BilRI-proteiinin ilmentyminen yksittäisissä *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* -soluissa

Pro gradu -tutkielma
Turun yliopisto
Bioteknologian laitos
Solubiologian tutkinto-ohjelma (FM)
Tammikuu 2024

Wille-Veikko Poikonen

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO
Bioteknologian laitos
POIKONEN WILLE-VEIKKO: BilRI-proteiinin ilmentyminen yksittäisissä *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* -soluissa
Pro gradu, 37 s
Biokemia, solubiologia
Tammikuu 2024
Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -järjestelmällä.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (A. actinomycetemcomitans) on gramnegatiivinen opportunistinen patogeeni, joka aiheuttaa ihmisessä parodontiittia, vakavaa hampaan kiinnityskudoksen sairautta. *A. actinomycetemcomitans* kasvaa luonnossa biofilmejä muodostavassa populaatiossa. Tutkimuksessa perehdytään *A. actinomycetemcomitans*in tuottamiin proteiineihin, sekä niiden ilmentämiseen vaikuttaviin tekijöihin. Tutkimuksessa kehitettiin uusi mutanttikanta proteiinin ilmentämisen seuraamiseksi.

*A. actinomycetemcomitans*in on havaittu ilmentävän mm. LEA-proteiinin kaltaista proteiinia, nimeltään BilRI (bacterial interleukin receptor 1). LEA-proteiinit ovat stressiproteiineja ja myös BilRIä ilmennetään *A. actinomycetemcomitans*issa erityisesti alemmassa lämpötilassa (27 ℃, optimaalinen kasvu 37 ℃). Proteiinin ilmentyminen alemmassa lämpötilassa on havaittu *DsRed* -reportterigeenin avulla, joka ei ole täysin verrattavissa luonnolliseen BilRI:n ilmentymiseen. LEA-proteiinien ymmärtäminen auttaisi ymmärtämään niiden evolutiivisia vaikutuksia. Tutkittaessa *A. actinomycetemcomitans*in proteiinin ilmentymistä, paras tapa on valmistaa mutanttikanta, jonka avulla ilmentymistä voidaan mitata. Geenin siirtäminen *A. actinomycetemcomitans*iin onnistuu muun muassa luonnollisella transformaatiolla, jossa organismi ottaa vastaan lineaarista DNA:ta kanavaproteiini HofQ:n kautta. Käyttämämme metodi hyödyntää leimattavaa histidiinihäntää, joka tuotetaan BilRI-proteiinin perään. Tällä tavalla leimattujen proteiinien määrää voidaan seurata Western blotin ja virtaussytometrian avulla. Tutkimuksemme keskittyi erityisesti yksittäisen solujen analysoimiseen *A. actinomycetemcomitans* -populaatiossa.

Mutanttikannan kehittämien ja BilRI:n ilmentäminen histidiinihännän kanssa onnistuivat. Solupopulaation virtaussytometrinen analyysi kuitenkin epäonnistui. Syynä tähän saattavat olla esimerkiksi organismin pinnan lipopolysakkaridit, jotka ovat saattaneet piilottaa histidiinihännän ja estää leiman tarttumisen.

Asiasanat: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, BilRI, biofilmi, parodontiitti, LEA, proteiini

Sisällys

Asiasanat 2
1. Johdanto 3
1.1. Parodontiitti ja sen hoito 3
1.2 Aggregatibacter actinomycetemcomitans 4
1.3 Biofilmeistä 5
1.4 Luonnollinen kompetenssi ja transformaatio 7
1.4.1 HofQ-proteiini 9
1.5 BilRI 9
1.5.1 BilRI ja immuunivaste 10
1.6 LEA-Proteiinit 11
1.7 Western Blot 12
1.8 Virtaussytometria 13
2. Työn tavoitteet 15
3. Materiaalit ja menetelmät 16
3.1. DNA-konstruktin tekeminen 16
3.2 Luonnollinen transformaatio 19
3.3 Pesäke-PCR 20
3.4 Biofilmikasvatus 20
3.5 Western blot 21
3.6 Virtaussytometria 22
4. Tulokset ja tulosten tarkastelu 23
4.1 DNA-konstruktin valmistaminen 24
4.2 Luonnollinen transformaatio ja pesäke-PCR 26
4.3 Western blot 28
4.4 Virtaussytometria 30
4.5 Yhteenveto 33
5. Kirjallisuus 34

Asiasanat

A. actinomycetemcomitans = *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

BilRI = bacterial interleukin receptor 1 -proteiini

bilRI = geeni, joka koodaa bacterial interleukin receptor 1 -proteiinia

BSA = bovine serum albumin

CDT = cytolethal distending toxin

CTCC = circulating tumor cell cluster

DNA = deoksiribonukleiinihappo, deoxyribonucleic acid

DS = DNA, alavirtaan, eng. downstream

ECL = Enhanced Chemi Luminesence

emHofQ = HofQ-proteiinin ulkomembraanin domeeni, eng. extramembranous domain of HofQ

EPS = eksopolysakkaridimatriksi

FACS = Fluorescence-Activated Cell Sorting

HACEK = *Haemophilus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* ja *Kingella kingae* -lajit

HGS = horisontaalinen geenin siirto

hofQ = geeni, joka koodaa HofQ-proteiinia

HofQ = kanavaproteiini

IL = interleukiini

LA-Amp = lysogeny broth agar + ampisilliini

LEA = late embryogenesis abundant

LPS = lipopolysakkaridi

SCA = single cell analysis

SDS-PAGE = sodium dodecyl sulfate-polyarcylamide gel electrophoresis

TBS-T = Tris-buffered saline + Tween

TSA-HS = tryptone soybroth agar -horse serum

US = DNA, ylävirtaan, eng. upstream

ΔbilRI = bilRI-geeni poistettu

1. Johdanto

1.1. Parodontiitti ja sen hoito

Parodontiitti on infektion aiheuttama tulehdussairaus, jossa tärkeässä osassa on biofilmin muodostuminen. Parodontiitti aiheuttaa ientaskujen muodostumista. Ientaskujen muodostuessa uuden kudoksen muodostuminen häiriintyy ja neutrofiilien, osteoblastien ja makrofagien kudoksen tuhoaminen stimuloituu. Tämä epätasapaino kudoksen solujen kierrossa voi johtaa vakaviin tuhoihin suun tukikudoksessa ja pahimmassa tapauksessa tauti johtaa sairastuneen hampaan irtoamiseen. (Könönen ja muut 2019.)

Parodontiitista esiintyy aggressiivista ja kroonista muotoa. Ne eroavat toisistaan etiologisesti, mutta niiden hoitomuodot ovat laajalti samanlaisia. (Teughels ja muut 2014). Parodontiitti on yksi tärkeimpiä suun tauteja, joka vaikuttaa globaaliin kroonisten tautien kuormaan (Petersen ja Baehni 2012). Globaalilla kroonisten tautien kuormalla mitataan yksilölle ja yhteiskunnalle/taloudelle koituvaa rasitusta, jonka tauti aiheuttaa (The Australian Prevention Partnership centre 2023). Krooniset taudit vastaavat noin 75 %:a vuotuisista terveydenhuollon kuluista Yhdysvalloissa (Hardy 2004).

Kroonisten tautien aiheuttama kuormitus luo suuren ongelman yleisessä terveydenhuollossa. Kuten monissa muissa kroonisissa taudeissa, kroonisen parodontiitin riskitekijöihin vaikuttavat: tupakointi, liiallinen alkoholin käyttö, liika lihavuus, huono suun hygienia ja huono ruokavalio (Petersen ja Baehni 2012.) Aggressiiviseksi parodontiitiksi lasketaan ryhmä parodontaalisia sairauksia, jotka etenevät nopeasti ja esiintyvät muutoin terveillä potilailla. Aggressiivisessa parodontiitissa potilaan hampaan tukikudos alkaa pettää ja suun luusto alkaa hajota nopeammin krooniseen tautimuotoon verrattuna. Potilaan ikä vaikuttaa taudin diagnosoimiseen. Nuorella iällä todettu parodontiitti usein kertoo taudin olevan aggressiivista muotoa. Aggressiivinen parodontiitti tyypillisesti periytyy suvussa, mikä viittaa geneettiseen alttiuteen. (Teughels ja muut 2014.)

Parodontiittia ehkäistään hyvällä ja säännöllisellä hampaiden harjaamisella. Plakin kerääntymisen estäminen on tärkeää. Hampaiden säännöllinen harjaaminen vähentää parodontaalisten taskujen (eng. periodontal pocketing) muodostumista ja niiden syventymistä.

Parodontiittia voidaan hoitaa kirurgisesti ja ei-kirurgisesti. Plakin poistaminen ja hampaiden pinnan puhdistaminen ienlinjan alapuolelta ovat pääasiallisia ei-kirurgisia toimenpiteitä parodontiitin hoitamisessa. Jopa melko pahasti vaurioituneet hampaat voidaan hoitaa näillä metodeilla. Vaikka suurin osa parodontiittitapauksista voidaan hoitaa, noin 20–25 %:lla potilaista tauti jatkaa etenemistä hyvästä hoidosta ja ylläpidosta huolimatta. (Fischer ja muut 2020.)

1.2 Aggregatibacter actinomycetemcomitans

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (*A. actinomycetemcomitans*) on gramnegatiivinen anaerobinen bakteeri, joka suosii korkeahiilidioksidisia olosuhteita. Muodoltaan se on kokkobasilli, eli pyöreän kokin ja sauvamaisen basillin väliltä. *A. actinomycetemcomitans* on HACEK-ryhmän (*Haemophilus*, *A. actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* ja *Kingella kingae* -lajit) jäsen. Kaikki HACEK-ryhmän jäsenet ovat gramnegatiivisia ja tunnettuja endokardiitin aiheuttajia. (Chambers ja muut 2013.)

Laaja geneettinen monimuotoisuus lajin sisällä tarkoittaa, että *A. actinomycetemcomitans*ista esiintyy harmitonta ja hyvin tarttuvaa varianttia. Bakteeri ilmentää useita tekijöitä, jotka aktivoivat immuunivasteita isännässä. Useat näistä tekijöistä saattavat aiheuttaa solukuolemaa ja tulehdustilaa. Näihin tekijöihin kuuluu muun muassa pitkiä nipuissa esiintyviä fimbrioita, adheesiotekijöitä, lipopolysakkarideja (LPS) ja peptidoglykaaneihin liittyviä lipoproteiineja (PAL, eng. peptidoglycan-associated lipoprotein). (Maula ja muut 2021.)

*A. actinomycetemcomitans*in virulenssitekijöistä tärkein on sen erittämä leukotoksiini (Vega ja muut 2019). Leukotoksiinit ovat grampositiivisille ja -negatiivisille organismeille ominaisia erittäin tärkeitä virulenssitekijöitä. Leukotoksiinien tehtävä on tuhota isännän leukosyyttejä, mikä heikentää isännän immuunivastetta organismia vastaan. Jotkut leukotoksiinit ovat myös hemolyyttisiä. Hemolyysin tehtävänä on saada rautaa patogeenin käyttöön. (Srikumaran 2020.)

*A. actinomycetemcomitans*in ilmentämä leukotoksiini on RTX-toksiineihin (repeats-in-toxin) kuuluva Leukothera (LtxA). LtxA toimii

virulenssitekijänä auttaen organismia piiloutumaan isännän immuunipuolustukselta. Tämä onnistuu LtxA:n sitoutumisella valkosolujen β_2-integriinin lymfosyytin toimintaan vaikuttavaan antigeeni 1:een (LFA-1, lymphocyte function-associated antigen-1), mikä aiheuttaa solukuoleman näissä soluissa. (Vega ja muut 2019.)

Organismin on myös havaittu erittävän CDT:tä (eng. cytolethal distending toxin), joka on isännän solujen DNA:ta vaurioittava myrkyllinen yhdiste. CDT:n takia hoitamattomassa parodontiitissa hampaiden tukikudos tuhoutuu, sillä se aiheuttaa solusyklin pysähtymistä sille altistuneissa soluissa, johtaen lopulta niiden apoptoosiin. *A. actinomycetemcomitans* on ainoa tunnettu CDT:tä erittävä suun patogeeni. (Belibasakis ja muut 2019.)

A. actinomycetemcomitans kykenee myös luonnolliseen transformaatioon, joka edesauttaa organismin selviytymistä epäsuotuisissa olosuhteissa, sekä lisää geneettistä variaatiota populaation sisällä (Ahlstrand ja muut 2018).

