



Glukozylotransferazy i glukany paciorkowców zmiennych jako czynniki wirulencji w patogenie próchnicy zębów

Adrian Wiater, Janusz Szczodrak

Zakład Mikrobiologii Przemysłowej,
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Glucosyltransferases and glucans of mutans streptococci as virulence factors in the pathogenesis of dental caries

Summary

Mutans streptococci *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* play central role in the etiology of human dental caries due to their acidogenic potential and ability to form extracellular water-insoluble and water-soluble glucans in the presence of dietary sucrose. Streptococcal glucans are synthesized by a constitutive group of extracellular and/or cell-associated enzymes showing glucosyltransferase (GTF) activity. Each enzyme has distinctive properties, varying in its requirement for a glucan primer molecule, the proportion of $\alpha(1-6)$ - and $\alpha(1-3)$ -linkages, the degree of branching it introduces into the glucan, and the total length of glucan chain produced. Moreover, the overall properties of glucan depend on the relative activity of different GTF enzymes, as well as on their interactions, since one GTF may modify the product of another. This review article presents recent trends in the investigations on streptococcal GTFs and glucans. Particular emphasis has been laid on catalytic properties and molecular structure of different GTFs and on the mechanism of synthesis of specific glucans. Furthermore, the role of these enzymes and their products in the pathogenesis of dental caries is also discussed.

Key words:

glucosyltransferases, mutan, dextran, dental caries.

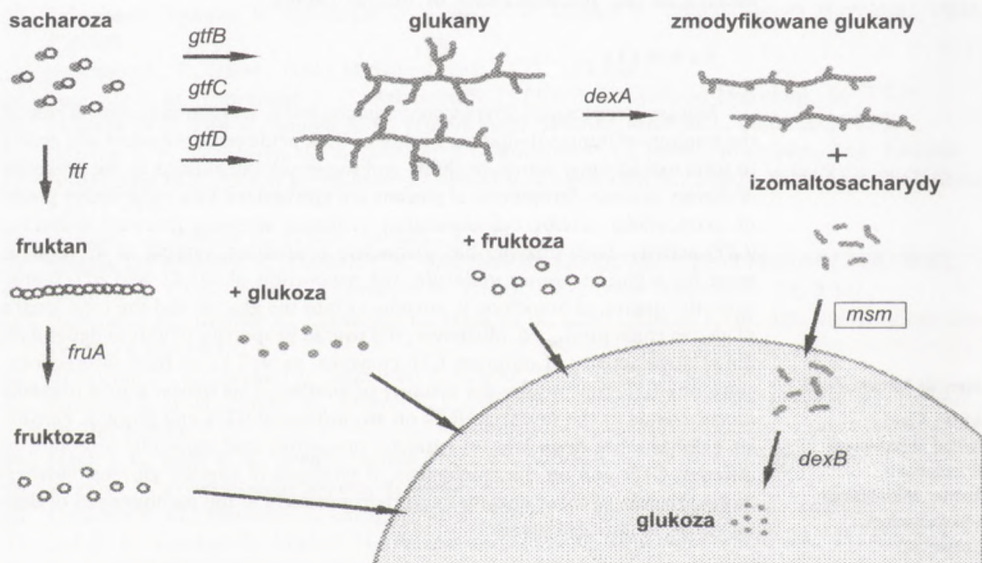
Adres do korespondencji

Adrian Wiater,
Zakład Mikrobiologii
Przemysłowej,
Instytut Mikrobiologii
i Biotechnologii,
Uniwersytet
Marii Curie-Skłodowskiej,
ul. Akademicka 19,
20-033 Lublin;
e-mail: adrianw2@wp.pl

1. Wstęp

Próchnicę zębów można zdefiniować jako destrukcyjny proces chorobowy polegający na powolnej demineralizacji twardych substancji zęba. Przyczyną demineralizacji jest kwas mlekowy, główny produkt beztlenowego rozpadu węglowodanów pokarmowych pod wpływem bakterii kwasotwórczych, nagromadzonych w płytce nazębnej (1).

Najpowszechniej izolowanymi i odgrywającymi najważniejszą rolę w etiologii próchnicy zębów gatunkami są paciorkowce zmienne *Streptococcus mutans* i *S. sobrinus* (2-6). *S. mutans* obecny jest u 98% populacji ludzkiej, a *S. sobrinus* występuje u 7-35% ludzi (5). Ich szczególne znaczenie w patogenezie próchnicy wynika z faktu, że wykorzystując sacharozę wytwarzają na zewnątrz komórki rozpuszczalne i nierozpuszczalne wielocukry, co wiąże się z tworzeniem płytki nazębnej i powstawaniem próchnicy (rys. 1). Mogą one również syntetyzować polisacharydy wewnątrzkomórkowe, które działając jako rezerwy węglowodanowe są przekształcane w kwas mlekowy w okresach kiedy węglowodany z diety są nieosiągalne. Kwas mlekowy jest produkowany dość intensywnie przez paciorkowce próchnicotwórcze nawet z najmniejszych dostępnych dawek węglowodanów, nadających się do fermentacji. Świadczy to bez wątpienia o udziale tych bakterii w patogenezie próchnicy.



Rys. 1. Metabolizm sacharozy przez enzymy zewnątrzkomórkowe u *Streptococcus mutans* (5). Oznaczenia genów: *gtf* – glukozylotransferazy – synteza gluknanów (dekstran i mutan), *ftf* – fruktozylotransferazy – synteza fruktanów, *fruA* – fruktanaza – egzofruktozydaza – uwalnianie pojedynczych jednostek fruktozowych z fruktanu, *dexA* – dekstranaza – rozkład gluknanu do izomaltosacharydów, *dexB* – dekstranaza – rozkład izomaltosacharydów do glukozy, *msm* (multiple sugar metabolism) – transport różnych cukrów do komórki.

