycznie o podwyższonej aktywności hydroksylazy fenolowej. Tego typu modyfikacja budowy ściany komórkowej powodowała wzrost hydrofobowości powierzchni komórki bakteryjnej prawie o 10% oraz wzrost jej przepuszczalności dla związków o charakterze hydrofobowym. Zmiana ta może być spowodowana przez silne zaburzenia płynności ściany komórkowej będące skutkiem jej oddziaływań z silnie hydrofobowymi związkami, takimi jak Tween 80 czy kwasy humusowe. Naturalną reakcją bakterii znajdujących się w ich środowisku jest więc modyfikacja profilu kwasów mikolowych pozwalająca na adaptację do bardziej hydrofobowego otoczenia. Podobne zmiany w profilu kwasów mikolowych będących odpowiedzią na hydrofobowe środowisko wzrostu odnotowano w rodzaju *Mycobacterium* [66,67]. Prątki hodowane na pożywkach zawierających antracen jako jedyne źródło węgla cechowały się nawet 70-krotnie większą hydrofobowością powierzchni komórki w porównaniu do tych samych szczepów hodowanych na podłożu z glukozą [8,67]. Jednocześnie w hodowlach zawierających zarówno glukozę jak i antracen dowiedziono spadku stopnia hydrofobowości ściany komórkowej w miarę wzrostu zawartości glukozy w stosunku do antracenu [66]. Można więc przypuszczać, że zmiana hydrofobowości powierzchni ściany komórkowej *Mycobacterium* nie następuje wskutek stymulacji

konkretnym związkiem chemicznym, lecz jako reakcja na ogólną hydrofobowość środowiska wzrostu. Źródło węgla nie jest jednak jedynym czynnikiem wzrostowym wpływającym na profil kwasów mikolowych. W literaturze wymienia się wiele innych związków chemicznych o istotnym wpływie na skład ściany komórkowej, w tym induktory enzymów, modulatory transportu, czy metale ciężkie [29,61].

Wśród czynników fizycznych mających potencjalny wpływ na syntezę oraz profil kwasów mikolowych wymienia się głównie temperaturę oraz zawartość dwutlenku węgla. Udowodniono, że obniżenie temperatury wzrostu niektórych szczepów *Rhodococcus* do 10 °C powoduje całkowite zahamowanie syntezy kwasów mikolowych. Systematyczny wzrost temperatury skutkuje jednocześnie wzrostem udziału długołańcuchowych oraz nienasyconych mikolanów [61]. Podobne zmiany obserwuje się u prątków *Mycobacterium* wiążąc je bezpośrednio ze spadkiem płynności ściany komórkowej w obniżonej temperaturze otoczenia [20]. Ponadto u mikobakterii, temperatura determinuje nie tylko długość łańcuchów kwasów mikolowych, ale również ich strukturę. Udowodniono, że spadek temperatury inkubacji może wywoływać intensyfikację cyklopropo-anizacji łańcuchów meromikolowych [2,6]. Niedawno przeprowadzone badania dowiodły również niebagatelnego wpływu dwutlenku węgla na formowanie biofilmu mikobakteryjnego, którego jednym z głównych składników są kwasy mikolowe [40,41]. Zaobserwowano, iż powstawanie biofilmów jest opóźnione przy obniżonych stężeniach cynku i żelaza. Pierwiastki te są kofaktorami enzymów, takich jak dehydrogenazy pirogronianowa czy izocytrynianowa, które katalizując reakcję dekarboksylacji prowadzą pośrednio do wewnątrzkomórkowego wytwarzania dwutlenku węgla. Jakkolwiek badacze zaobserwowali, iż formowanie biofilmu zachodzi w znacznie większym stopniu w szczelnie zamkniętych naczyniach w porównaniu do hodowli z dodatkiem 5% CO₂. Sugeruje to, że na tworzenie biofilmów może mieć wpływ wiele innych czynników środowiskowych dotychczas niezidentyfikowanych [40].