1.3 Biofilmeistä

A. actinomycetemcomitans, johon tutkimuksemme keskittyi, on opportunistinen biofilmejä muodostava patogeeni. Biofilmien muodostamiseen se hyödyntää ympäristöstään eri aineita, kuten rautaa. *A. actinomycetemcomitans* kykenee myös irrottautumaan biofilmistä erittämällä Dispersin B -nimistä entsyymiä. (Stacy ja muut 2016.)

Biofilmejä muodostavat useat bakteerilajit. Tällaiset bakteerilajit vastaavat suurimmasta osasta kroonisia ja uusiutuvia tulehduksia. Biofilmeihin liittyvät tulehdukset uusiutuvat jopa 65–80 %:ssa tapauksista. Biofilmit ovat kolmiulotteisia bakteeriyhteisöjä, jotka elävät pinnoilla. Niiden pintaa ympäröi verkosto polysakkarideja, proteiineja ja DNA:ta. Eksopolysakkaridimatriksi (EPS) auttaa biofilmiä ankkuroitumaan, antaa sille tukea ja suojaa sitä esimerkiksi lääkeaineilta. Tämä tekee biofilmeistä tyypillisesti huomattavasti vastustuskykyisempiä antibiooteille. Erittäin herkätkin bakteerit saavat jopa tuhatkertaisen resistenssin antibiootteja vastaan, kun ne ovat muodostaneet biofilmin. (Venkatesan ja muut 2015.) Tällä biofilmien antamalla resistenssillä on myös oma roolinsa antibioottiresistenttien bakteerikantojen muodostumisessa,

sillä biofilmin keskellä elävät solut eivät välttämättä kuole antibioottiin, mutta altistuvat sille ja saattavat muodostaa resistenssin kyseiselle antibiootille (Sharma ja muut 2019).

Biofilmien resistenssiin voi vaikuttaa useita tekijöitä. Vaikuttavia tekijöitä voivat esimerkiksi olla: materiaali, jolla biofilmi kasvaa, solujen tiheys, biofilmin ikä ja paksuus sekä kasvumediumin laatu. Kokeiden perusteella kasvualustan materiaalin vaikutus ei yleisesti ole kovin suuri, mutta joitain tiettyjä mikrobimyrkkyjä vastaan sillä voi olla suurtakin vaikutusta.

Solujen tiheys biofilmissä vaikuttaa voimakkaasti sen kestävyyteen. Solujen tiheys biofilmissä ilmenee biofilmin paksuutena. Biofilmin paksuus korreloi melko lineaarisesti mitattuun resistenssiin (kokeessa mitattu $R^2 = 0,629$). Vanhempi biofilmi kestää paremmin biosidejä. Muutaman päivän sisällä resistenssi kasvaa. Kokeissa mitattu korrelaatio ei ollut kovin suuri ($R^2 = 0,217$), mutta se oli havaittavissa.

Kasvumediumilla on suuri vaikutus biofilmin kestävyyteen. LB-mediumilla kuusi tuntia vanha biofilmi tuhoutui käytännössä täysin kanamysiinialtistuksessa. Glukoosin lisäys mediumiin poisti kanamysiinin vaikutuksen melkein täysin. Kun koe toistettiin kanamysiinillä, tulos oli päinvastainen. Lisätty glukoosi tehosti ampisilliinin vaikutusta biofilmikasvatuksessa. (Stewart 2015.)

Luonnollisesti infektoituneita koiria tutkittaessa *Leptospira interrogans*in havaittiin muodostavan biofilmejä seitsemän vuorokauden jälkeen. Biofilmi osoittautui huomattavasti planktonista muotoa resistentimmäksi. Biofilmimuodossa *L. interrogans* saavutti esimerkiksi MIC_{90}-resistanssin 1600 µg/ml amoksisilliiniä ja 800 µg/ml ampisilliiniä vastaan. Planktonisessa muodossa *L. interrogans*in kasvua inhiboivat kaikki tutkitut antibiootit, ja saadut MIC-arvot olivat joko juuri ja juuri havaittavia tai alle havaittavan arvon. (Carvalho ja muut 2023).

MIC-arvo kertoo, kuinka hyvin antibiootti inhiboi mikrobien kasvua (eng. maximum inhibitory concentration), ja luku (esimerkiksi 90) kertoo prosenttiosuuden inhiboiduista mikrobeista populaatiossa. (Yamazhan ja muut 2005).

Parodontiitti, endokardiitti, osteomyeliitti ja virtsatietulehdus ovat tyypillisiä biofilmien aiheuttamia nopeasti eteneviä tulehduksia (Venkatesan ja muut 2015).

Biofilmeille tyypillistä on myös ryhmäviestintä (eng. quorum sensing). Ryhmäviestintä on solujen välistä kommunikointia, jossa muun muassa geenien ilmentämistä synkronoidaan populaation sisällä. Geenien ilmentämiseen vaikuttaa populaation solujen tiheys. Joillakin bakteerilajeilla ryhmäviestintä aikaansaa biofilmin muodostuksen solupopulaation ollessa tarpeeksi suuri. Tutkimuksissa on kuitenkin havaittu, että useilla eri bakteerilajeilla ryhmäviestintä ilmenee vasta jo muodostuneessa biofilmissä. Tässä tapauksessa se vaikuttaa biofilmin maturaatioon ja biofilmin hajotukseen. (Solano ja muut 2014.)

Biofilmeistä voi myös olla hyötyä. Ne kuuluvat normaaliin mikrobiomiin ihmisillä, eläimillä ja kasveilla. Biofilmejä voidaan myös hyödyntää esimerkiksi vedenpuhdistuslaitoksissa. (Yan ja Bassler 2019). Biofilmejä hyödynnetään tai voitaisiin hyödyntää esimerkiksi biologisina suodattimina, bioremediaatiossa, maanviljelyksessä ja elintarviketeollisuudessa. (Ünal Turhan ja muut 2019.)

Tulevaisuudessa biofilmejä vastaan voidaan mahdollisesti taistella nanopartikkeleilla. Monet nanopartikkeleihin perustuvat hoitomuodot keskittyvät suun biofilmeihin ja niiden inhiboimiseen, mutta niitä voitaisiin mahdollisesti käyttää myös teollisuutta vaivaavien biofilmien torjuntaan. Nanopartikkeleita voidaan käyttää suoraan antimikrobiaalisina tai käyttää niitä parantamaan lääkeaineiden liukoisuutta. Niillä voidaan myös suojata lääkeaineita ympäristön entsyymeiltä ja pH:n muutoksilta. Ominaisuuksien parantaminen nanopartikkeleilla voi siis parantaa hoidon tehokkuutta ja tarkkuutta. (Benoit ja muut 2019.)

1.4 Luonnollinen kompetenssi ja transformaatio

A actinomycetemcomitans on yksi monista bakteerilajeista, jotka kykenevät luonnolliseen transformaatioon. Luonnollinen transformaatio tekee patogeenisista bakteereista huomattavasti haastavampia tuhota ja torjua niiden populaatioissa tapahtuvan suuren geneettisen vaihtelun vuoksi.

Luonnollisen kompetenssin löysi Frederick Griffith vuonna 1928. Hän tutki tyypin II ja tyypin III *Pneumococcus*-bakteereita hiirillä. Hän injektoi hiiriin kuolleita tyypin III patogeenisia *Pneumococcus*-soluja, sekä eläviä tyypin II ei-

patogeenisia soluja. Ei-patogeeniset solut muuttuivat patogeenisiksi ottaessaan DNA:ta kuolleilta tyypin III patogeenisilta soluilta. (Avery ja muut 1944.)

Luonnollista kompetenssia vaaditaan luonnollisen transformaation mahdollistamiseksi. Luonnollinen kompetenssi on solun kyky ottaa vastaan vierasta DNA:ta ja liittää se omaan genomiinsa. Esimerkiksi jotkut syanobakteerit ovat luonnollisesti kompetentteja ja monilla on potentiaalia tulla kompetenteiksi. (Schirmacher ja muut 2020). Solun ulkopuolisen DNA:n vastaanottaminen mahdollistaa geneettisen variaation populaation sisällä ja täten esimerkiksi edesauttaa solujen selviämistä epäsuotuisissa ja huonoravinteisissa olosuhteissa ja ympäristöissä (Ahlstrand ja muut 2018.)

Luonnollinen kompetenssi on melko yleistä *A. actinomycetemcomitans* -kannoissa. Kaikilla tunnetuilla luonnollisesti kompetenteilla soluilla (paitsi *Helicobacter pylori*lla) DNA:n solun sisään ottaminen alkaa tyypin IV pilusten välityksellä, joilla on myös useita muita tehtäviä. Tyypin IV pilukset koostuvat suurista ja pienistä piliineistä (eng. major/minor pilin). Nämä piliinit toimivat eri tehtävissä, mutta niissä on myös päällekkäisyyksiä. Tyypin IV pilus koostuu pääosin suurista piliineistä. Pienet piliinit ovat monipuolisempia ja vaikuttavat esimerkiksi piluksen oikeanlaiseen muodostumiseen ja kiinnittymiseen. DNA:n sitoutumista pilukseen ei tunneta kovin tarkasti. Ei tiedetä, sitoutuuko DNA suuriin vai pieniin piliineihin, eikä tarkkaa sitoutumiskohtaa piluksessa. (Schirmacher ja muut 2020.)

Nykyään terveydenhuollossa suurta huolta aiheuttaa antibioottiresistenssi eri patogeeneillä. Antibioottiresistenssi patogeeneillä voi aiheuttaa niinkutsuttuja sairaalabakteeriepidemioita. Antibioottiresistenssi voi muodostua patogeenille horisontaalisen geeninsiirron (HGS) seurauksena. Luonnollinen transformaatio solunulkoisesta DNA:sta, transduktio bakteriofagien toimesta ja konjugaatio plasmidivälitteisesti voivat kaikki sallia geenien siirtymisen solukantojen ja lajien välillä. HGS on tärkeää ottaa huomioon epidemiaa/pandemiaa tutkittaessa. Yksittäisen patogeenin antibioottiresistenssi voi siirtyä useille muille patogeeneille, jotka eivät ole mitään sukua resistentille bakteerille. Tällä hetkellä mikrobilääkeresistentit patogeenit aiheuttavat ainakin 700 000 kuolemaa vuodessa. Seuraavan 30 vuoden aikana resistenttien patogeenien on ennustettu aiheuttavan kymmenen miljoonan ihmisen kuoleman vuodessa. (Lerminiaux ja Cameron 2019.)

1.4.1 HofQ-proteiini

HofQ on proteiini, jonka on havaittu osallistuvan DNA:n siirtymiseen *A. actinomycetemcomitans*iin luonnollisen transformaation yhteydessä. HofQ:n ilmentymisen havaittiin lisääntyvän kasvatettaessa *A. actinomycetemcomitans*ia vähäravinteisemmassa mediumissa. (Ahlstrand ja muut 2018).

HofQ-proteiinin ulkomembraanin domeenin (eng. extramembranous domain of HofQ, emHofQ) on havaittu vuorovaikuttavan useiden eri sytokiinien kanssa. Interleukiini-8:n kanssa vuorovaikutus oli voimakkainta. Sitoutumisaffiniteetti (43 nM) viittaa siihen, että emHofQ tunnistaa sytokiinin ennen sen kuljettamista solun sisälle. (Ahlstrand ja muut 2018).

*A. actinomycetemcomitans*in ilmentämän HofQ-proteiinin homologeja löytyy myös muista organismeista. Neisseria meningitidis -bakteerin HofQ:ta vastaava proteiini tunnetaan nimellä PilQ (NmPilQ). PilQ sitoo IL-8:aa ja TNF-α ja vaikuttaa tyypin IV pilusten valmistukseen. *A. actinomycetemcomitans*in HofQ-proteiini on nimetty *Escherichia coli*sta löytyvän homologin mukaan, jonka nimi on myös HofQ. *E. coli*n HofQ tunnetaan myös nimellä ComE, sillä se löytyy comABCD-lokuksesta alavirtaan. (Ahlstrand ja muut 2018).