2. Glukozylotransferazy – charakterystyka ogólna

Jednym z najważniejszych czynników wirulencji paciorkowców zmiennych są glukozylotransferazy (GTF; E.C. 2.4.1.5; sacharoza: 1,6- α -D-glukan 6- α -D-glukozylotransferaza; *dextranucrase*), syntetyzujące z sacharozy rozpuszczalne i nierozpuszczalne w wodzie glukany (7). Posiadają one aktywność inwertazy hydrolizującej sacharozę do glukozy i fruktozy oraz transferazy przenoszącej uwolnioną glukozę na rosnący łańcuch glukanu (8). Glukozylotransferazy są wysoce specyficzne dla sacharozy i nie polimeryzują wolnej glukozy ani glukozy pochodzącej z innych węglowodanów (9-11). *Streptococcus mutans* produkuje trzy różne glukozylotransferazy S, I i SI (Soluble, Insoluble oraz Soluble-Insoluble). Enzymy te są kodowane przez trzy osobne geny: *gtfD*, *gtfB* i *gtfC*, które sklonowano, zsekwencjonowano i osiągnięto ich ekspresję (7). GTF-I i GTF-SI są odpowiedzialne za syntezę nierozpuszczalnych glukanów, podczas gdy enzym GTF-S produkuje glukany rozpuszczalne w wodzie (12-14). U *S. sobrinus* obecne są cztery GTF-azy I, S, T i U i cztery geny *gtf*, które je kodują (15). Tylko jedna GTF-I produkuje nierozpuszczalny w wodzie glukan, podczas gdy trzy pozostałe GTF-S, GTF-T, GTF-U wytwarzają rozpuszczalną formę glukanu (16).

GTF-I występuje przeważnie na powierzchni komórki bakteryjnej, przez co nazywana jest *cell-associated* (CA), zaś GTF-S uwalniana jest z reguły do środowiska, czemu zawdzięcza nazwę *cell-free* (CF) (17). Lokalizacja i właściwości natywnej formy GTF-SI pozostają ciągle niejasne (7).

Glukozylotransferazy są enzymami konstytutywnymi. Można zaobserwować wysoki poziom ich produkcji również w środowisku pozbawionym sacharozy (18). Aktywność i właściwości glukozylotransferaz różnią się w zależności od tego czy enzymy te występują w formie wolnej czy związanej z podłożem (12). Ma to duże znaczenie w środowisku naturalnym, jakim jest jama ustna, ponieważ GTF-azy występują w postaci wolnej w ludzkiej ślinie lub są włączane w bakteryjną błonę, tworzącą się na powierzchni zębów (19,20). Vacca-Smith i wsp. wykazali, że związanie GTF-I i GTF-SI z opłaszczonym śliną hydroksyapatytem (HA) powoduje wyraźny wzrost aktywności obu enzymów (21).

Stałe poszukiwania skutecznych metod profilaktyki próchnicy doprowadziły w ostatnich latach do coraz szerszego stosowania w stomatologii inhibitorów transferaz glukozylowych w postaci preparatów zawierających naturalne wyciągi roślinne. Właściwości takie mają m. in. ekstrakty z liści herbaty Ulung (*Oolong*), które oprócz silnego hamowania aktywności GTF-az (22), są również zdolne do redukcji płytki nazębnej u ludzi (23) oraz ograniczania produkcji kwasu mlekowego przez paciorkowce zmienne (24). Wykazano również, że frakcje polifenolowe z jabłek i ekstraktu chmielowego hamują aktywność GTF-az i syntezę nierozpuszczalnych w wodzie glukanów (25,26).

3. Struktura molekularna GTF-az

Prowadzone od ponad piętnastu lat prace, mające na celu poznanie genów *gtf* różnych paciorkowców, dały efekt w postaci izolacji, zsekwencjonowania i określenia produktów kilkunastu genów. Wszystkie wyizolowane i oczyszczone glukozylotransferazy są dużymi cząsteczkami o średniej masie cząsteczkowej 160 kDa (27-29). Enzymy te zaangażowane są w syntezę nierozpuszczalnych w wodzie polimerów glukozy bogatych w wiązania $\alpha(1-3)$ zwanych mutanami oraz bogatych w wiązania $\alpha(1-6)$ i rozpuszczalnych w wodzie glukanów zwanych dekstranami (tab.).

Tabela

Ogólna charakterystyka paciorkowcowych glukozylotransferaz (30)

Szczep	Gen	Glukan ^a	Wielkość ^b (aa)	M _c ^c	Primer ^d
<i>S. mutans</i> GS5	<i>gtfB</i>	87% $\alpha(1-3)$ 13% $\alpha(1-6)$	1475	150	-
	<i>gtfC</i>	85% $\alpha(1-3)$ 15% $\alpha(1-6)$	1375	140	-
	<i>gtfD</i>	30% $\alpha(1-3)$ 70% $\alpha(1-6)$	1430	155	+
<i>S. mutans</i> LM7	<i>gtfC</i>	no	1375	150	+
<i>S. downei</i> Mfe28	<i>gtfI</i>	88% $\alpha(1-3)$ 12% $\alpha(1-6)$	1556	160	+
	<i>gtfS</i>	10% $\alpha(1-3)$ 90% $\alpha(1-6)$	1328	147	-
<i>S. sobrinus</i> 6715	<i>gtfIa</i>	no	1592	160	+
<i>S. sobrinus</i> OMZ 176	<i>gtfT</i>	27% $\alpha(1-3)$ 73% $\alpha(1-6)$	1542	163	-
	<i>gtfIs</i>	no	1590	175	+
<i>S. salivarius</i> ATCC 25975	<i>gtfJ</i>	90% $\alpha(1-3)$ 10% $\alpha(1-6)$	1522	168	+
	<i>gtfK</i>	100% $\alpha(1-6)$	1599	176	+/-
	<i>gtfL</i>	50% $\alpha(1-3)$ 50% $\alpha(1-6)$	1490	157	-
	<i>gtfM</i>	5% $\alpha(1-3)$ 95% $\alpha(1-6)$	1576	171	-
		<i>gtfG</i>	40% $\alpha(1-3)$ 60% $\alpha(1-6)$	1578	170