PRZECIWCIAŁA PRZECIWKO KWASOM MIKOLOWYM

Potencjalna zdolność do generowania swoistej odpowiedzi odpornościowej bezpośrednio związana ze stopniem ekspozycji kwasów mikolowych na powierzchnię ściany komórkowej *Mycobacterium* czyni z tej specyficznej grupy związków chemicznych doskonały antygen do wytwarzania przeciwciał. Pierwsze doniesienia dotyczące obecności swoistych przeciwciał (anty-MA) w surowicy chorych na gruźlicę płuc dowiodły immunogenności zarówno czynnika wiążkowego (dimikolanu trehalozy), jak i samych wolnych kwasów mikolowych [44,52]. Późniejsze badania dowiodły jednocześnie dużej kompetencji antygenowej wyizolowanych przeciwciał między kwasami mikolowymi a cholesterolem w teście ELISA [7]. Obserwowana reaktywność krzyżowa jest związana najprawdopodobniej podobieństwem strukturalnym

układów steroidowych do konformacji przestrzennej, jaką przyjmują kwasy mikolowe w roztworach wodnych [7,27]. Występuje bezpośrednia zależność siły wiązania przeciwciał do kwasów mikolowych a ich klasą oraz długością łańcucha meromikolowego. Najwyższy stopień antygenowości wykazują kolejno kwasy metoksy- oraz ketomikolowe. W środowisku wodnym przyjmują one charakterystyczną konformację przestrzenną w kształcie litery „W” - eksponując w jednym kierunku wszystkie grupy funkcyjne o charakterze hydrofilowym. Zależność immunogenności od konformacji potwierdza znikoma aktywność przeciwciał anti-MA względem α -mikolanów, niemających dodatkowych hydrofilowych grup funkcyjnych o ograniczonych możliwościach do tworzenia opisanych w przypadku innych klas związków struktur przestrzennych [9,14]. Podkreślenia wymaga to, że kwasy metoksy- oraz ketomikolowe stanowią jedynie do 30% wszystkich tych związków w ścianie komórkowej *M. tuberculosis*, co teoretycznie znacząco ogranicza zastosowanie diagnostyczne przeciwciał anti-MA [35]. Potencjalnymi technikami pozwalającymi na zwiększenie immunogenności kwasów mikolowych jest ich immobilizacja z użyciem wysokocząsteczkowego nośnika. Wśród dotychczas wykorzystywanych nośników kwasów mikolowych wymieniana się systemy detekcyjne oparte na liposomach oraz jednowarstwach N-(2-merkaptetoetyl) oktadecanamidu [34,36,42,59]. Obie wymienione techniki dowiodły znacząco większej czułości i swoistości oznaczeń względem klasycznego testu ELISA.

KWASY MIKOLOWE JAKO BIOMARKERY W WYKRYWANIU GRUŻLICY ORAZ MIKOBAKTERIOZ

Już w latach 80 dwudziestego wieku, badacze zwrócili uwagę na kwasy mikolowe jako potencjalne markery detekcji i różnicowania mikobakterii. Związki te są integralną częścią ściany komórkowej prątków stanowiąc 20-40% ich suchej masy [10]. Ponadto są związkami o dobrej chemicznej stabilności i mogą być wykrywane zarówno z materiału zawierającego żywe mikroorganizmy, jak i tylko ich osłony komórkowe lub elementy biofilmu [18,50]. Wraz z rozwojem technik chromatografii cieczowej rozwinęto referencyjną metodę klasyfikowania mikobakterii na podstawie profilu estrów bromofenacylowych kwasów mikolowych. Metoda ta oparta na detekcji UV miała charakter jedynie porównawczy znajdując przysługę zastosowanie bardziej w klasyfikacji szczepów wstępnie namnożonych niż właściwej diagnostyce [12]. Weryfikacja przydatności diagnostycznej późniejszych modyfikacji przedstawionej metody uwzględniających również detekcję fluorescencyjną pozwoliła na osiągnięcie wykrywalności na poziomie jedynie 41% bezpośrednio z płwocin o dodatniej bakterioskopii [11]. Zadowalającą czułość uzyskano dopiero w wyniku 10-dniowego namnażania na podłożu 7H9 osiągając odpowiednio 30 i 91% wykrywalności dla grupy ujemnej i dodatniej pod względem bakterioskopii [65]. Dowiedziano jednocześnie, że metoda ta może zostać z powodzeniem zastosowana do oceny lekowności mikobakterii przez jednoczesną inkubację na pod-