HofQ:n huomattiin vaikuttavan *A. actinomycetemcomitans*in biofilmin muodostukseen, sekä antimikrobiaaliseen resistenssiin. *A. actinomycetemcomitans*in villityyppi on luonnostaan kohtalaisen resistentti ampisilliinille. Geenin hofQ deleetion on havaittu vähentävän organismin resistenssiä ampisilliinille, sekä sen kykyä muodostaa biofilmiä. *A. actinomycetemcomitans*in alttius amoksisilliini-klavulaanihappolle myös lisääntyi deleetion myötä. (Ahlstrand ja muut 2018.)

1.5 BilRI

BilRI (bacterial interleukin receptor 1) on proteiini, jota ilmennetään *A. actinomycetemcomitans*in ulkoisella membraanilla. BilRI löydettiin 2013, kun havaittiin Interleukiini-1β:aa sitova proteiini. Samankaltainen proteiini löytyy useista *Pasteurellacae* -lajin bakteereista. Proteiinin toimintaa ennustavat työkalut kertoivat proteiinin olevan ulkomembraanin proteiini. BilRI:n sekvenssi on lipoproteiineille tyypillinen. (Paino ja ja muut 2013.)

BilRI-proteiinia on tutkittu kovin vähän. Suurin osa julkaistuista tutkimusartikkeleista on tullut R. Ihalinin ryhmästä Turun yliopistolta. BilRI:n kaltaisia muita proteiineja on tutkittu. Suurin osa näistä on kasviperäisiä.

BilRI:n tehtävää bakteereissa ei tunneta hyvin, mutta BilRI:n on havaittu vaikuttavan luonnollisen transformaation tehokkuuteen, sekä lämpötilan vaikuttavan *bilRI*-promoottorin aktiivisuuteen. Promoottorin aktiivisuuden on havaittu olevan suurempi 27 ℃ lämpötilassa, kuin 37 ℃ lämpötilassa, joka on *A. actinomycetemcomitans*in optimaalinen kasvulämpötila. Lämpötilan laskeminen vielä alempaan lämpötilaan (17 ℃) ei lisännyt *bilRI*-promoottorin aktiivisuutta merkittävän paljon. BilRI:llä saattaa olla kuitenkin vaikutusta *A. actinomycetemcomitans*in selviytymiseen isännästä toiseen siirtymisessä (tartunnassa). BilRI:n ilmentymistä eri lämpötiloissa tutkittiin punaisella fluoresoivalla *dsred-M1* -geenillä. Kokeessa tutkittiin promoottorialueen aktiivisuutta vaihtamalla *bilRI*-geenin tilalle *dsred-M1* -geeni, mutta säilyttämällä *bilRI*:n promoottorialue. Geeni siirrettiin *A. actinomycetemcomitans*iin luonnollisella transformaatiolla. (Maula ja muut 2021.)

*A. actinomycetemcomitans*in luonnollisen transformaatiokyvyn, jossa se ottaa sisäänsä solun ulkopuolista DNA:ta, on havaittu häiriintyneen *ΔbilRI*-mutantissa (*bilRI*-geeni poistettu). Tähän saattaa vaikuttaa se, että *bilRI*-geeni sijaitsee lähellä transformaatioon vaadittavia geenejä. (Maula ja muut 2021.)

1.5.1 BilRI ja immuunivaste

A. actinomycetemcomitans sitoo eri interleukiineja (IL). Sen LPS sitoo IL-8:aa ja BilRI-proteiini interleukiini-1β:aa solun ulkomembraanilla (Maula ja muut 2021).

Interleukiinit ovat sytokiineihin kuuluva ryhmä proteiineja. Sytokiinien tehtävä on osallistua immuunipuolustukseen esimerkiksi vaikuttamalla immuunisolujen erilaistumiseen ja aktivoitumiseen. Interleukiineilla voi olla inflammatorisia ja anti-inflammatorisia vaikutuksia. IL:ien tutkimista vaikeuttaa niiden jatkuva nopea evoluutio. Nopea evoluutio johtuu niiden jatkuvasta kilpailusta taudinaiheuttajia vastaan. Tämän seurauksena interleukiineissa on vähän konservatiivisia aminohappoja. Interleukiinit toimivat sitoutumalla solun pinnan reseptoreihin korkealla affiniteetilla. (Brocker ja muut 2010.)

BilRI ei vaikuta ihmisen immuunisolujen ja *A. actinomycetemcomitans*in väliseen vuorovaikutukseen. BilRI itsessään ei aiheuta vasta-aineiden tuotantoa potilaissa. Rekombinantti-BilRI ei myöskään aiheuttanut IL-6:n tuotantoa ihmisen THP-1 makrofageissa, mutta *A. actinomycetemcomitans*in LPS aiheutti korkean IL-6-vasteen. BilRI:n ei ole myöskään havaittu indusoivan reaktiivisten happilajien (Reactive oxygen species, ROS) tuotantoa leukosyyteissä. BilRI:llä ei myöskään ole juurikaan vaikutusta *A. actinomycetemcomitans*in antibioottiherkkyyteen, kun verrataan villityyppiä *ΔbilRI*-mutanttiin. Kuivien olosuhteiden ei havaittu vaikuttavan BilRI:n ilmentymiseen. (Maula ja muut 2021.)

1.6 LEA-Proteiinit

Tutkimamme BilRI-proteiinin on havaittu muistuttavan vahvasti ”late embryogenesis abundant” (LEA) -proteiiniperheen proteiineja. LEA-proteiinit auttavat organismin stressinsiedossa esimerkiksi kylmemmissä olosuhteissa ja suojelevat proteiineja aggregaatiolta. Monilla LEA-proteiineilla ei ole selkeää kolmiulotteista rakennetta, vaan ne ovat niin kutsuttuja rakenteettomia proteiineja (eng. intrinsically disordered proteins, IDPs), jotka ovat usein erittäin hydrofiilisiä. (Maula ja muut 2021.)

LEA-perheeseen kuuluvia proteiineja on löydetty arkeista, bakteereista ja eukaryooteista. Tunnetut bakteereissa esiintyvät LEA-proteiinit kuuluvat LEA_2, LEA_4 ja LEA_5- ryhmiin. BilRI:n sekvenssi muistuttaa enemmän bakteereiden ilmentämiä muiden LEA-proteiinien sekvenssejä, kuin kasvien ilmentämien LEA-proteiinien sekvenssejä. (Maula ja muut 2021.)

LEA-proteiineja on tutkittu eniten kasveissa. Kasveissa niitä kerääntyy siemenen kypsymisen loppuvaiheilla, sekä veden puutteessa vegetatiivisissa elimissä. (Battaglia ja Covarrubias 2013.) LEA-proteiinien on havaittu, erityisesti kasveissa, kuten *Arabidobsis thaliana*ssa, suojelevan useita solukomponentteja kasvin kohdatessa stressiä. Jotkin LEA-proteiinit esimerkiksi sitoutuvat suoraan kohdeproteiiniinsa ja toimivat kaperonin kaltaisella tavalla. LEA-proteiinien on myös havaittu säätelevän kohdeproteiiniensa toimintaa ja tällä tavalla vaikuttavan solun homeostaasiin. Tämä vaikuttaa solun stressin säätelyyn. (Dirk ja muut 2020). Suurin osa LEA-proteiineista on hydrofiilisiä ja sijaitsee sekä solun tumassa että sytoplasmassa (Wang ja muut 2023). LEA-

proteiinit saattavat myös kohdeproteiininsa suojelemisen sijaan avustaa niiden hajottamisessa. On havaittu tapauksia, jossa LEA-proteiinit sitoutuvat muihin proteiineihin myös stressin/rasituksen ulkopuolella. (Dirk ja muut 2020.)

LEA-proteiinien toimintaa ei tunneta täysin. Organismit voivat erittää LEA-proteiineja rasituksen alaisena. Yhden teorian mukaan ne toimivat erottamalla fyysisesti solun osia toisistaan solun kärsiessä kuivuudesta. Toisen teorian mukaan fyysisenä esteenä toimimisen lisäksi ne voivat sitoutua suojeltaviin proteiineihin ja täten lisätä niiden vakautta. Tutkimuksessa, jossa LEA-proteiineja tutkittiin pakkasesta otetussa sulavassa liuoksessa, havaittiin, että LEA-proteiinit hakeutuvat vesi-ilma-faasin rajalle ja pakottavat muut proteiinit sijaitsemaan kosteammassa ympäristössä. Tämä suojelee muita proteiineja. (Dirk ja muut 2020). Jotkin LEA_4-luokan proteiinit vaikuttavat bakteereissa abioottisen stressin säätelyyn. *Deinococcus radiodurans*in ilmentämä proteiini DrLEA3, joka on LEA_3-luokan proteiini, auttaa organismia kuivuuden ja hapettumisen sietämisessä. (Maula ja muut 2021.)

LEA-proteiinit ovat mahdollinen kohde geenien muokkaamiselle kasveissa. Tämä mahdollistaisi kasvien kuivuuden kestävyyden varmistamisen ja turvaisi viljelykasvien tuottoa kuivina kausina. Maississa *ZmNHL*$_1$ -geeni toimii kuivuusrasitukseen vastaavana geeninä. Kudosspesifi analyysi on osoittanut, että *ZmNHL*$_1$:tä ilmentyy eniten maissin heteessä ja kohtalaisen paljon varressa ja lehdissä. Geeniä ilmentyy vain vähän juurissa ja siitepölyssä. *ZmNHL*$_1$:en on tutkimuksissa havaittu poistavan reaktiivisia happilajeja solukosta sekä ylläpitävän solukalvon läpäisevyyttä. Geeni voidaan siirtää kasviin, jolta geeni puuttuu. Tutkimuksessa villityypin (sisäsiittoinen B104-linjan maissi) kuivuuden kestävyyttä pystyttiin lisäämään siirtämällä siihen *ZmNHL*$_1$-geeni. (Wang ja muut 2023.)

1.7 Western Blot

Western blottaus on tärkeä metodi proteiinien immunologiseen havaitsemiseen näytteessä. Se soveltuu erityisesti näytteille, joissa on pieni määrä tutkittavaa proteiinia. Prosessissa siirretään proteiinikuviot geeliltä huokoiselle membraanille. Elektronista (elektroforeesilla toimivaa) ja ei-elektronista metodia on käytetty jo vuodesta 1979. Tyypillisesti proteiinit ajetaan SDS-PAGE-geelille

(sodium dodecyl sulfate-polyarcylamide gel electrophoresis), jonka jälkeen ne siirretään adsorboivalle membraanille sähkövirran avulla. Tätä kutsutaan elektroblottaukseksi. Elektroblottauksesta käytetään kahta eri tapaa: märkä (eng. wet transfer) ja puolikuiva (eng. semi-dry transfer). (Kurien ja Scofield 2015.)

Näytteen valmisteleminen on erityisen tärkeää Western blottauksessa. Soluseinä hajotetaan proteiinien vapauttamiseksi. Oikeanlainen lyysispuskuri on tärkeä, sillä se mahdollistaa proteiinin liukoisuuden ja estää proteiinin hajoamisen. Nämä toimenpiteet tehdään ennen SDS-PAGE-ajoa. (Mishra ja muut 2017.)

Western blottausta voidaan nykyään hyödyntää useilla eri tavoilla, kuten analysoimalla proteiinien post-translationaalisia modifikaatioita, suhteellista määrää ja -massaa, sekä proteiinien välisiä vuorovaikutuksia. Metodia voidaan soveltaa akateemisen tutkimuksen lisäksi diagnostiikassa sekä lääketutkimuksessa. Kvantitatiivista western blottia tutkitaan ja kehitellään paraikaa. (Pillai-Kastoori ja muut 2020.)

1.8 Virtaussytometria

Virtaussytometria on teknologia, jolla pystytään nopeasti analysoimaan yksittäisiä soluja nesteestä. Tekniikalla voidaan lasereiden avulla mitata useita eri parametrejä näytteen soluista nopeasti. Laservaloja tarvitaan valon hajaantumisen ja esimerkiksi solujen fluoresenssin mittaamista varten. Datan kerää ja käsittelee tietokone. (McKinnon 2018.)

Tyypillisesti virtaussytometriaa käytetään yksittäisten solujen analyysiin (eng. single cell analysis, SCA), jossa muun muassa ilmennettyjen pintamarkkereiden, granulaarisuuden, koon ja leima-aineiden perusteella solut voidaan erotella toisistaan näytteessä. Näytteet siis voidaan erotella usealla eri parametrilla samaan aikaan ja yksittäisiä soluja on mahdollista analysoida. Tyypillisesti solususpensio värjätään tai leimataan vasta-aineilla ennen analyysiä. (Flynn ja Gorry 2019.)