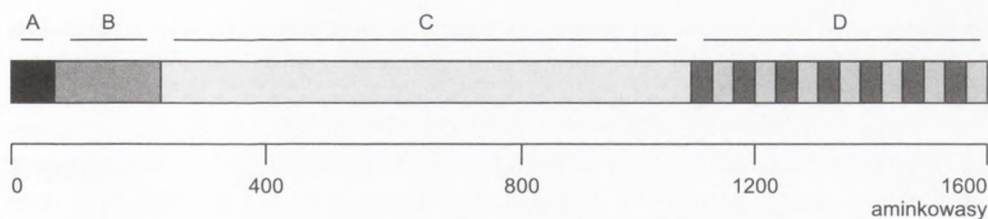
^a Procentowa zawartość wiązań; no – nie oznaczono zawartości wiązań w glukanie.

^b Liczba aminokwasów wchodzących w skład enzymu.

^c Masa cząsteczkowa (kDa) określona na podstawie sekwencji aminokwasowej.

^d Efekt aktywacji egzogennym glukanem (+) lub jego brak (-).

W przeprowadzonej analizie porównawczej różnych zsekwencjonowanych białek GTF-az wykazano, że enzymy te są blisko spokrewnione i mają podobną budowę molekularną (30-33). W ich skład wchodzi cztery odrębne domeny strukturalne (rys. 2). Ferretti i wsp. stwierdzili jako pierwsi obecność dwóch domen funkcjo-



Rys. 2. Schemat struktury glukozylotransferaz (30). A – peptyd sygnałowy, B – region zmienny, C – domena katalityczna, D – domena wiążąca glukan.

nalnych w obrębie glukozylotransferaz (34). Sugerowali oni istnienie domeny katalitycznej odpowiedzialnej za wiązanie i rozkład sacharozy oraz domeny C-końcowej zaangażowanej w wiązanie glukanu.

Na końcu N łańcucha polipeptydowego enzymu znajduje się peptyd sygnałowy (32-34 aminokwasów), za nim rozciąga się region zmienny o długości 123-129 aminokwasów. Położony dalej konserwatywny rdzeń obejmuje około 1000 aminokwasów i nazywany jest domeną katalityczną. Odpowiada ona za wiązanie i rozkład sacharozy. Domena katalityczna GTF-az jest wysoce konserwatywna (43% homologii między różnymi GTF). Koniec C łańcucha polipeptydowego enzymu obejmuje około 500 aminokwasów i składa się z serii tandemowych powtórzeń, które stanowią domenę wiążącą glukan.

Peptyd sygnałowy glukozylotransferaz jest typowym peptydem sygnałowym bakterii gramdodatnich. Składa się on z części N-końcowej, hydrofobowego rdzenia i bardziej polarnego regionu C-końcowego (35). Nie konserwatywny region, zlokalizowany zaraz za peptydem sygnałowym, jak się wydaje, nie ma znaczącej roli w mechanizmie działania enzymu. Jego delecja nie wpływa na aktywność GTF-az (36). Znaczenie tego zmiennego regionu pozostaje ciągle nie znane.

3.1. Domena N-końcowa GTF-az

W badaniach prowadzonych przez McGregor i wsp. (37) i Devulapalle i wsp. (38) wykazano, że drugorzędowa struktura N-końcowej domeny GTF-az posiada budowę typu $(\beta/\alpha)_8$ beczki (*barrel*), spotykaną również u glukozydaz, glukanotransferazy cyklodekstrynowej, izoamylazy oraz glukozydazy glukanu z *S. mutans* (39). Ten typ budowy charakteryzuje się obecnością 8 β -pasm (E1-E8) w rdzeniu białka oraz 8 α -helis (H1-H8) występujących na powierzchni cząsteczki. Charakterystyczną cechą budowy GTF-az jest ustawienie pierwszej helisy odpowiadającej helisie H3 w innych białkach. Segmenty β i α spotykane zwykle na początku nici (np. w amylazie) umiejscowione są w dalszej części białka GTF-az. W glukozylotransferazach występuje zatem nie spotykana dotychczas konstrukcja, w której normalne ustawienie występujących na przemian β -pasm i α -helis przeszło cykliczną permutację (37). Mimo to,

w budowie GTF-az spotykamy wszystkie elementy wymagane do utworzenia klasycznego układu $(\beta/\alpha)_8$ beczki, a przyjęcie tego modelu może pomóc w poznaniu zależności między budową i funkcją enzymu.

Aktywność katalityczna GTF-az związana jest z obecnością kwasu asparaginowego (Asp) w ich centrum aktywnym. Grupa Moosera wykazała, że miejsce tworzące wiązanie kowalencyjne z resztą glukozową pochodzącą z rozpadu sacharozy znajduje się wewnątrz domeny katalitycznej, prawdopodobnie w pobliżu końca C helisy E-4. Autorzy wyizolowali peptydy z GTF-I i GTF-S *S. sobrinus* posiadające miejsce aktywne (40). Sekwencje aminokwasowe badanych peptydów były bardzo podobne i zawierały trzy reszty asparaginianowe (sekwencja dla GTF-I: Asp-Ser-Ile-Arg-Val-**Asp**-Ala-Val-Asp; dla GTF-S: Asp-Gly-Val-Arg-Val-**Asp**-Ala-Val-Asp). Przy użyciu spektrometrii masowej wykazano, że Asp wewnątrz peptydu z GTF-I tworzy wiązanie estrowe z resztą glukozową. Potwierdzeniem tej teorii są także mutacje punktowe, w których reszta asparaginianowa zastępowana była przez inne aminokwasy, co prowadziło do całkowitego zahamowania aktywności enzymu (38,41).