łożu zawierającym antybiotyk, a także wolnym od niego. [64]. Obecnie rozwój zaawansowanych technik spektrometrii mas pozwala na znacznie czulszą detekcję kwasów mikolowych w porównaniu do klasycznych detektorów UV czy fluorescencyjnych. Pierwsze badania z użyciem spektrometrii mas wykorzystujące m.in. urządzenia typu MALDI-TOF skupiały się głównie na aspektach poznawczych mając na celu głównie charakterystykę profili kwasów mikolowych zawartych w czynniku wiążkowym bądź w samej ścianie komórkowej u różnych szczepów mikobakterii [22,37,54,62,63]. Dopiero ostatnie lata przyniosły dokładną weryfikację przydatności analizy kwasów mikolowych z użyciem tandemowych spektrometrów mas w diagnostyce gruźlicy [53,57]. Badania wykazały dużą czułość oraz swoistość oznaczeń kwasów mikolowych bezpośrednio z płwociny chorych sięgającą odpowiednio 94 i 93% w wykrywaniu gruźlicy płuc [53]. Jednocześnie prowadzone badania pozwoliły na wykrycie kwasów mikolowych charakterystycznych dla prątków gruźlicy w około 70% przypadków przy bezpośredniej analizie z płwociny oraz w 94% po 10-dniowej inkubacji na podłożu 7H9 [57]. Badania te wskazują jak wielki potencjał stanowią kwasy mikolowe jako biomarkery zarówno w diagnostyce gruźlicy u ludzi, jak i w wykrywaniu wielu mikobakterioz wywołanych przez prątki atypowe.

KWASY MIKOLOWE JAKO MARKERY „ANTYCZNYCH” ZAKAŻEŃ PRĄTKAMI Z RODZAJU *MYCOBACTERIUM*

Kwasy mikolowe z powodu swojej budowy chemicznej cechują się wyjątkową trwałością oraz opornością na działanie czynników środowiskowych. Ze względu właśnie na te cechy, związki te zostały wytypowane jako biomarkery alternatywne dla antycznego DNA w wykrywaniu chorób wywołanych przez mikobakterie w materiałach archeologicznych [60]. O przydatności analizy kwasów mikolowych lub wręcz jej przewagi nad analizami genetycznymi świadczą wyniki badań potwierdzające obecność kwasów mikolowych w próbach kości, zwapniałych oraz zmumifikowanych fragmentów tkanki płucnej artefaktów archeologicznych noszących znamiona kontaktu z gruźlicą [18,19,24]. Badania przeprowadzone na szkieletach z okresu neolitu również wykazały obecność mikolanów o profilu charakterystycznym dla prątków gruźlicy, co bezpośrednio popiera tezę, że gruźlica jest najstarszą chorobą znaną ludzkości [28]. Drobnoustroje z rodzaju *Mycobacterium* towarzyszą od tysięcy lat nie tylko człowiekowi, a ich pozostałości w postaci kwasów mikolowych wykryto również w kościach sprzed 17 tysięcy lat należące do wymarłego gatunku bizona – *Bison antiquus* [33]. Analiza profilu kwasów mikolowych pozwala na wykrycie nie tylko gruźlicy, ale również chorób wywołanych przez pozostałe szczepy prątków, w tym również trądu. Badania przeprowadzone na materiale kostnym z okresu średniowiecza noszącym zmiany charakterystyczne dla trądu dowiodły obecności kwasów mikolowych o profilu charakterystycznym dla *Mycobacterium leprae*.