SCA:n avulla voidaan tutkia soluja esimerkiksi fenotyyppisellä, genomisella ja proteomisella tasolla. SCA:ta voidaan hyödyntää esimerkiksi lääketutkimuksen tehostamisessa, sillä esimerkiksi syöpäsolujen torjunnassa

yksittäisen solujen väliset erot vaikeuttavat tarkan hoitomuodon kehittämistä. SCA:n avulla voidaan saada lisää tietoa hoitomuodon tehokkuudesta. (Song ja muut 2017.)

Näytteen leimaustapoja on useita. Esimerkiksi fluoresenssileimaus voidaan tehdä ilmentämällä fluoresoivaa proteiinia, kuten GFP:tä (eng. green fluorescent protein), käyttämällä fluoresoivaa väriainetta (esimerkiksi PI, eng. propidium iodide) tai leimaamalla näyte vasta-aineella, jossa on fluoresoiva konjugaatti. Massasytometriassa, joka on teknologia, jossa yhdistetään virtaussytometria ja time of flight -massaspektrometria, hyödynnetään raskasmetalleja. (McKinnon 2018.)

Näytteen leimaaminen voidaan joissain tapauksissa myös jättää pois. Verenkierrossa etenevien kasvainsoluryppäiden (eng. circulating tumor cell clusters, CTCCs) havaitsemista verenkierrosta on tutkittu leimattomalla metodilla. CTCC:t ovat harvinaisia, mutta ne nostavat riskiä metastaasin muodostumiseen. Niiden havaitsemista on tutkittu BSFC:llä (backscatter and fluorescence flow cytometry), jolla seulottiin kokoverta koneoppimista hyödyntäen. (Vora ja muut 2022.)

Virtaussytometreja on useita erilaisia, esimerkiksi: perinteinen virtaussytometri, Acoustic focusing cytometer, solusortteri, kuvantava sytometri ja massasytometri. Yksittäisiä soluja voidaan kerätä ja puhdistaa jatkotutkimuksia varten solusorttauksella. Solusortteri (eng. cell sorter) muodostaa näytenesteestä pisaroita, joita voidaan erotella asetettujen parametrien perusteella. (McKinnon 2018.) Eräs suosittu menetelmä solujen seulomiseen näytteestä on fluoresenssiaktivoitu solusorttaus (eng. fluorescence-activated cell sorting, FACS), jossa virtaussytometri tunnistaa solujen fenotyypit ja lajittelee ne automaattisesti fraktioihin (Liao ja muut 2016).

Tulevaisuudessa on luvassa paljon kehitystä virtaussytometriaan. Polykrominen virtaussytometria (eng. polychromic flow cytometry) on tekniikka, jota on käytetty jo 45 vuotta. Nykyään käytössä oleva virtaussytometria teknologia on nimeltään spektraali-virtaussytometria, jonka ennustetaan kehittyvän seuraavaan sukupolveen jo muutaman vuoden sisällä. Tulevat ominaisuudet tuovat uusia mahdollisuuksia molekyylidiagnostiikan ja fysiologian virtaussytometrisiin tutkimuksiin. Spektraali-virtaussytometrilla voidaan esimerkiksi mitata 32-kanavaisen detektorin avulla jokaisen solun koko spektri. (Robinson 2022.)

2. Työn tavoitteet

Työn tavoitteena oli tutkia *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* -bakteerin tuottamaa proteiinia nimeltään ”bacterial interleukin receptor 1” (BilRI). BilRI-proteiinin ilmentymistä on tutkittu aiemmin DsRed-proteiinin avulla, mutta tässä tutkimuksessa haluttiin tarkempaa tietoa BilRI-proteiinin ilmentymisestä. DsRed on fluoresoiva punainen proteiini, jonka avulla voidaan seurata esimerkiksi proteiinin ilmentymistä, kun DsRed on saman promoottorin alla kuin tutkittava proteiini.

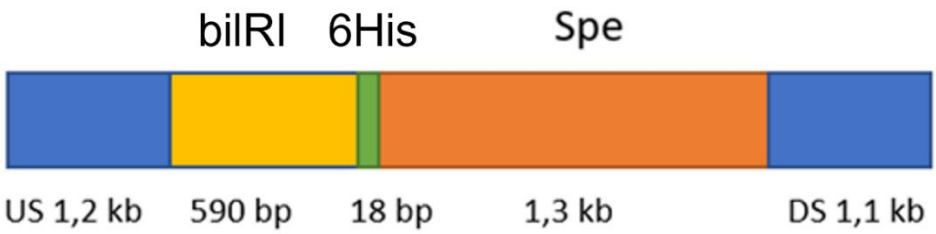
Tarkoituksena oli luonnollista transformaatiota käyttäen siirtää *A. actinomycetemcomitans*iin bilRI_6His_Spe-geeni. BilRI-proteiinin ilmentymisen tutkimista varten oli tarkoituksena kehittää uusi menetelmä, jossa siirretty geeni sisältäisi histidiinihäntää koodaavan nukleotidisekvenssin. BilRI:ssä oleva histidiinihäntä voitaisiin leimata ja havaita. Tällä tavalla BilRI:n ilmentymistä solupopulaatiossa voitaisiin seurata.

Haluttiin siis seurata, kuinka suuri osa bakteereista biofilmipopulaatiossa ilmentää BilRI:ä. BilRI:n ilmentyminen *A. actinomycetemcomitans*-populaatiossa – ja ylipäätään bakteeripopulaatiossa on huonosti tunnettu. Tämän kaltaisten proteiinien parempi tuntemus auttaisi varmasti esimerkiksi biofilmiä muodostavien patogeenien torjunnassa ja potilaiden hoidossa. LEA-tyyppisten proteiinien toiminta bakteereissa tunnetaan myös huonosti. Tiedon lisääntyminen niiden käyttäytymisestä bakteereissa auttaisi ymmärtämään monien bakteerien toimintaa ja jopa LEA-tyyppisten proteiinien evolutiivista merkitystä näitä proteiineja ilmentävillä bakteereilla.

3. Materiaalit ja menetelmät

3.1. DNA-konstruktin tekeminen

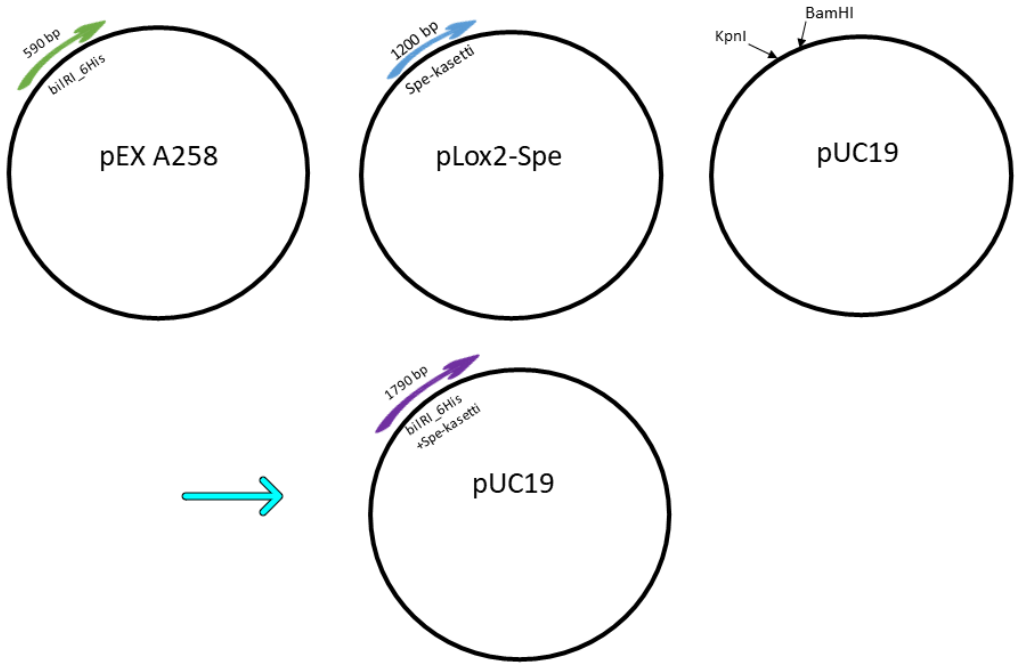
Geeni bilRI_6His (kuva 1), eristettiin pEX-A258 plasmidista (syntetisoitu geeni, tilattiin Eurofins Genomicsista, Saksasta) ja siirrettiin defosforyloituun pUC19-vektoriin spektinomysiini-kasetin (pLox, spektinomysiiniresistenssi) lisäksi.



Kuva 1. Lineaarinen DNA bilRI_6His_Spe, joka siirrettiin *A. actinomycetemcomitans*in kromosomistoon. DNA-kasetti sisältää spektinomysiiniresistenssin sekä BilRI:n, jonka mukana ilmentyy 6 histidiiniä pitkä häntä. Proteiinin N-terminus sisältää lipidiosan (lipidiosaa ei konstruktissa), jonka avulla proteiini kiinnittyy ulkokalvoon. C-terminus histidiinihäntineen sijaitsee solun pinnasta ulospäin. Lyhenne US tarkoittaa ylävirtaan (eng. upstream) ja DS alavirtaan (eng. downstream).

Plasmidi pEX-258 siirrettiin XL1 Blue -kantaiseen *Escherichia coli*in. Plasmidi-DNA eristettiin XL1 Blue -*E. Coli*:sta ja DNA:n määrä mitattiin Nanodropilla (Nanodrop one, Thermo Scientific). Spketinomysiiniresistenssigeeni eristettiin pLox 2-Spe -plasmidista SalI- ja BamHI-restriktioentsyymeillä ja tilattu bilRI_6His -geeni digestoitiin KpnI- ja SalI-restriktioentsyymeillä.

Geenit siirrettiin defosforyloituun pUC 19-plasmidiin, joka oli digestoitu KpnI- ja BamHI-restriktioentsyymeillä (kuva 2). Transformaatio suoritettiin *E. Coli* XL1 Blue -soluille elektroporaatiolla (1250 V 5 ms, BTX Harvard Apparatus ECM 399 electroporation system).



Kuva 2. Tilattu plasmidi pEX A258 sisälsi bilRI_6His-geenin. Spe-kasetti oli pLox2-Spe-vektorissa. Spe-kasetti sisälsi spektinomysiiniresistenssin. Restriktioentsyymeillä leikattiin sekä bilRI_6His-geeni pEX A258:sta että Spe-kasetti pLox2-Spe:stä. Spe-kasetti ligatoitiin yhdessä bilRI_6His-geenin kanssa defosforyloituun pUC19-plasmidiin.

Elektroporaation jälkeen soluille lisättiin välittömästi 500 µl huoneenlämpöistä, ravinteikasta SOC-mediumia ja solut siirrettiin ravisteluun (+37 ℃ 1 h) solujen elpymiseksi. Solut sentrifugoitiin 3000 rpm huoneenlämmössä ja supernatantti poistettiin solususpension rikastamiseksi. Solut maljattiin LA-Amp-maljoille, joihin lisättiin 20 µl spektinomysiiniä. Maljoista tehtiin esikasvatukset ja plasmidin eristys, sekä yksi malja kolmella sektorilla. Tarkastusdigestio tehtiin kahdella restriktioentsyymillä/insertti: Kpn1 + Sal1 (bilRI, 590 bp) ja Sal1 + BamH1 (Spe-kasetti, 1200–1300 bp), ja ajettiin 1% agaroosigeelille.

A. actinomycetemcomitans D7S -kannasta monistettiin bilRI-ylävirtaan ja -alavirtaan DNA:t PCR-reaktiolla, jotta saadaan DNA:ta, jonka voi ligatoida bilri_6His_Spe:n kanssa. Ajettiin PCR-reaktio bilRI-ylävirta (alukkeilla pbilRI_FD_XhoI ja PhoGlu-R) ja bilRI-alavirta (alukkeilla ycgL-FD_1 ja bilRI_RD_BamHI). PCR-laitteena käytettiin Agilent Technologies SureCycler 8800 -PCR-laitetta. Konsentraatiot ja tilavuudet on mainittu taulukossa 1 ja käytetyn PCR-ohjelman tiedot taulukossa 2.

Taulukko 1. PCR:ssä käytetyt ainekset ja niiden konsentraatiot/tilavuudet. PCR:ää käytettiin bilRI-ylävirtaan ja -alavirtaan geenien monistamiseen.