3.2. Domena C-końcowa GTF-az

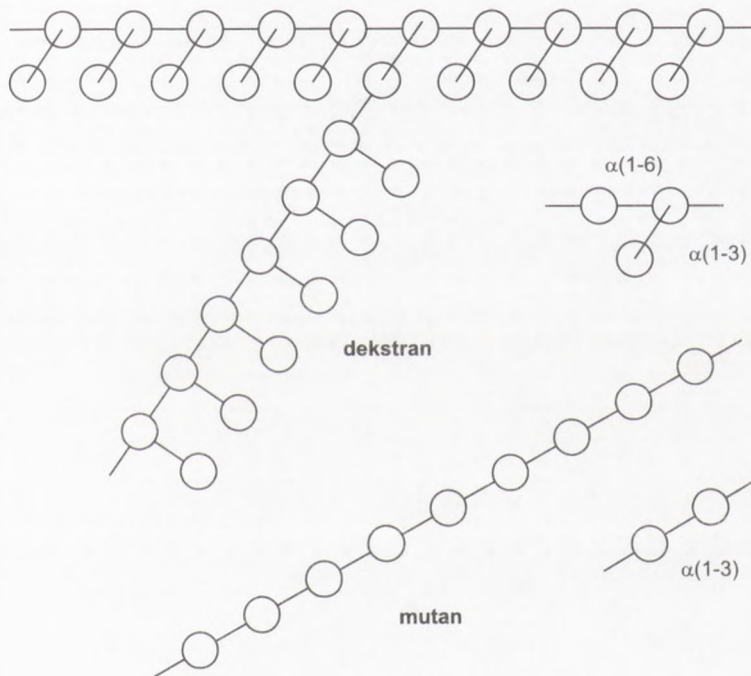
W przeprowadzonej analizie sekwencyjnej różnych glikozylotransferaz wykazano, że wszystkie enzymy posiadały C-końcową domenę złożoną z serii powtarzających się jednostek. Jednostki te zostały przypisane do czterech klas A, B, C i D (27,36,42). Liczba oraz rozmieszczenie poszczególnych jednostek jest specyficzne dla każdego enzymu. Jednostki A obecne są zawsze, często we wzorze A – C (31). Podobny wzór powtórzeń (A-C) obserwowany jest także w innych białkach, np. w C-końcowej domenie toksyny A i B *Clostridium difficile* i niektórych enzymach litycznych *S. pneumoniae*.

Domena C-końcowa GTF-az jest odpowiedzialna za wiązanie glukanu. Zaangażowane są w to konserwatywne reszty aminokwasowe. Zgrupowanie reszt aromatycznych (tyrozyny, tryptofanu i fenyloalaniny) może stabilizować wiązanie pomiędzy cukrem a białkiem poprzez interakcję z jednostką cukrową. Reszty polarne (lizyna, glicyna) lub reszty kwasowe (kwas asparaginowy) mogą tworzyć wiązanie wodorowe z resztą hydroksylową cukru (43). Obecność takich reszt aminokwasowych jak lizyna, glicyna, kwas asparaginowy lub seryna, zdolnych do zmiany „giętkości” struktury białka, może pozwalać na kierowanie reszt glukozowych we właściwe miejsce związania (44). W strukturze drugorzędowej domeny C-końcowej proponowanej przez von Eichel-Streiber i wsp. zakłada się, że jednostki powtarzające się, budujące domenę, posiadają strukturę „funkcjonalnej kieszeni wiążącej” (45). Obecność C-końcowej domeny wiążącej glukan, jak się wydaje, jest konieczna do utrzymania aktywności enzymu, jednak jej znaczenie w mechanizmie katalitycznym glikozylotransferaz nie jest jasne (34,36). Fakt, że delekcja niektórych części enzymu, pozostawia aktywność hydrolityczną, a usuwa zdolność wiązania i syntezy glukanu,

sugeruje, że domena C-końcowa może także odgrywać istotną rolę w syntezie łańcucha polimeru (46).

4. Budowa glukanów

Różnorodność glukanów, ich wielkość i struktura zależą od rodzaju GTF-az i szczepu bakterii przez który są syntetyzowane (47,48). Pomimo że każdy szczep produkuje swoisty dla siebie α -D-glukan, zasadniczą cechą wszystkich dekstranów jest główny łańcuch zbudowany z jednostek D-glukozy, połączonych głównie wiązaniami $\alpha(1-6)$ z licznymi odgałęzieniami w pozycjach 2, 3 i 4 (rys. 3). Mutany natomiast, charakteryzuje forma liniowa polimeru, w której glukozy połączone są wiązaniami $\alpha(1-3)$ (49,50). Poza tym, glukany różnią się: stopniem rozgałęzienia, długością i przestrzennym rozmieszczeniem łańcuchów bocznych oraz typem łańcuchów bocznych, w których jednostki glukozy mogą być połączone wiązaniami $\alpha(1-2)$, $\alpha(1-3)$, $\alpha(1-4)$ lub $\alpha(1-6)$ glikozydowymi (30). Wszystkie wymienione cechy w zasadniczy sposób wpływają na rozpuszczalność i charakter fizyczny α -D-glukanów (2,48,51).



Rys. 3. Przykład struktury silnie rozgałęzionego dekstranu oraz nierozgałęzionego mutanu syntetyzowanych przez glukozylotransferazy *S. mutans* 6715 (49).