PODSUMOWANIE

Kwasy mikołowe to wyjątkowo interesująca grupa związków chemicznych stanowiąca integralną część ściany komórkowej drobnoustrojów z rodzaju *Mycobacterium*. Obecnie prowadzone badania wskazują, że nie tylko obecność kwasów mikołowych w ścianie komórkowej mikobakterii jest istotna dla wirulencji mikobakterii. Dowiedziono, że wzajemny stosunek poszczególnych typów kwasów mikołowych, ich długość oraz stopień cyklopropanizacji może ulegać zmianie w zależności od etapu infekcji czy warunków

hodowli prątków. Jednocześnie wykazano, że niektóre mikołany mogą być podstawowe dla powstawania biofilmu, oporności na leki przeciwpłatkowe czy oddziaływań z układem odpornościowym. Najnowsze badania wskazują na zastosowanie analizy profili kwasów mikołowych jako alternatywy dla klasycznych metod diagnostyki chorób, takich jak gruźlica, trąd czy mikobakteriozy. Złożoność funkcji jakie pełnią kwasy mikołowe w komórkach rodzaju *Mycobacterium* czynią z nich niezmiennie od ponad 60 lat niewyczerpane źródło wiedzy na temat metabolizmu oraz wirulencji mikobakterii.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Alahari A., Alibaud L., Trivelli X., Gupta R., Lamichhane G., Reynolds R.C., Bishai W.R., Guerardel Y., Kremer L.: Mycolic acid methyltransferase, *MmaA4*, is necessary for thiacetazone susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.*, 2009; 71: 1263-1277
- [2] Alibaud L., Alahari A., Trivelli X., Ojha A.K., Hatfull G.F., Guerardel Y., Kremer L.: Temperature-dependent regulation of mycolic acid cyclopropanation in saprophytic mycobacteria: role of the *Mycobacterium smegmatis* 1351 gene (*MSMEG_1351*) in *CIS*-cyclopropanation of α -mycolates. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 21698-21707
- [3] Anderson R.J.: Chemical investigation of biologically active lipids of tubercle bacilli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1929; 15: 628-633
- [4] Asselineau J., Lederer E.: Structure of the mycolic acids of *Mycobacteria*. *Nature*, 1950; 166: 782-783
- [5] Barkan D., Hedhli D., Yan H.G., Huygen K., Glickman M.S.: *Mycobacterium tuberculosis* lacking all mycolic acid cyclopropanation is viable but highly attenuated and hyperinflammatory in mice. *Infect. Immun.*, 2012; 80: 1958-1968
- [6] Barkan D., Liu Z., Sacchettini J.C., Glickman M.S.: Mycolic acid cyclopropanation is essential for viability, drug resistance, and cell wall integrity of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem. Biol.*, 2009; 16: 499-509
- [7] Benadie Y., Deysel M., Siko D.G., Roberts V.V., Van Wyngaardt S., Thanyani S.T., Sekanka G., Ten Bokum A.M., Collett L.A., Grooten J., Baird M.S., Verschoor J.A.: Cholesteroid nature of free mycolic acids from *M. tuberculosis*. *Chem. Phys. Lipids*, 2008; 152: 95-103
- [8] Bendinger B., Rijnaarts H.H., Altendorf K., Zehnder A.J.: Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993; 59: 3973-3977
- [9] Beukes M., Lemmer Y., Deysel M., Al Dulayymi J.R., Baird M.S., Koza G., Iglesias M.M., Rowles R.R., Theunissen C., Grooten J., Toschi G., Roberts V.V., Pilcher L., Van Wyngaardt S., Mathebula N., Balogun M., Stoltz A.C., Verschoor J.A.: Structure-function relationships of the antigenicity of mycolic acids in tuberculosis patients. *Chem. Phys. Lipids*, 2010; 163: 800-808