Aines	**Konsentraatio/tilavuus**
5 x Phusion HF Buffer	5 µg
***Aa* genominen DNA**	50 ng
dNTP mix	0,2 mM
Forward primer (pbilRI_FD_XhoI/ycgL-FD_1)	0,5 mM
Reverse primer (PhoGlu-R/bilRI_RD_BamHI)	0,5 mM
Phusion Polymerase	0,5 µl
MQ-vesi	25 µl asti
Kokonaistilavuus	25 µl

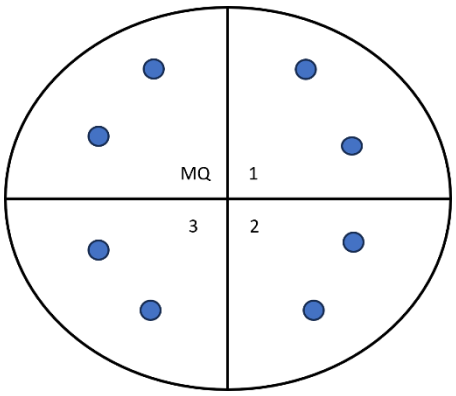
Taulukko 2. PCR-ohjelmassa käytetyt lämpötilat ja syklin kesto kyseisessä lämpötilassa. Varsinainen PCR-reaktio toistettiin 32 sykliä. Lyhenteet US ja DS tarkoittavat ylävirtaan (eng. upstream) ja alavirtaan (eng. downstream). Ohjelman lopuksi 4 °C lämpötilaa käytettiin laitteessa säilytykseen, kunnes näytteet kerättiin laitteesta (SureCycler 8800, Agilent Tehcnologies).

Lämpötila	Aika	
98 °C	30 s	
98 °C	10 s	X 32
56 °C (US) / 61 °C (DS)	30 s	
72 °C	20 s	
72 °C	8 min	
4 °C	→	

PCR-tuotteet digestoitiin: 2 µg plasmidi DNA, 10 x fast digest buffer, MunI, BamHI, reaktiotilavuus 40 µl. Digestiotuotteet ajettiin agaroosigeelille (1%) ja eristettiin geeliltä (GeneJet Gel Extraction kit, Thermo Fisher). Digestiotuotteet ligatoitiin bilRI_6His_Spe DNA:n kanssa: 130 ng bilRI-ylävirtaan, 130 ng bilRI-alavirtaan, 130 ng bilRI_6His_Spe, 10x ligaatiopuskuri, ligaasi, MQ-vesi. Inkuboitiin 4 h huoneenlämmössä (RT) ja inaktivoitiin entsyymi 10 min 65

3.2 Luonnollinen transformaatio

Tehtiin kasvatukset luonnollista transformaatiota varten (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* D7S wt) TSA-HS-maljoilla (Tryptone Soya broth Agar - Horse Serum). Soluja kasvatettiin kolme vuorokautta. Soluja kerättiin 3 ml:aan mTSB:tä (modified tryptone soya broth) ja mitattiin OD_{600}. Solu ottaa DNA:n vastaan luonnollisesti. Soluihin siis siirrettiin pUC19-plasmidia, joka sisälsi bilRI_6His ja Spe-kasetti-geenit. Kasvatukset tapahtuivat astiassa, josta poistettiin happi/lisättiin hiilidioksidia kynttilällä +37 ℃. Luonnollinen transformaatio suoritettiin TSA-HS-maljoilla eri olosuhteissa: 1. 2,5 ng/µl DNA:n lisäksi 1 mM $CaCl_2$, 2. 10 ng/ml IL-8, 3. 1 mM $CaCl_2$ + 10 ng/ml IL-8 sektoreissa (kuva 3). DNA:ta lisättiin 10 µl:aa jokaisen spotin (pieni alue, pisara, jossa soluja) päälle. Spoteissa oli 10,3 µl soluja (2 x 10^7 solua). Maljat jaettiin neljään sektoriin. Nämä eri olosuhteet olivat näillä sektoreilla, samalla maljalla. Neljäs sektori oli negatiivinen kontrolli, johon lisättiin DNA:n sijaan vain steriiliä MQ-vettä. Transformaation annettiin tapahtua 5 h + 37 ℃ vähähappisissa olosuhteissa. Transformaation tapahtumista tutkittiin laskemalla pesäkkeiden määrää TSA-HS-maljoilta. Solut kerättiin maljoilta raaputtamalla pesäkkeitä loopilla. Kerätyistä soluista tehtiin 150 µl suspensio, joka jaettiin kahdelle selektiiviselle maljalle kasvamaan neljän vuorokauden ajaksi.



Kuva 3. Luonnollinen transformaatio tehtiin TSA-HS-sektorimaljoilla. Jokaisella sektorilla oli eri olosuhteet: 1. 2,5 ng/µl DNA:n lisäksi 1 mM CaCl2, 2. 10 ng/ml IL-8, 3. 1 mM CaCl2 + 10 ng/ml IL-8. Neljäs sektori (MQ) sisälsi vain vettä DNA:n lisäksi ja toimi negatiivisena kontrollina. Kuvan siniset ympyrät kuvaavat spotteja. Transformaation annettiin tapahtua 5 h +37 °C vähähappisissa oloissa.

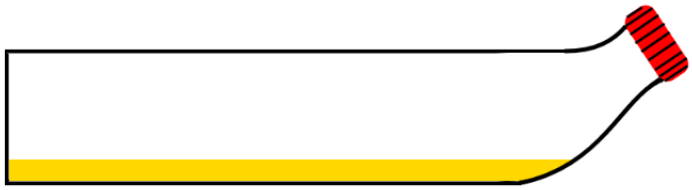
3.3 Pesäke-PCR

Luonnollisen transformaation onnistumista tutkittiin pesäke-PCR:llä. PCR-ajoa varten valmistettiin proteinaasi-K-laimennos, josta tehtiin working solution. Laimennos: 1,2 U proteinaasi-K, 5 mM Tris pH 7,5, 100 % glyserolia ½ v/v. Working solution: 55 µl proteinaasi-K-laimennosta, 1045 µl TE-puskuria. Pesäkkeet kerättiin maljalta ja lisättiin working solutionin sekaan (100 µl). Näytteitä inkuboitiin 50 °C 1 h, jonka jälkeen 95 °C 1 min. PCR-ohjelman komponentit: 10x Taq buffer $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 mM dNTP mix, 1,2 mM Forw.- ja Rev.-alukkeita, 3 mM $MgCl_2$, DNA, Taq-polymeraasi. Käytetyt alukkeet: OM_BilRI (560 bp) ja BilRI_Nest (3 kb). PCR-ohjelma: 1. alkudenaturaatio 95°C 3 min, 2. denaturaatio 95 °C 1 min, 3. sitoutuminen 50–52 °C (OM aluke 50 °C ja Nest 52 °C) 30 s, 4. elongaatio 72 °C 5 min, 5. viimeinen elongaatio 72 °C 8 min → varastointi 4 °C. Vaiheet 2–4 toistettiin 35 kertaa. PCR-tulokset tarkastettiin agaroosigeelielektroforeesilla (1 % geeli).

3.4 Biofilmikasvatus

A. actinomycetemcomitans -soluja kasvatettiin biofilmeissä solukasvatuspulloissa (kuva 4). Biofilmikasvatukset tehtiin BilRI:n tutkimista varten, sillä *A. actinomycetemcomitans* -populaatio esiintyy luonnossa biofilmeissä. Solut kerättiin verimaljoilta putkiin, joissa oli 1 ml mTSB-mediumia (modified tryptone soya broth). Solut liiskattiin putken kylkeen huolellisesti, jotta solut eivät aggregoidu mediumissa. Mediumista mitattiin OD_{600} -arvo solumäärän mittaamiseksi. OD_{600} 1 vastaa solumäärää 1 x 10^9 s/ml. Haluttu solumäärä biofilmikasvatukseen oli 1,2 x 10^8 s/ml. Lopullinen tilavuus solukasvatuspullossa oli 5 ml.

Kun oikea solumäärä oli lisätty solukasvatuspulloon mTSB-mediumin ja spektinomysiinin lisäksi, pullot laitettiin kynttiläpurkkiin ja kasvatettiin 8 h + 37 ℃, jonka jälkeen ne siirrettiin neljäksi vuorokaudeksi + 27 ℃ kasvamaan. Pulloja pidettiin kyljellään, jolloin ne pystyivät helposti muodostamaan biofilmiä pullon pohjaan. Kasvatetut solut kerättiin raapimalla biofilmiä muovisella silmukalla ja huuhtomalla pullon kylkeä mediumilla pipetin avulla.



Kuva 4. Solukasvatuspullo. Soluja kasvatettiin 5 ml:n tilavuudessa solukonsentraatiossa 1,2 x 108 s/ml (solua/millilitra). Kasvatus tapahtui ensin kahdeksan tuntia + 37 ° C kynttiläpurkissa, jonka jälkeen soluja kasvatettiin neljä vuorokautta + 27 °C. Pulloja pidettiin kyljellään, jotta solut muodostavat biofilmin pullon pohjaan.

3.5 Western blot

Geenin (bilRI_6His_Spe) oikeanlaista ilmentymistä tutkittiin SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis) -geelillä proteiinin ilmentymisen varmistamiseksi. Näytteet SDS-PAGEen olivat sonikoimalla hajotetut (4 x 10 s, 10 mikronin amplitudilla, 30 s tauoilla) solunäytteet: bilRI_6His_Spe, WT ja ΔbilRI. Soluja oli kasvatettu ensin 8 h + 37°C, jonka jälkeen loput neljän päivän ajasta +27°C. Geeliä (12 %) ajettiin 120 V jännitteellä noin tunnin.

Histidiinihännän ilmentyminen BilRI:iin kiinnittyneenä tarkastettiin Western blottauksella. Blottaus-membraani ja -paperit uitettiin native page -ajopuskurissa, jonka jälkeen proteiinit siirrostettiin PAGE-geeliltä western-membraanille 90 mA virralla kahden tunnin ajan (Amersham Biosciences TE 77 PWR semi dry transfer). Siirrostettua membraania blokattiin yön yli TBS-T (Tris-buffered saline + Tween) + 2,5 % BSA:ssa (Bovine serum albumin, 50 ml) ravistimessa (50 rpm) + 7 ℃ valolta suojattuna. Blokattu membraani pestiin 3 x 5 min. TBS-T:llä (50 ml, 50 rpm ravistus). Membraanille lisättiin His-probe-HRP:tä (5 mg/ml, Thermo Scitentific) 20 µl 50 ml:ssa TBS-T + 2,5 % BSA:ssa ja jätettiin ravisteluun (50 rpm) kahden tunnin ajaksi. Tämän jälkeen membraani pestiin 4 x 10 min. TBS-T:llä.

Membraanin kuvantaminen tapahtui ECL (Enhanced Chemi Luminesence) -liuoksen vaikuttaessa (BioRad ChemidDoc MP Gel Analyzer 1). ECL-liuosta lisättiin yhteensä 14 ml (7 ml kumpaakin komponenttia) ja inkuboitiin 1 min valolta suojattuna. Näytteenä varsinaisen BilRI-näytteen lisäksi käytettiin

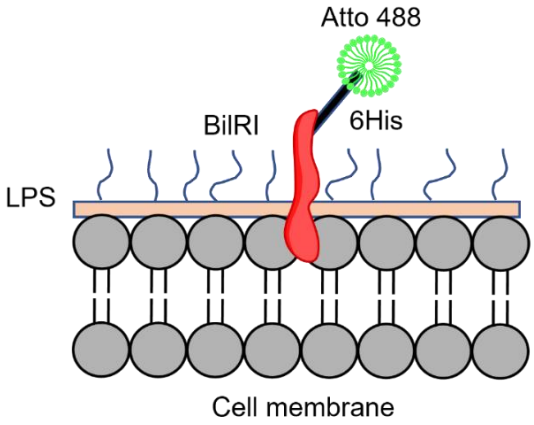
villityyppiä (Aa WT) ja ΔbilRI:ä (bilRI-geeni hiljennetty). Villityyppi ja ΔbilRI toimivat negatiivisina kontrolleina, sillä villityypin tuottama BilRI-proteiini ei sisällä histidiinihäntää ja ΔbilRI ei tuota BilRI-proteiinia.