5. Synteza glukanów

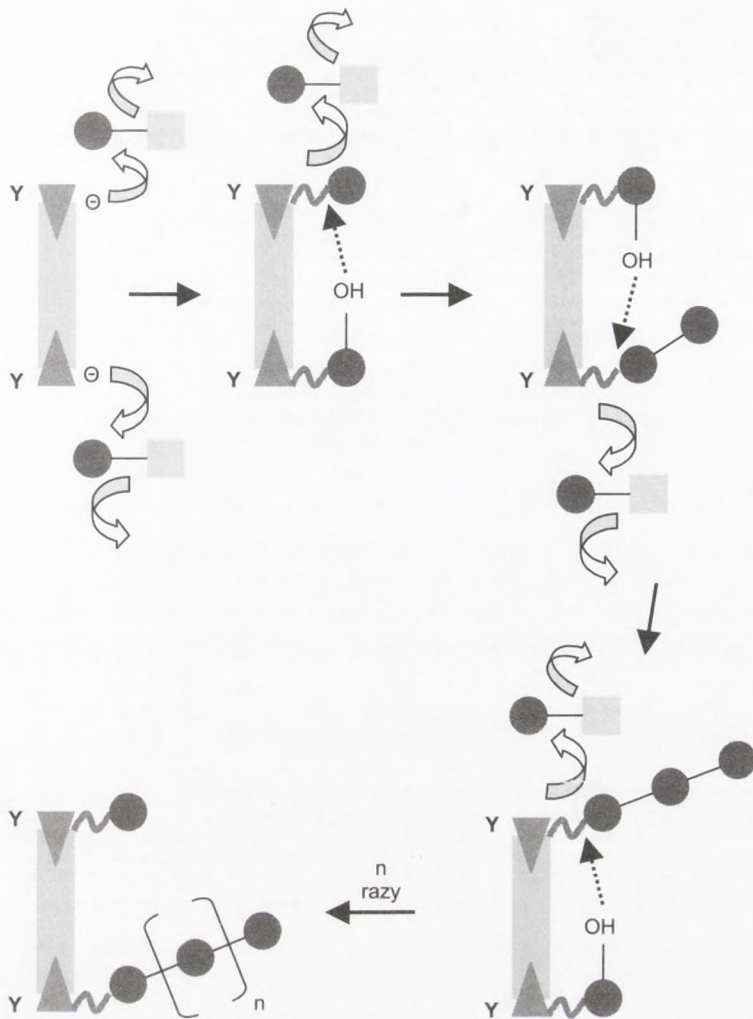
Synteza glukanów, jak proponuje Tsuchiya i wsp. (52), przebiega w trzech etapach: 1) inicjacja, 2) elongacja, 3) terminacja. Ostatni etap to oddysocjowanie enzymu od glukanu.

Konieczność obecności primera do zapoczątkowania procesu polimeryzacji była często dyskutowana. Mutan syntetyzowany przez GTF-I *S. mutans* wymaga obecności rozpuszczalnego glukanu jako primera, przy czym często wymagania te spełnia produkt GTF-S (50). Germaine i wsp. stwierdzili, że przyłączenie egzogenego primera stymuluje syntezę glukanu (53,54). Jakkolwiek, glukozylotransferazy są również aktywnymi enzymami w przypadku braku jakiegokolwiek primera (8). Wykazano, że obecność primera może mieć również wpływ na strukturę syntetyzowanego polimeru. Z dwóch różnych przebadanych GTF-S, jedna wymagała primera dekstranowego i tworzyła wysoko rozgałęziony produkt rozpuszczalny, natomiast druga nie wymagała go i syntetyzowała produkt rozpuszczalny, który był tylko nieznacznie rozgałęziony (55,56). Mechanizm autopolimeryzacji i bezpośrednie wydłużanie łańcucha, pozostaje sprawą wciąż nie do końca zrozumiałą.

Dla wyjaśnienia mechanizmu wydłużania łańcucha mutanu, Robyt zaproponował model jego elongacji poprzez insercję, w którym wydłużanie następuje od końca redukującego glukanu (49). Autor sugeruje obecność dwóch identycznych miejsc nukleofilowych w centrum aktywnym glukozylotransferazy, które tworzą na zmianę miejsce donorowe i akceptorowe dla reszty glukozy (rys. 4). Mechanizm ten składa się z dwóch odrębnych etapów:

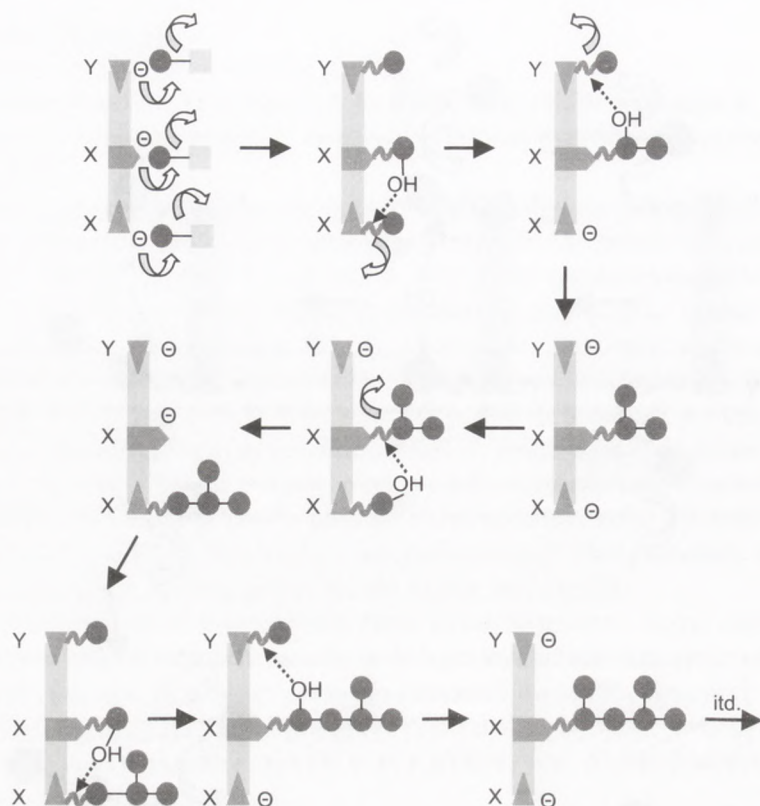
1. Miejsca nukleofilowe (Y, Y) atakują dwie cząsteczki sacharozy, prowadząc do uwolnienia fruktozy, a pozostawiając dwie reszty glukozy związane kowalencyjnie z enzymem.