- [10] Brennan P.J., Crick D.C.: The cell-wall core of *Mycobacterium tuberculosis* in the context of drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2007; 7: 475-488
- [11] Butler W.R., Guthertz L.S.: Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of *Mycobacterium* species. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2001; 14: 704-726
- [12] Butler W.R., Kilburn J.O.: High-performance liquid-chromatography patterns of mycolic acids as criteria for identification of *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, and *Mycobacterium smegmatis*. *J. Clin. Microbiol.*, 1990; 28: 2094-2098
- [13] Carter G., Wu M., Drummond D.C., Bermudez L.E.: Characterization of biofilm formation by clinical isolates of *Mycobacterium avium*. *J. Med. Microbiol.*, 2003; 52: 747-752
- [14] Chan C.E., Zhao B.Z., Cazenave-Gassiot A., Pang S.W., Bendt A.K., Wenk M.R., MacAry P.A., Hanson B.J.: Novel phage display-derived mycolic acid-specific antibodies with potential for tuberculosis diagnosis. *J. Lipid Res.*, 2013; 54: 2924-2932
- [15] Chen J.M., German G.J., Alexander D.C., Ren H., Tan T., Liu J.: Roles of *Lsr2* in colony morphology and biofilm formation of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.*, 2006; 188: 633-641
- [16] Cole S.T., Barrell B.G.: Analysis of the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Novartis Found. Symp.*, 1998; 217: 160-172
- [17] Dao D.N., Sweeney K., Hsu T., Gurucha S.S., Nascimento I.P., Roshkevsky D., Besra G.S., Chan J., Porcelli S.A., Jacobs W.R.: Mycolic acid modification by the *mmaA4* gene of *M. tuberculosis* modulates IL-12 production. *PLoS Pathog.*, 2008; 4: e1000081
- [18] Donoghue H.D., Lee O.Y., Minnikin D.E., Besra G.S., Taylor J.H., Spigelman M.: Tuberculosis in Dr Granville's mummy: a molecular re-examination of the earliest known Egyptian mummy to be scientifically examined and given a medical diagnosis. *Proc. Biol. Sci.*, 2010; 277: 51-56
- [19] Donoghue H.D., Spigelman M., Zias J., Gernaey-Child A.M., Minnikin D.E.: *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA in calcified pleura from remains 1400 years old. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1998; 27: 265-269
- [20] Draper P.: The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers. *Front. Biosci.*, 1998; 3: D1253-D1261
- [21] Dubnau E., Chan J., Raynaud C., Mohan V.P., Lanéelle M.A., Yu K., Quémar A., Smith I., Daffé M.: Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Mol. Microbiol.*, 2000; 36: 630-637
- [22] Fujita Y., Naka T., McNeil M.R., Yano I.: Intact molecular characterization of cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) from nine species of mycobacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *Microbiology*, 2005; 151: 3403-3416
- [23] Fujita Y., Okamoto Y., Uenishi Y., Sunagawa M., Uchiyama T., Yano I.: Molecular and supra-molecular structure related differences in toxicity and granulomatogenic activity of mycobacterial cord factor in mice. *Microb. Pathog.*, 2007; 43: 10-21
- [24] Gernaey A.M., Minnikin D.E., Copley M.S., Dixon R.A., Middleton J.C., Roberts C.A.: Mycolic acids and ancient DNA confirm an osteological diagnosis of tuberculosis. *Tuberculosis*, 2001; 81: 259-265
- [25] Glickman M.S., Cahill S.M., Jacobs W.R.Jr.: The *Mycobacterium tuberculosis* *cmaA2* gene encodes a mycolic acid *trans*-cyclopropane synthetase. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 2228-2233