3.6 Virtaussytometria

Virtaussytometrilla tutkittiin BilRI:ä ilmentävien solujen määrä *A. actinomycetemcomitans* -solupopulaatiossa. Leimavärinä käytettiin NTA-Atto-488-leimaa (Sigma Aldrich). Leimavärin virittyminen tapahtuu 501 nm aallonpituudella ja emissio 523 nm aallonpituudella. Havaittava fluoresenssi on siis vihreän väristä. Leima tarttuu spesifisti histidiinileimattuihin proteiineihin, mikä mahdollistaa tutkittavan proteiinin määrän analysoimisen näytteestä (Kuva 5).

A. actinomycetemcomitans bilRI_6His_Spe-soluja kasvatettiin solukasvatuspulloissa 4 päivää mTSB-mediumissa (ensin 8 h +37 °C, jonka jälkeen loppuaika +27 °C). Mediumi kaadettiin pois solukasvatuspullosta ja soluja pestiin kahdesti 10 ml:lla steriilisuodatettua PBS:ää. Pesun jälkeen solut raavittiin silmukalla irti biofilmistä ja 2,5 ml fiksausliuosta (1 % formaldehydi, 1 % BSA, 0,01 % EDTA, PBS) lisättiin sekä inkuboitiin 2 h +4 °C. Kerätyt kasvatukset yhdistettiin samaan putkeen (villityyppi ja 6His-mutantti omiin putkiinsa) 100 µm nylonsuodattimen läpi. Solususpensiosta mitattiin OD_{600} optimaalisen solumäärän laskemiseksi. Optimaalinen solumäärä oli 2,5 x 10^6 s/ml. Solut lisättiin mikrosentrifuugiputkiin, joissa oli 1 ml PBS-puskuria. Putket sentrifugoitiin 8000 rpm 5 min huoneenlämmössä (@RT). Pelletti suspensoitiin 1 ml:aan PBS-puskuria ja NTA-Atto-488 leimaväriä lisättiin 5 µl. Näytteitä inkuboitiin värin kanssa 30 min @RT. Ylimääräinen väri pestiin kahdesti 1,5 ml:lla 1 x RDF1-puskuria (solupesupuskuri). Pesun jälkeen solut suspensoitiin 1 ml:aan solupesupuskuria.

Solususpensio analysoitiin virtaussytometrilla (Sysmex CyFlow Cube 8). Nollausnäytteenä virtaussytometriassa käytettiin 50 % PBS ja 50 % steriiliä fiksausliuosta (ilman formaldehydiä). Virtaussytometrimittauksessa säädettiin laitteen portteja (eng. gate) havaitsemaan fluoresoivia soluja näytteestä. Portit säädettiin tavalla, joka hylkäisi esimerkiksi klimppiintyneet solut, joita näytteessä väistämättä on, vaikka ne pyrittiinkin poistamaan käsittelyssä.



Kuva 5. Virtaussytometriaan käytettiin Atto 488 -leima-ainetta (Sigma Aldrich). Leima on hydrofiilinen ja tarttuu spesifisesti histidiiniin ja virittyy 501 nm aallonpituudella. Emissio tapahtuu 523 nm aallonpituudella. Havaittu fluoresenssi on väriltään vihreää. Käytetty virtaussytometri oli Sysmex CyFlow Cube 8.

4. Tulokset ja tulosten tarkastelu

Aikaisemmin BilRI:n ilmentymistä oli tutkittu DsRed—geenin avulla *A. actinomycetemcomitans*issa eri lämpötiloissa ja kuivuutta muistuttavissa oloissa. Aiempi tutkimus osoitti BilRI:n ilmentyvän voimakkaammin alemassa lämpötilassa. Tässä aiemmassa tutkimuksessa DsRed oli samalla promoottorialueella bilRI:n kanssa, jolloin tätä fluoresoivaa proteiinia erittyi BilRI:n tuotannon aikana. Tämä ei kuitenkaan ole optimaalinen tapa tutkia BilRI:n ilmentymistä, sillä tällöin ei mitata suoraan BilRI:n ilmentymistä, vaan promoottorialueen aktiivisuutta, mikä on epäsuora mittaustapa.

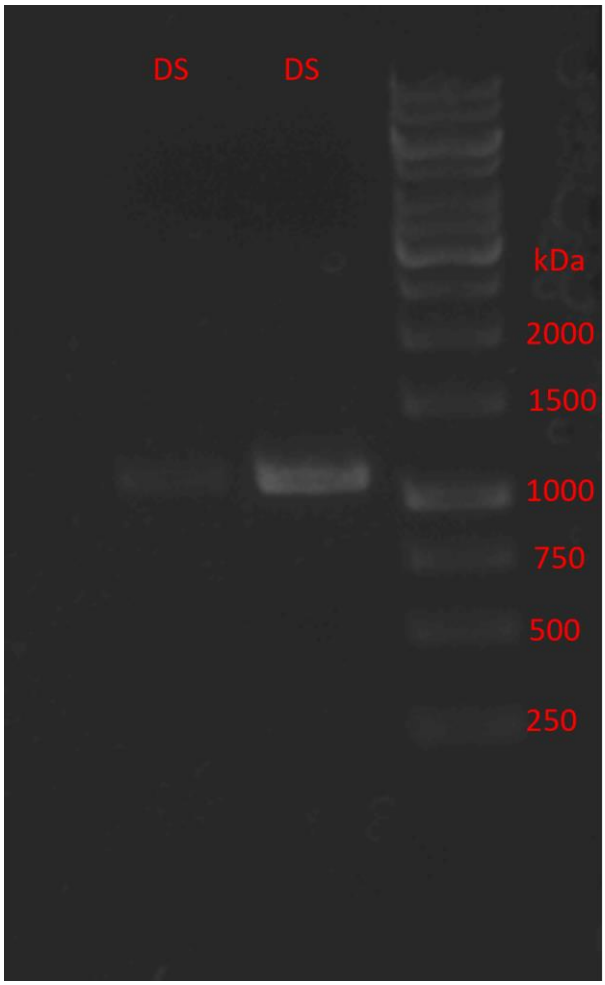
Tutkimuksessamme haluttiin tutkia itse BilRI:n ilmentymistä solupopulaatiossa. Tarkoituksena oli siis mitata suoraan BilRI:n ilmentymistä, eikä tarkkailla sitä jonkin toisen proteiinin kautta. Tämä onnistuisi leimaamalla tuotettua BilRI:ä ja analysoimalla solunäytteitä virtaussytometrilla.

4.1 DNA-konstruktin valmistaminen

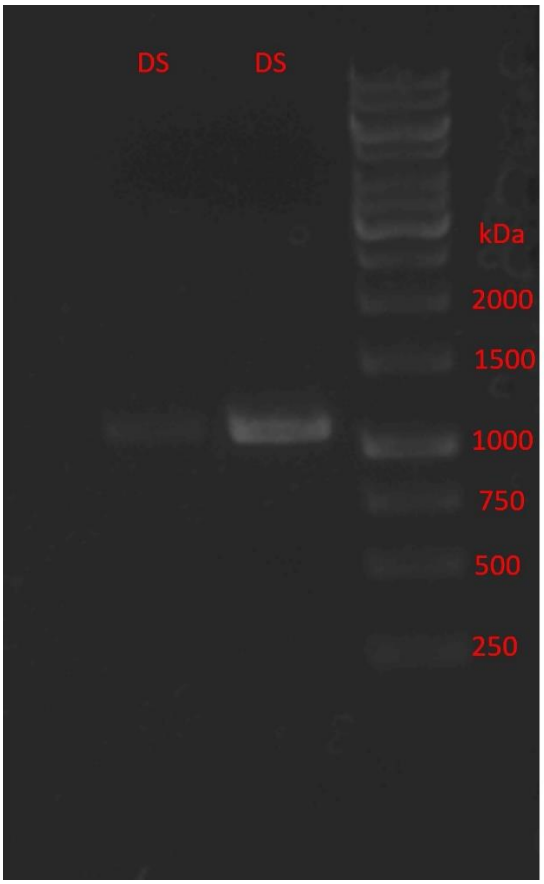
Tarkoituksena oli valmistaa tutkittavista bakteereista mutantti, jossa bilRI on korvattu meidän suunnittelemallamme konstruktilla. Suunnitelemassamme mutantissa bilRI:n perässä on histidiinihäntää koodaava nukleotidisekvenssi tuotannon seuraamista varten, sekä antibioottiresistenssi antibioottiselektiota varten. Kehitetyllä metodilla pyrittiin tarkkailemaan BilRI:n ilmentymistä yksittäisissä soluissa virtaussytometriaa hyödyntäen.

Geenin huolellisesti suunniteltu alavirtaan ja ylävirtaan kloonaaminen oli tärkeää, sillä geenin haluttiin liittyvän *A. actinomycetemcomitans*in omaan genomiin ongelmitta. Tarkoituksena oli siis korvata *A. actinomycetemcomitans*in oma bilRI-geeni meidän konstruktillamme, joka sisältää bilRI:n lisäksi histidiinihännän ja spektinomysiiniresistenssin muodostavan Spe-kasetin (ks. kuva 1).

PCR:llä geenin alavirtaan (DS, kuva 6) ja ylävirtaan (US, kuva 7) monistaminen onnistui *A. actinomycetemcomitans* D7S -kannasta. Monistettuja DS- ja US-juosteita käytettiin mutantin kehittämiseen ja DNA:n liittämiseen *A. actinomycetemcomitans*in genomiin.



Kuva 6. PCR:llä monistetut DNA:t alavirtaan (DS = downstream) ajettuna agaroosigeelille. DS-juoste = ycgL-FD_1 + bilRI_RD_BamHI. Tuotteen koko oli 1200 kb. Geeliltä voidaan hyvin nähdä, että tuote oli oikean kokoinen molemmissa kaivoissa. Molempien kaivojen näytteet yhdistettiin ja puhdistettiin GeneJET PCR Purification Kit -kitillä (Thermo Fisher). DNA:n konsentraatioksi mitattiin 106,9 ng/µl (Nanodrop one, Thermo Scientific). Molekyylipainostandardina käytettiin O'GeneRuler 1kb DNA ladder (Thermo Scientific).



Kuva 7. PCR:llä monistetut DNA:t ylävirtaan (US = upstream) ajettuna agaroosigeelille. US = pbilRI_FD_XhoI + phoGlu-R. Tuotteen koko oli 1200 kb. Geeliltä nähdään oikean kokoiset vyöhykkeet molemmissa US-kaivoissa. Molempien US-kaivojen näytteet yhdistettiin ja puhdistettiin GeneJET PCR Purification Kit -kitillä (Thermo Fisher) Puhdistetun DNA:n konsentraatioksi mitattiin 38,3 ng/µl (Nanodrop one, Thermo Scientific). Molekyylipainostandardina käytettiin O'GeneRuler 1kb DNA ladder (Thermo Scientific).

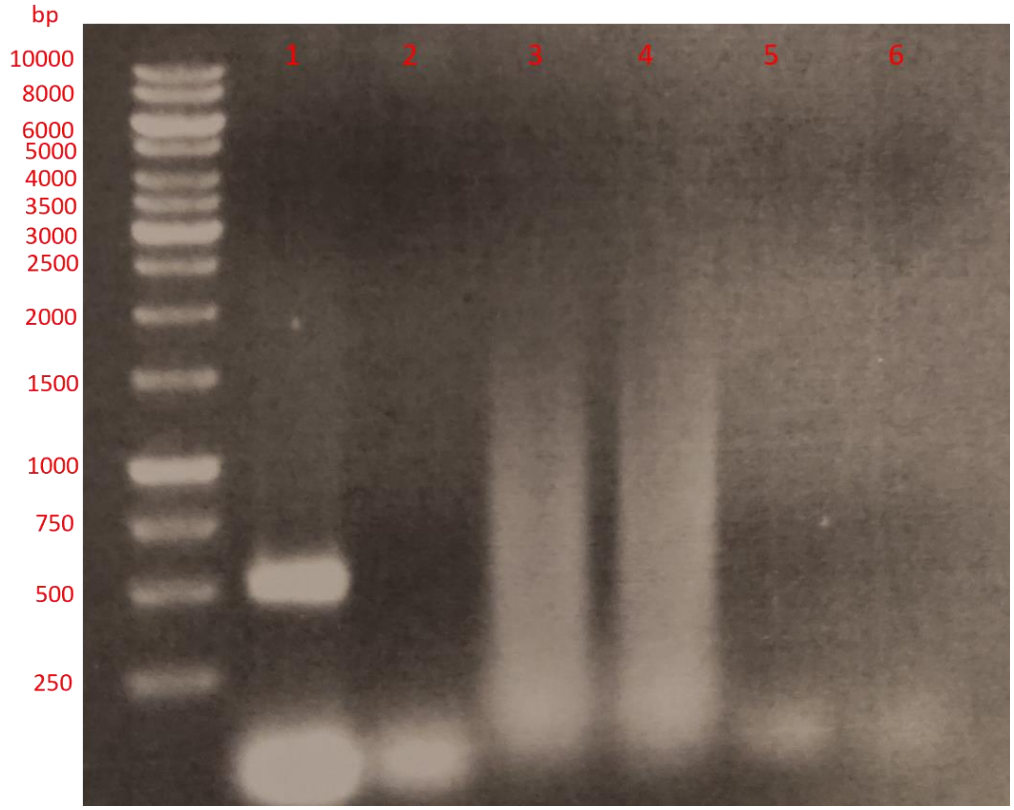
PCR-tuotteet digestoitiin, ajettiin agaroosigeelille ja eristettiin geeliltä niiden ligatoimista ja *A. actinomycetemcomitans*iin siirtämistä varten. Digestoidut DNA:t ligatoitiin bilRI_6His_Spe-DNA:n kanssa ja siirrettiin *A. actinomycetemcomitans*iin luonnollisella transformaatiolla.