2. Grupa OH-C₃ jednej z dwóch reszt glukozyowych wykonuje atak nukleofilowy na C₁ drugiej. Prowadzi to do utworzenia wiązania $\alpha(1-3)$ i uwolnienia jednego z dwóch miejsc nukleofilowych, które może atakować inną cząsteczkę sacharozy w celu utworzenia nowego kompleksu glukoza-enzym. Wydłużanie łańcucha mutanu następuje w wyniku wielokrotnego powtarzania cyklu.



Rys. 4. Mechanizm wydłużania łańcucha nierozpuszczalnego mutanu syntetyzowanego przez GTF-I *S. mutans* 6715 (49). Y, Y – miejsca nukleofilowe, ●—■ – sacharozę.

Nieco bardziej skomplikowany jest mechanizm wydłużania regularnie rozgałęzionego $\alpha(1-6)$ glukanu (dekstranu), syntetyzowanego przez GTF-S (rys. 5). Robyt sugeruje, że do syntezy dekstranu o wysokim stopniu regularnych, pojedynczych odgałęzień glukozydowych wymagane są trzy miejsca nukleofilowe X, X i Y (49). Dwa miejsca X, X uczestniczą w mechanizmie wydłużania łańcucha $\alpha(1-6)$ glukanu, który jest identyczny do mechanizmu wydłużania łańcucha mutanu. Jedyna różnica polega na tym, że atak nukleofilowy na C₁ glukozy na końcu redukującym wykonuje grupa OH-C₆ glukozy. Natomiast miejsce Y przeprowadza przeniesienie jednostki gluko-



Rys. 5. Mechanizm wydłużania łańcucha rozpuszczalnego dekstranu syntetyzowanego przez GTF-S *S. mutans* 6715 (49). X, X, Y – miejsca nukleofilowe, ● — sacharozę.

zowej do OH-C₃ każdej co drugiej reszty glukozy w rosnącym łańcuchu α(1-6) glukanu, dając w efekcie regularnie rozgałęzioną strukturę dekstranu.

W momencie zakończenia wydłużania łańcucha, jest on uwalniany przez reakcje akceptorowe, w których akceptor reaguje z resztą glukozy lub łańcuchem glukanu połączonym czasowo z enzymem w jego centrum aktywnym. Tworzy się wówczas kowalencyjne wiązanie pomiędzy glukozą lub glukanem a akceptorem. Kiedy akceptor odłącza glukan od miejsca aktywnego, polimeryzacja łańcucha glukanu zostaje zakończona.

Ostateczny produkt biosyntezy zależy jednak od względnej aktywności różnych GTF-az i wzajemnych zależności między nimi, ponieważ każda GTF-aza może modyfikować produkt innej (5). Ważną rolę odgrywa także zewnątrzkomórkowa dekstranaza (Dex A), która może zmieniać proporcje wiązań α(1-6) i α(1-3), oddziałując w ten sposób na rozpuszczalność glukanu i jego zdolności do pośredniczenia

w przyleganiu bakterii. Dekstranaza wpływa na adhezję poprzez zmniejszenie liczby wiązań $\alpha(1-6)$ w glukanie, co udowodniono na przykładzie mutantu Dex⁻, gromadzącego się na gładkich powierzchniach w znacznie większym stopniu niż szczep dziki (57). Innym skutkiem aktywności dekstranazy jest tworzenie miejsc dla syntezy odgałęzień, co w zasadniczy sposób zwiększa złożoność struktury glukanu (54).

W badaniach przeprowadzonych przez Kopec i wsp. nad enzymatyczną syntezą glukanu wykazano, że ta sama GTF-aza może tworzyć strukturalnie odmienne glukany, w zależności od tego czy enzym występuje w roztworze czy na stałej powierzchni (12). Glukan syntetyzowany przez GTF-I w roztworze wykazywał przewagę wiązań 1,3 z miejscami rozgałęzień na resztach glukozowych, podstawionych w pozycjach 3,6 i 2,3. W porównaniu do niego polimer formowany na powierzchni hydroksyapatytu (HA) zawierał większą liczbę wiązań 1,3 (o ok. 44%) i posiadał więcej rozgałęzień, zaś polisacharyd tworzony na powierzchni HA w obecności skrobi charakteryzował się przewagą wiązań 1,4, a miejsca rozgałęzień stanowiły reszty glukozowe podstawione w pozycjach 3 i 4. W obecności hydrolizatów skrobi bardzo wyraźnie zaznaczyła się w glukanie syntetyzowanym na powierzchni HA przewaga wiązań 1,3 nad 1,6.

Glukany syntetyzowane przez GTF-SI w roztworze posiadały głównie wiązania 1,6 z małą liczbą odgałęzień, powstających poprzez podstawienie w pozycjach 3,6 i 4,6. W tego typu glukaniech wykazano 23 razy więcej glukozy połączonej wiązaniami 1,6 niż glukozy połączonej wiązaniami 1,3. Po związaniu na powierzchni HA, GTF-SI produkowała glukany głównie z wiązaniami 1,3 (ponad trzykrotnie więcej niż 1,6) i z licznymi odgałęzieniami na resztach glukozowych podstawionych w pozycjach 3,4; 2,3; 3,6; 4,6.

Glukan produkowany przez GTF-S charakteryzował się przewagą wiązań 1,6, zarówno w przypadku syntezy w roztworze, jak i na powierzchni HA, z odgałęzieniami głównie w pozycjach 3,6 i małą liczbą odgałęzień na glukozach podstawionych w pozycjach 4,6. Glukan formowany na powierzchni HA zawierał więcej wiązań 1,6 niż tworzony w roztworze i był bardziej rozgałęziony.

Glukany syntetyzowane w roztworze z udziałem mieszaniny trzech różnych GTF-az (GTF-I, GTF-S, GTF-SI) charakteryzowały się nieznaczną przewagą wiązań 1,6 i rozgałęzieniami na glukozach podstawionych w pozycjach 3 i 6. Polimery tworzone na powierzchni HA miały wyraźną przewagę wiązań 1,6 (około trzykrotnie więcej niż 1,3). Główne punkty odgałęzień występowały na glukozie przy węglach 3 i 6.