- [26] Hamasaki N., Isowa K., Kamada K., Terano Y., Matsumoto T., Arakawa T., Kobayashi K., Yano I.: *In vivo* administration of mycobacterial cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) can induce lung and liver granulomas and thymic atrophy in rabbits. *Infect. Immun.*, 2000; 68: 3704-3709
- [27] Hasegawa T., Leblanc R.M.: Aggregation properties of mycolic acid molecules in monolayer films: a comparative study of compounds from various acid-fast bacterial species. *Biochim. Biophys. Acta*, 2003; 1617: 89-95
- [28] Hershkovitz I., Donoghue H.D., Minnikin D.E., Besra G.S., Lee O.Y., Gernaey A.M., Galili E., Eshed V., Greenblatt C.L., Lemma E., Bar-Gal G.K., Spigelman M.: Detection and molecular characterization of 9,000-year-old *Mycobacterium tuberculosis* from a neolithic settlement in the Eastern Mediterranean. *PLoS One*, 2008; 3: e3426
- [29] Kolouchová I., Schreiberová O., Masák J., Sigler K., Rezanka T.: Structural analysis of mycolic acids from phenol-degrading strain of *Rhodococcus erythropolis* by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Folia Microbiol.*, 2012; 57: 473-483
- [30] Korf J.E., Pynaert G., Tournoy K., Boonefaes T., Van Oosterhout A., Ginneberge D., Haegeman A., Verschoor J.A., De Baetselier P., Grooten J.: Macrophage reprogramming by mycolic acid promotes a tolerogenic response in experimental asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2006; 174: 152-160
- [31] Korf J., Stoltz A., Verschoor J., De Baetselier P., Grooten J.: The *Mycobacterium tuberculosis* cell wall component mycolic acid elicits pathogen-associated host innate immune responses. *Eur. J. Immunol.*, 2005; 35: 890-900
- [32] Kowalski K., Szewczyk R., Druszczyńska M.: Kwasy mikołowe - potencjalne markery diagnostyki oportunistycznych zakażeń mikroorganizmami z podrzędu *Corynebacterineae*. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2012; 66: 461-468
- [33] Lee O.Y., Wu H.H., Donoghue H.D., Spigelman M., Greenblatt C.L., Bull I.D., Rothschild B.M., Martin L.D., Minnikin D.E., Besra G.S.: *Mycobacterium tuberculosis* complex lipid virulence factors preserved in the 17,000-year-old skeleton of an extinct bison, *Bison antiquus*. *PLoS One*, 2012; 7: e41923
- [34] Lemmer Y., Thanyani S.T., Vrey P.J., Driver C.H., Venter L., van Wyngaardt S., ten Bokum A.M., Ozoemena K.I., Pilcher L.A., Fernig D.G., Stoltz A.C., Swai H.S., Verschoor J.A.: Detection of antimycolic acid antibodies by liposomal biosensors. *Methods Enzymol.*, 2009; 464: 79-104
- [35] Liu J., Barry C.E.3rd, Besra G.S., Nikaido H.: Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 29545-29551
- [36] Mathebula N.S., Pillay J., Toschi G., Verschoor J.A., Ozoemena K.I.: Recognition of anti-mycolic acid antibody at self-assembled mycolic acid antigens on a gold electrode: a potential impedimetric immunosensing platform for active tuberculosis. *Chem. Commun.*, 2009; 23: 3345-3347
- [37] Mederos L., Valdivia J.A., Valero-Guillen P.L.: Analysis of the structure of mycolic acids of *Mycobacterium simiae* reveals a particular composition of α -mycolates in strain 'habana' TMC 5135, considered as immunogenic in tuberculosis and leprosy. *Microbiology*, 2007; 153: 4159-4165
- [38] Mukherjee R., Chatterji D.: Proteomics and mass spectrometric studies reveal planktonic growth of *Mycobacterium smegmatis* in biofilm cultures in the absence of rpoZ. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2008; 861: 196-202
- [39] Ojha A., Anand M., Bhatt A., Kremer L., Jacobs W.R.Jr., Hatfull G.F.: GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria. *Cell*, 2005; 123: 861-873
- [40] Ojha A.K., Baughn A.D., Sambandan D., Hsu T., Trivelli X., Guerardel Y., Alahari A., Kremer L., Jacobs W.R.Jr., Hatfull G.F.: Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Mol. Microbiol.*, 2008; 69: 164-174