4.2 Luonnollinen transformaatio ja pesäke-PCR

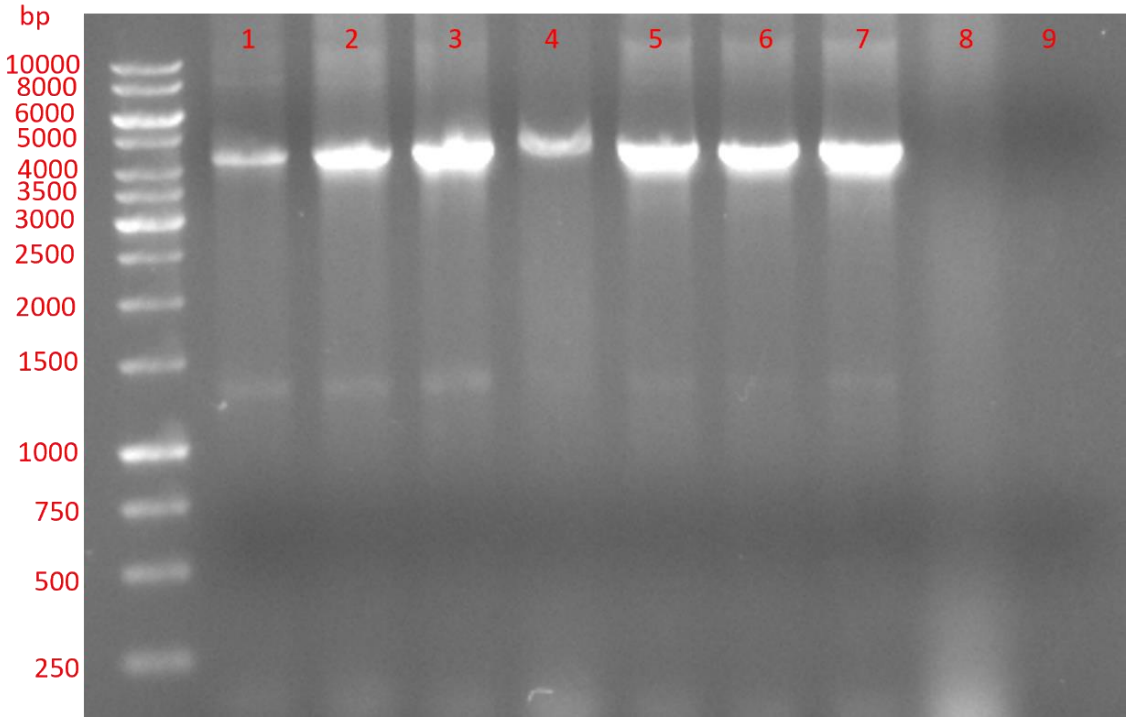
Luonnollista transformaatiota hyödynnettiin tutkimuksessa. Sen avulla *A. actinomycetemcomitans*iin voitiin siirtää geenikasetti bilRI_6His_Spe kohdeproteiini BilRI:n tutkimista varten. Luonnollisen transformaation tarkoituksena oli siirtää bilRI_6His_Spe osaksi *A. actinomycetemcomitans*in

omaa genomia. Valmistamamme konstrukti tällä tavalla korvaisi *A. actinomycetemcomitans*in luonnollisen bilRI:n.

Luonnollisen transformaation onnistuminen tarkastettiin pesä-PCR:llä. Pesäke-PCR:ssä kerätään selektiomaljalta kasvanut pesäke, joka hajotetaan, DNA monistetaan PCR:llä ja ajetaan geelille (kuvat 8 ja 9).



Kuva 8. Pesäke-PCR:n tulokset OM_BilRI ja BilRI_Nest -alukkeilla 1 % agaroosigeelille ajettuina. OM-alukkeilla monistettiin BilRI-geeni. Tuotteen oikea koko on 560 bp. Pesäkenäytteet yhdestä pesäkkeestä. Näytteet: 1. pesäke OM, 2. pesäke Nest, 3. ΔbilRI OM, 4. ΔbilRI Nest, 5. gDNA OM ja 6. gDNA Nest. Pesäkkeestä ajettu näyte Nest-alukkeila ei toiminut tässä geelissä. ΔbilRI-näytteet toimivat negatiivisena kontrollina, sillä niistä BilRI-geeni on deletoitu. gDNA-näyte on *A. actinomycetemcomitans* D7S:n genomista DNA:ta ja toimi positiivisena kontrollina. Jostain syystä positiivinen kontrolli ei kuitenkaan toiminut tässä, eikä geelillä ole havaittavissa vyöhykettä kaivossa 6.



Kuva 9. Pesäke-PCR:n tulokset BilRI_Nest-alukkeilla 1 % agaroosigeelille ajettuina. Kaivot 1–8 eri pesäkkeitä. Kaivo 9 *A. actinomycetemcomitans* villityyppi negatiivisena kontrollina. BilRI_6His_Spe:n oikea koko on 4,3 kb. Näistä näytteistä jatkoon valittiin kaivojen 3, 5, 6 ja 7 mutanttikannat.

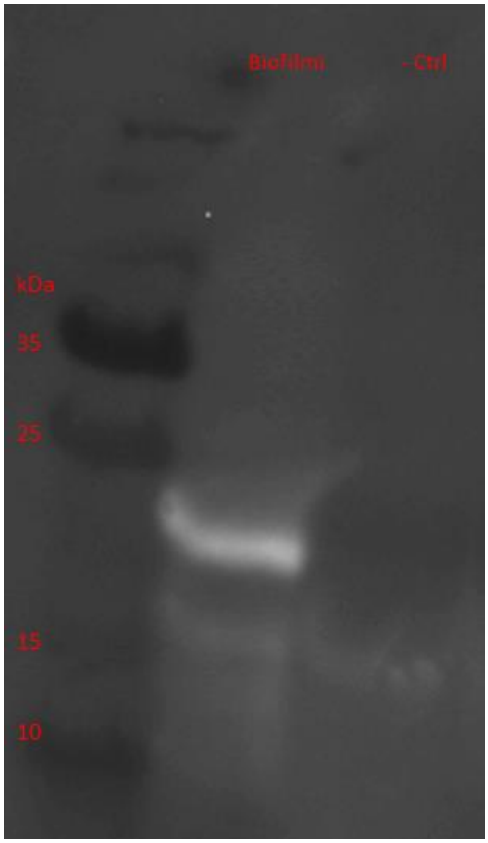
Pesäke-PCR:n tulosten perusteella mutanttikannan valmistus onnistui ja tutkimus sai edetä. Seuraavaksi varmistettiin BilRI:n oikeanlainen ilmentyminen histidiinihännän kanssa ajamalla solunäytteistä western blot -immunomääritys.

4.3 Western blot

Western blottaus on immunologinen menetelmä proteiinien havaitsemiseen. Se soveltuu erityisen hyvin näytteisiin, jossa tutkittavan proteiinin määrä on pieni.

Western blottauksessa SDS-PAGE-geeliltä erotetut proteiinit siirrostettiin western-membraanille. Analyysissä käytetty HisProbe-HRP tarttui kehittämämme mutanttikannan ilmentämään BilRI-proteiinin histidiinihäntään, jolloin proteiinin oikeanlainen ilmentyminen voitiin varmistaa. Soluja kasvatettiin +27 °C:een lämpötilassa ennen analyysiä, jotta mahdollisimman suuri määrä BilRI:ä ilmentyisi. Kasvatus tehtiin biofilmissä, sillä luonnossa *A. actinomycetemcomitans* esiintyy biofilmissä. Analyysissä bilRI_6His_Spe-geenin oikeanlainen ilmentyminen histidiinihännän kanssa tarkastettiin onnistuneesti (kuva 10), sillä western blotissa HisProbe-HRP leimasi näytteen. Jos näytteessä

ei olisi histidiinihäntää, ei näytettä näkyisi analyysissä (kuten näkee negatiivisessa kontrollissa). Näytteen vyöhyke oli myös oikean kokoinen (~ 22 kDa).



Kuva 10. Western blot -analyysi *A. actinomycetemcomitans* -biofilmikasvatuksen BilRI:n ilmentymisestä. BilRI-proteiinin koko on ~ 22 kDa. Määrityksessä käytettiin HisProbe-HRP:tä (Thermo Scientific), joka tarttuu BilRI:n histidiinihäntään. ECL-liuoksen (Enhanced chemiluminescence) kanssa voitiin havaita spesifisesti proteiinin oikeanlainen laatu, sillä se sisälsi haluamamme histidiinihännän. Näytekaivon vieressä on negatiivisena kontrollina WT-BilRI, joka ei näy western blotissa, sillä se ei sisällä histidiinihäntää, johon HisProbe tarttuisi. Molekyylipainostandardina PageRuler Plus Prestained Protein Ladder 10 to 250 kDa (Thermo Sctientific). Kuvantamislaitteena toimi BioRad ChemidDoc MP Gel Analyzer 1.

Western blotissa negatiivisena kontrollina käytettiin villityypin BilRI:ä, jossa ei ole histidiinihäntää. HisProbe-HRP tarvitsee histidiinihännän tarttuakseen näytteeseen, joten negatiivisen kontrollin kaivossa ei näy vyöhykettä.

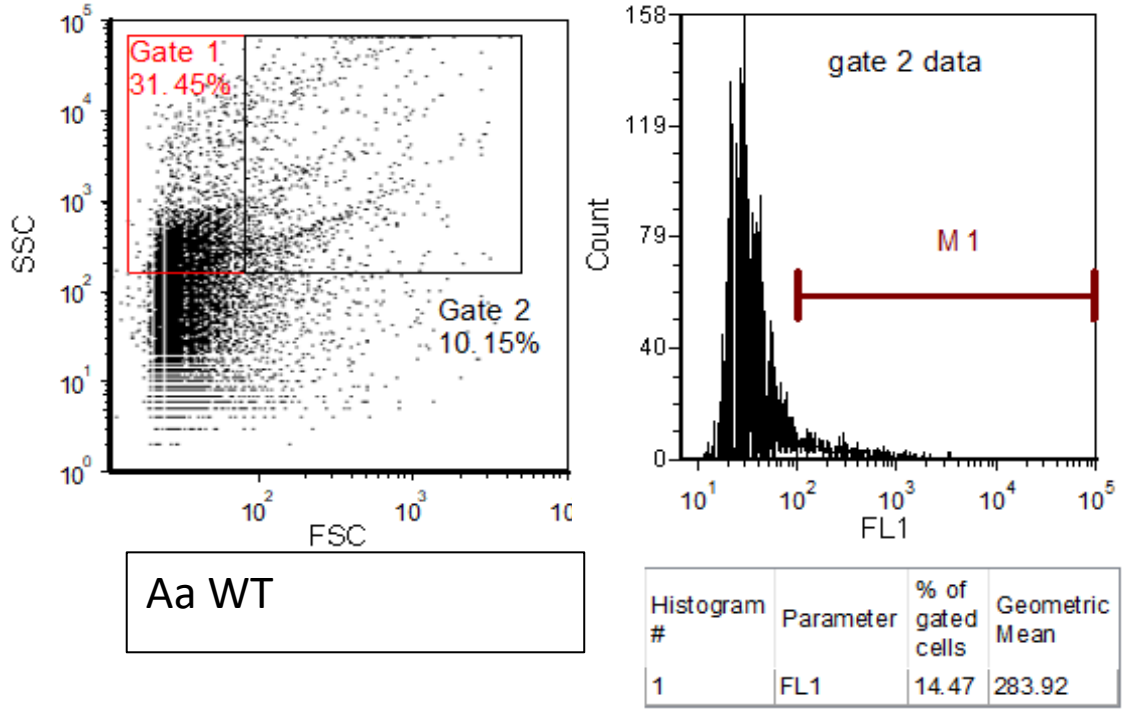
Western blotista saatujen tulosten perusteella mutanttikantamme toimii ja tuottaa histidiinihännän BilRI:n perään. Tämän jälkeen voitiin edetä viimeiseen vaiheeseen eli solujen virtaussytometriseen analyysiin.