6. Funkcje glukanów

Funkcje glukanów w płycie nazębnej wyznacza ich budowa. Nierozpuszczalny w wodzie mutan odgrywa istotną rolę w adsorbowaniu się bakterii do powierzchni szkliwa, doprowadzając do wytworzenia stabilnego połączenia pomiędzy paciorkowcami a błoną nazębną, a także umożliwia agregację bakterii występujących w nie-

zależnych łańcuchach. W ten sposób odpowiada on zarówno za zwiększanie masy płytki i jej ścisłe połączenie ze szkliwem oraz za dalszą kolonizację i agregację bakterii (58,59).

Dekstran, ze względu na swój rozpuszczalny charakter, stanowi głównie rezerwę dla dalszych przemian metabolicznych w sytuacji niedoboru cukru w pożywieniu oraz ułatwia agregację bakterii w płytce (60).

Przypuszcza się, że glukany pełnią również inne, istotne dla patogenów funkcje: stanowią zewnątrzkomórkowe zasoby materiałów zapasowych, chronią przed systemem obronnym gospodarza, bakteriofagami i bakteriocynami. Ustalają one także warunki panujące w bakteryjnej macierzy międzykomórkowej, decydującej o gęstości bakterii w płytce. Zapewnienie odpowiedniej struktury płytki poprawia dyfuzję składników odżywczych przez macierz, co prowadzi do zwiększenia aktywności metabolicznej i wzmacnia produkcję kwasów (61,62).

Istotne znaczenie dla funkcji glukanów ma obecność w glukozylotransferazach domen wiążących glukan. Prowadzi to do agregacji za ich pośrednictwem bakterii posiadających GTF-azy związane z komórką. Dzięki temu zjawisku uwalniana GTF-aza związana z powierzchnią zęba, syntetyzując glukan, tworzy nowe miejsce kolonizacji dla bakterii (63). Glukan może zatem pośredniczyć we wzajemnym wiązaniu bakterii, glukozylotransferaz (wolnych lub związanych z powierzchnią zęba) z bakteriami i różnych GTF-az między sobą. Ma to podstawowe znaczenie dla przylegania i agregacji, szczególnie gdy weźmie się pod uwagę wyniki badań Germaine i Schachtele, według których w kompleksie enzym-glukan na jedną cząsteczkę glukanu przypada 150 cząsteczek enzymu (11).

7. Podsumowanie

Z dokonanego przeglądu piśmiennictwa wynika, że glukozylotransferazy paciorkowców zmiennych oraz nierozpuszczalne w wodzie glukany, jako produkty syntezy tych enzymów, odgrywają istotną rolę w etiopatologii próchnicy zębów. Są one powszechnie uznane za jedno z najważniejszych czynników wirulencji, ułatwiających przyleganie bakterii próchnicotwórczych do powierzchni szkliwa. W ostatnich latach dokonał się również duży postęp w poznaniu struktury molekularnej GTF-az i ich produktów oraz genów odpowiedzialnych za syntezę tych enzymów. Poświęcono wiele uwagi określeniu zarówno liczby, jak i właściwości transferaz glukozyloyowych paciorkowców za pomocą technik rekombinacji DNA. Kontynuacja tych badań zmierza w kierunku poznania mechanizmów regulacji tych enzymów oraz znalezienia specyficznych dla nich inhibitorów, które hamując ich aktywność będą skutecznie zapobiegać próchnicy zębów.