- [41] Ojha A.K., Trivelli X., Guerardel Y., Kremer L., Hatfull G.F.: Enzymatic hydrolysis of trehalose dimycolate releases free mycolic acids during mycobacterial growth in biofilms. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 17380-17389
- [42] Ozoemena K.I., Mathebula N.S., Pillay J., Toschi G., Verschoor J.A.: Electron transfer dynamics across self-assembled N-(2-mercaptoethyl) octadecanamide/mycolic acid layers: impedimetric insights into the structural integrity and interaction with anti-mycolic acid antibodies. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010; 12: 345-357
- [43] Pacheco S.A., Hsu F.F., Powers K.M., Purdy G.E.: MmpL11 protein transports mycolic acid-containing lipids to the mycobacterial cell wall and contributes to biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Biol. Chem.*, 2013; 288: 24213-24222
- [44] Pan J., Fujiwara N., Oka S., Maekura R., Ogura T., Yano I.: Anti-cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) IgG antibody in tuberculosis patients recognizes mycolic acid subclasses. *Microbiol. Immunol.*, 1999; 43: 863-869
- [45] Peyron P., Vaubourgeix J., Poquet Y., Levillain F., Botanch C., Bardou F., Daffé M., Emile J.F., Marchou B., Cardona P.J., de Chastellier C., Altare F.: Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PLoS Pathog.*, 2008; 4: e1000204
- [46] Rachman H., Strong M., Ulrichs T., Grode L., Schuchhardt J., Mollenkopf H., Kosmiadi G.A., Eisenberg D., Kaufmann S.H.E.: Unique transcriptome signature of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary tuberculosis. *Infect. Immun.*, 2006; 74: 1233-1242
- [47] Recht J., Kolter R.: Glycopeptidolipid acetylation affects sliding motility and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.*, 2001; 183: 5718-5724
- [48] Ren H., Dover L.G., Islam S.T., Alexander D.C., Chen J.M., Besra G.S., Liu J.: Identification of the lipooligosaccharide biosynthetic gene cluster from *Mycobacterium marinum*. *Mol. Microbiol.*, 2007; 63: 1345-1359
- [49] Ryan G.J., Hoff D.R., Driver E.R., Voskuil M.I., Gonzalez-Juarrero M., Basaraba R.J., Crick D.C., Spencer J.S., Lenaerts A.J.: Multiple *M. tuberculosis* phenotypes in mouse and guinea pig lung tissue revealed by a dual-staining approach. *PLoS One*, 2010; 5: e11108
- [50] Sambandan D., Dao D.N., Weinrick B.C., Vilcheze C., Gurcha S.S., Ojha A., Kremer L., Besra G.S., Hatfull G.F., Jacobs W.R.: Keto-mycolic acid-dependent pellicle formation confers tolerance to drug-sensitive *Mycobacterium tuberculosis*. *MBio.*, 2013; 4: e00222-00213
- [51] Sani M., Houben E.N., Geurtsen J., Pierson J., de Punder K., van Zon M., Wever B., Piersma S.R., Jiménez C.R., Daffé M., Appelmek B.J., Bitter W., van der Wel N., Peters P.J.: Direct visualization by cryo-EM of the mycobacterial capsular layer: a labile structure containing ESX-1-secreted proteins. *PLoS Pathog.*, 2010; 6: e1000794
- [52] Schleicher G.K., Feldman C., Vermaak Y., Verschoor J.A.: Prevalence of anti-mycolic acid antibodies in patients with pulmonary tuberculosis co-infected with HIV. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2002; 40: 882-887
- [53] Shui G., Bendt A.K., Jappara I.A., Lim H.M., Laneelle M., Hervé M., Via L.E., Chua G.H., Bratschi M.W., Rahim S.Z., Michell, A.L., Hwang S.H., Lee J.S., Eum S.Y., Kwak H.K., Daffé M., Dartois V., Michel G., Barry C.E.3rd, Wenk M.R.: Mycolic acids as diagnostic markers for tuberculosis case detection in humans and drug efficacy in mice. *EMBO Mol. Med.*, 2012; 4: 27-37
- [54] Song S.H., Park K.U., Lee J.H., Kim E.C., Kim J.Q., Song J.: Electrospray ionization-tandem mass spectrometry analysis of the mycolic acid profiles for the identification of common clinical isolates of mycobacterial species. *J. Microbiol. Methods*, 2009; 77: 165-177
- [55] Stratton H.M., Brooks P.R., Carr E.L., Seviour R.J.: Effects of culture conditions on the mycolic acid composition of isolates of *Rhodococcus* spp. from activated sludgefoams. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2003; 26: 165-171

- [56] Sugawara I., Udagawa T., Hua S.C., Reza-Gholizadeh M., Otomo K., Saito Y., Yamada H.: Pulmonary granulomas of guinea pigs induced by inhalation exposure of heat-treated BCG Pasteur, purified trehalose dimycolate and methyl ketomycolate. *J. Med. Microbiol.*, 2002; 51: 131-137
- [57] Szewczyk R., Kowalski K., Janiszewska-Drobinska B., Druszczyńska M.: Rapid method for *Mycobacterium tuberculosis* identification using electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of mycolic acids. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2013; 76: 298-305
- [58] Takayama K., Wang C., Besra G.S.: Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2005; 18: 81-101
- [59] Thanyani S.T., Roberts V., Siko D.G., Vrey P., Verschoor J.A.: A novel application of affinity biosensor technology to detect antibodies to mycolic acid in tuberculosis patients. *J. Immunol. Methods*, 2008; 332: 61-72
- [60] Tran T.N., Aboudharam G., Raoult D., Drancourt M.: Beyond ancient microbial DNA: nonnucleotidic biomolecules for paleomicrobiology. *Biotechniques*, 2011; 50: 370-380
- [61] Tucker T.A., Crow S.A.Jr., Pierce G.E.: Effect of growth media on cell envelope composition and nitrile hydratase stability in *Rhodococcus rhodochrous* strain DAP 96253. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2012; 39: 1577-1585
- [62] Uenishi Y., Fujita Y., Kusunose N., Yano I., Sunagawa M.: Comprehensive analysis of mycolic acid subclass and molecular species composition of *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 172 cell wall skeleton (SMP-105). *J. Microbiol. Methods*, 2008; 72: 149-156
- [63] Uenishi Y., Takii T., Yano I., Sunagawa M.: Separation and molecular characterization of mycolic acid from the cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 172 (SMP-105) and BCG substrains by normal-phase high performance liquid chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods*, 2009; 77: 320-322
- [64] Viader-Salvado J.M., Garza-Gonzalez E., Valdez-Leal R., del Bosque-Moncayo M.A., Tijerina-Menchaca R., Guerrero-Olazarán M.: Mycolic acid index susceptibility method for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, 2001; 39: 2642-2645
- [65] Viader-Salvado J.M., Molina-Torres C.A., Guerrero-Olazarán M.: Detection and identification of mycobacteria by mycolic acid analysis of sputum specimens and young cultures. *J. Microbiol. Methods*, 2007; 70: 479-483
- [66] Wick L.Y., Pasche N., Bernasconi S.M., Pelz O., Harms H.: Characterization of multiple-substrate utilization by anthracene-degrading *Mycobacterium frederiksbergense* LB501T. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003; 69: 6133-6142
- [67] Wick L.Y., Wattiau P., Harms H.: Influence of the growth substrate on the mycolic acid profiles of mycobacteria. *Environ. Microbiol.*, 2002; 4: 612-616
- [68] Yuan Y., Zhu Y., Crane D.D., Barry C.E.3rd: The effect of oxygenated mycolic acid composition on cell wall function and macrophage growth in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.*, 1998; 29: 1449-1458
- [69] Zambrano M.M., Kolter R.: Mycobacterial biofilms: a greasy way to hold it together. *Cell*, 2005; 123: 762-764

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktów interesów.