Literatura

1. Lautenbach E., (1998), *Stomatologia od A do Z*, Zakład Narodowy im. Ossolińskiego, Wrocław, Warszawa, Kraków, 717-719.
2. Loesche W. J., (1986), *Microbiol. Rev.*, 50, 353-380.
3. Marsh P. D., Martin M., (1994), *Mikrobiologia jamy ustnej*, PWN, Warszawa.
4. Hamada S., Ooshima T., Fujiwara T., Minami T., Kimura S., (1996), *Microbial Ecol. Health Dis.*, 9, 349-357.
5. Colby S. M., Russell R. R. B., (1997), *J. Appl. Microbiol. Symp. Supl.*, 83, 80S-88S.
6. Hajishengallis G., Michalek S. M., (1999), *Oral. Microbiol. Immunol.*, 14, 1-20.
7. Fujiwara T., Terao Y., Hoshino T., Kawabata S., Ooshima T., Sobue S., Kimura S., Hamada S., (1998), *FEMS Microbiol. Lett.*, 161, 331-336.
8. Montville T. J., Cooney C. L., Sinskey A. J., (1978), *Adv. Appl. Microbiol.*, 24, 55-80.
9. Jordan H. V., Keyes P. H., (1966), *Arch. Oral. Biol.*, 11, 793-801.
10. Tanzer J. M., Freedman M. L., Fitzgerald R. J., Larson R. H., (1974), *Infect. Immun.*, 10, 197-203.
11. Germaine G. R., Schachtele C. F., (1976), *Infect. Immun.*, 13, 365-372.
12. Kopec L. K., Vacca-Smith A. M., Bowen W. H., (1997), *Glycobiology*, 7, 929-934.
13. Tsumori H., Kuramitsu H., (1997), *Oral Microbiol. Immunol.*, 12, 274-280.
14. Shiroza T., Shinozaki N., Watanabe T., Ikemi T., Fukushima K., Abiko Y., (1998), *Oral Microbiol. Immunol.*, 13, 11-16.
15. Russell R. R. B., (1994), *Caries Res.*, 28, 69-82.
16. Hanada N., Katayama T., Kunimori A., Yamashita Y., Takahara T., (1993), *Microbios*, 73, 23-32.
17. Hamada S., Horikoshi T., Minami T., Okahashi N., Koga T., (1989), *J. Gen. Microbiol.*, 135, 335-344.
18. Guggenheim B., Newbrum E., (1969), *Helv. Odont. Acta*, 13, 84-97.
19. Rölla G., Scheie A. A., Ciardi J. E., (1985), *Scand. J. Dent. Res.*, 93, 105-111.
20. Scheie A. A., Eggen K. H., Rölla G., (1986), *Scand. J. Dental. Res.*, 95, 212-215.
21. Vacca-Smith A. M., Ventikaraman A. R., Schilling K. M., Bowen W. H., (1996), *Caries Res.*, 30, 354-360.
22. Nakahara K., Kawabata S., Ono H., Ogura K., Tanaka T., Ooshima T., Hamada S., (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 968-973.
23. Ooshima T., Minami T., Aono W., Tamura Y., Hamada S., (1994), *Caries Res.*, 28, 146-149.
24. Matsumoto M., Minami T., Sasaki H., Sobue S., Hamada S., Ooshima T., (1999), *Caries Res.*, 33, 441-445.
25. Yanagida A., Kanda T., Tanabe M., Matsudaira F., Cordeiro J. G. O., (2000), *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5666-5671.
26. Tagashira M., Uchiyama K., Yoshimura T., Shirota M., Uemitsu N., (1997), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 332-335.
27. Gilmore K. S., Russell R. R. B., Ferretti J. J., (1990), *Infect. Immun.*, 58, 2452-2458.
28. Hanada N., Yamashita Y., Shibata Y., Sato S., Katayama T., Takehara T., Inoue M., (1991), *Infect. Immun.*, 59, 3434-3438.
29. Sato S., Inone M., Hanada N., Aizawa Y., Katayama T., Isobe Y., (1993), *DNA Seq.*, 4, 19-27.
30. Monchois V., Willemot R. M., Monsan P., (1999), *Microbiol. Rev.*, 23, 131-151.
31. Russell R. R. B., (1990), *Arch. Oral Biol.*, 35, 53S-58S.
32. Simpson C. L., Cheetham N. W. H., Giffard P. M., Jacques N. A., (1995), *Microbiology*, 141, 1451-1460.
33. Vickermann M. M., Sulavik M. C., Nowak J. D., Gardner N. M., Jones C. W., Clewell D. B., (1997), *DNA Seq.*, 7, 83-95.
34. Ferretti J. J., Gilpin M. L., Russell R. R. B., (1987), *J. Bacteriol.*, 169, 4271-4278.
35. IZARD J. W., Kendall D. A., (1994), *Mol. Microbiol.*, 13, 765-773.
36. Abo H., Matsumura T., Kodama T., Ohata H., Fukui K., Kato K., Kagawa H., (1991), *J. Bacteriol.*, 173, 989-996.
37. McGregor E. A., Jespersen H. M., Svensson B., (1996), *FEBS Lett.*, 378, 263-266.
38. Devulapalle K. S., Goodman S. D., Gao Q., Hemsley A., Mooser G., (1997), *Protein Sci.*, 6, 2489-2493.

39. Jespersen H. M., McGregor A. E., Henrissat B., Sierk M. R., Svensson B., (1993), *J. Protein Chem.*, 12, 791-805.
40. Mooser G., Hefta S. A., Paxton R. J., Shively J. E., Lee T. D., (1991), *J. Biol. Chem.*, 266, 8916-8922.
41. Kato C., Nakano Y., Lis M., Kuramitsu H. K., (1992), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 189, 1184-1188.
42. Kingston K. B., Allen D. M., Jacques N. A., (2002), *Microbiology*, 148, 549-558.
43. Quijcho F. A., (1986), *Annu. Rev. Biochem.*, 55, 287-315.
44. Lemieux R. U., (1989), *Chem. Soc. Rev.*, 18, 347-374.
45. von Eichel-Streiber C., Saueborn M., Kuramitsu H. K., (1992), *J. Bacteriol.*, 174, 6707-6710.
46. Kato C., Kuramitsu H. K., (1990), *FEMS Microbiol. Lett.*, 60, 299-302.
47. Hare M. D., Svensson S., Walker G. J., (1978), *Carbohydr. Res.*, 66, 254-264.
48. Wiater A., Choma A., Szczodrak J., (1999), *J. Basic Microbiol.*, 39, 265-273.
49. Robyt J. F., (1983), in: *Glucosyltransferases, Glucans, and Dental Caries*, Eds. R. J. Doyle, J. E. Ciardi, IRL Press, Waszyngton, 123-133.
50. Cerning J., (1990), *Microbiol. Rev.*, 87, 113-130.
51. Hamada S., Slade H. D., (1980), *Microbiol. Rev.*, 44, 331-384.
52. Tsuchiya H. M., Hellman N. N., Koepsell H. J., (1953), *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 757-758.
53. Germaine G. R., Chludzinski A. M., Schachtele C. F., (1974), *J. Bacteriol.*, 120, 287-294.
54. Germaine G. R., Harlander S. K., Leung W. L. S., Schachtele C. F., (1977), *Infect. Immun.*, 16, 637-648.
55. Shimamura A. H., Tsumori H., Mukasa H., (1982), *Biochim. Biophys. Acta.*, 702, 72-80.
56. McCabe M. M., Hamelik R. M., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 115, 287-294.
57. Colby S. M., Whiting G. C., Tao L., Russell R. R. B., (1995), *Microbiology*, 141, 2929-2936.
58. Mikkelsen L., (1996), *Microbial Ecol. Health Dis.*, 9, 31-320.
59. Jańczuk Z., (1999), *Stomatologia zachowawcza*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
60. Ebisu S., Misaki A., Kato K., Kotani S., (1974), *Carbohydr. Res.*, 38, 374-381.
61. Dibdin G. H., Shellis R. P., (1988), *J. Dent. Res.*, 67, 890-895.
62. van Houte J., Russo J., Probst K. S., (1989), *J. Dent. Res.*, 68, 451-459.
63. Schilling K. M., Bowen W. H., (1992), *Infect. Immun.*, 60, 284-295.