4.4 Virtaussytometria

Virtaussytometria käytettiin BilRI:n ilmentämisen tutkimiseksi solupopulaatiossa. Myös tässä kokeessa soluja kasvatettiin alemmassa lämpötilassa (27 °C), jotta BilRI:ä ilmentyisi mahdollisimman paljon. Solujen tuottamaa histidiinihäntää käyttämällä soluja voidaan leimata siihen sitoutuvalla leimalla. Histidiinihännän on tarkoitus olla solukalvon ulkopuolella BilRI:iin kiinnittyneenä.

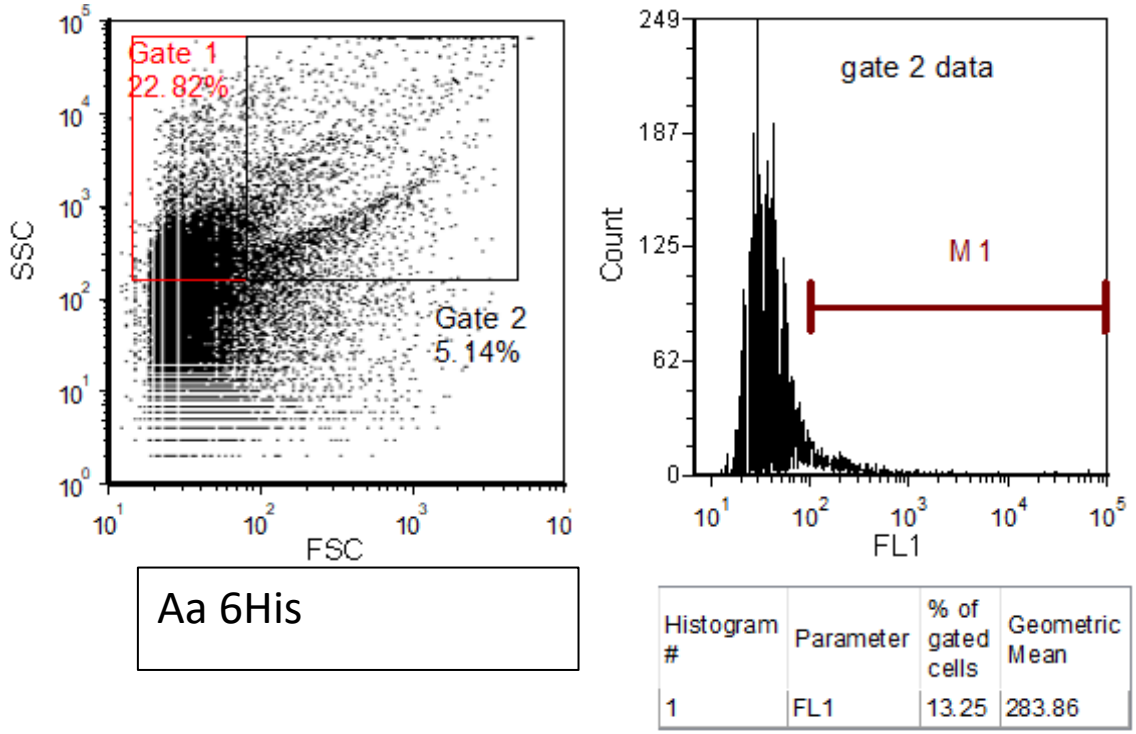
Käyttämämme Atto 488 -leima-aine on hydrofiilinen spesifisti sitoutuva leima. Se fluoresoi 523 nm aallonpituudella vihreää valoa ja tarttuu kiinni mutanttisolujen tuottaman BilRI:n (bilRI-6His) histidiinihäntään. Kun solut on irrotettu ryppäistään yksittäisiksi soluiksi, voi virtaussytometrilla erotella fluoresoivat solut fluoresoimattomista, jolloin nähdään, kuinka suuri osa soluista yhdessä populaatiossa ilmentää BilRI:ä.

Virtaussytometrilla saadut tulokset eivät olleet toivotunlaisia. Villityyppi (WT, kuva 12) ja bilRI_6His-mutantista (kuva 13) mitattu fluoresenssi oli melkein sama.



Kuva 11. Villityypin *A. actinomycetemcomitans* -solujen virtaussytometriadataa. Gate 2 -data esittää näytteestä mitatuista soluista 14,47 % olevan fluoresenssipositiivisia. Tämä määrä on kuitenkin todennäköisesti taustaa, sillä villityypin solut eivät ilmennä BilRI:ä histidiinihännän kanssa, jolloin Atto 488 -leima ei voi tarttua niihin. Villityyppi toimi nollanäytteenä bilRI_6His-mutanteille. Laitteena analyysissä käytettiin Sysmex CyFlow Cube 8:aa.

WT toimi nollanäytteenä bilRI_6His-mutantille. WT:n ei pitäisi fluoresoida, sillä WT:n ilmentämä BilRI ei sisällä histidiinihäntää, joten näytteen fluoresenssilukemat ovat todennäköisesti pelkkää luonnollista taustaa.



Kuva 12 Mutantti bilRI_6His *A. actinomycetemcomitans* -solujen virtaussytometriadataa. Gate 2 -data esittää fluoresenssipositiivisten solujen määrän olevan 13,25 %. Saatu tulos ei kuitenkaan voinut olla oikein, sillä villityypistä mitatun negatiivisen kontrollin tulos oli samaa luokkaa, jopa isompi. Laitteena analyysissä oli Sysmex CyFlow Cube 8.

Mutanttikantamme bilRI_6His -näytteen fluoresenssipositiivisten solujen määrä oli jopa hieman pienempi kuin villityypin näytteessä. Tämä kertoo menetelmän epäonnistumisesta. Atto 488-leiman tarttuminen on todennäköisesti jotenkin estynyt näytteissämme.

Virtaussytometrilla analysoimisessa haasteena voi olla *A. actinomycetemcomitans*in pinnalla olevat lipopolysakkaridit, jotka kätkevät histidiinihännän ja häiritsevät leima-aineen sitoutumista. Tämä saattaa esimerkiksi vääristää tuloksia. Solususpension mittaamista vaikeuttaa myös *A. actinomycetemcomitans*in taipumus aggregoitua, eli muodostaa klimppejä. Mahdollisesti muodostuneista aggregaateista ei saada oikeanlaisia analyysejä ja voidaan esimerkiksi saada vääriä negatiivisia tuloksia.

4.5 Yhteenveto

Saadut tulokset eivät anna vastausta tutkimuksessa esitettyyn kysymykseen, vaikka mutanttikannan tekeminen ja proteiinin ilmentyminen histidiinihännän kanssa onnistuivatkin.

Jatkossa tulisi kehittää ratkaisu fluoresenssileiman sitoutumiseen. Solunäytteiden käsittelyssä saattaisi olla vastaus tähän ongelmaan. Soluista voisi kenties jollakin entsyymikäsittelyllä pyrkiä poistamaan solun pinnan lipopolysakkarideja ja katsoa, muuttuvatko virtaussytometrian tulokset. Kehittyneempi tapa soluklimppien erottamiseen toisistaan saattaisi myös auttaa virtaussytometrista (tai muunlaista) mittausta.

A. actinomycetemcomitans on luonteeltaan haastava organismi tutkia, sillä se kasvaa hitaasti, mikä tarkoittaa pitkää aikaa mittausten ja muiden toimenpiteiden välillä. Tämän takia myös tapahtuneet virheet ja epäonnistumiset paljastuvat vasta paljon myöhemmin. Spe-kasetti tai histidiinihäntä saattavat myös vaikuttaa tutkimuksessa BilRI:n ominaisuuksiin, sillä ne eivät esiinny luonnossa *A. actinomycetemcomitans*issa eivätkä kuulu sen genomiin. BilRI:n vähäinen määrä saattaa myös haitata havaitsemista, sillä sitä tuotetaan *A. actinomycetemcomitans*issa erittäin vähän.

Myös toisenlaista mittaustapaa, kuten kvantitatiivista fluoresenssimikroskopiaa, kannattaisi ehkä kokeilla. Menetelmän onnistuessa kehittämäämme konstruktia voitaisiin käyttää esimerkiksi fluoresenssiin perustuvassa solun erottelussa (FACS, eng. Fluorescence-Activated Cell Sorting), jota voitaisiin hyödyntää solupopulaatioiden jatkotutkimuksissa. Tämä mahdollistaisi esimerkiksi BilRI:ä ilmentävien solujen vertailun sitä ilmentämättömiin. Voitaisiin myös esimerkiksi selvittää, alkavatko BilRI:ä ilmentämättömät solut tuottamaan BilRI:ä populaation koon tai olosuhteiden muuttuessa. Spe-kasetin poistamisen vaikutusta mutanttiin voisi myös tutkia, sillä FACS:in avulla voisi seuloa soluja ilman antibioottiselektiota.

BilRI:n jatkotutkimukset todennäköisesti parantaisivat tuntemusta bakteereissa esiintyviin LEA-tyyppisiin proteiineihin. Kuten on aiemmin mainittu, niiden toimintaa ja evolutiivista vaikutusta bakteereissa ei tunneta kovin hyvin. On kuitenkin fakta, että bakteerien ei ole järkevää pitää genomissaan mitään ylimääräistä, ja stressiproteiinin ilmentäminen auttaa organismia selviytymään haastavammissa olosuhteissa.

5. Kirjallisuus

Ahlstrand, T., Torittu, A., Elovaara, H., Välimaa, H., Pöllänen, M. T., Kasvandik, S., … Ihalin, R. (2018) Interactions between the Aggregatibacter actinomycetemcomitans secretin HofQ and host cytokines indicate a link between natural competence and interleukin-8 uptake. *Taylor & Francis Online* **9**:1205–1223.

Avery, O. T., MacLeod, C. M. & McCarty, M. (1944) STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES. *J Exp Med* **79**:137–158.

Battaglia, M. & Covarrubias, A. (2013) Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins in legumes. *Frontiers in Plant Science* **4**.

Belibasakis, G. N., Maula, T., Bao, K., Lindholm, M., Bostanci, N., Oscarsson, J., … Johansson, A. (2019) Virulence and Pathogenicity Properties of Aggregatibacter actinomycetemcomitans. *Pathogens* **8**:222.

Benoit, D. S. W., Sims, K. R. & Fraser, D. (2019) Perspective: Nanoparticles for oral biofilm treatments. *ACS Nano* **13**:4869–4875.

Brocker, C., Thompson, D., Matsumoto, A., Nebert, D. W. & Vasiliou, V. (2010) Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. *Hum Genomics* **5**:30–55.

Carvalho, R. R. M. de, Dias, C. S., Paz, L. N., Fires, T. M. de L., Figueira, C. P., Damasceno, K. A. & Pinna, M. H. (2023) Biofilm formation in vitro by Leptospira interrogans strains isolated from naturally infected dogs and their role in antimicrobial resistance. *Heliyon* **9**.

Chambers, S. T., Murdoch, D., Morris, A., Holland, D., Pappas, P., Almela, M., … International Collaboration on Endocarditis Prospective Cohort Study (ICE-PCS) Investigators (2013) HACEK Infective Endocarditis: Characteristics and Outcomes from a Large, Multi-National Cohort. *PLoS ONE* **8**:e63181.

Dirk, L. M. A., Abdel, C. G., Ahmad, I., Neta, I. C. S., Pereira, C. C., Pereira, F. E. C. B., … Downie, A. B. (2020) Late Embryogenesis Abundant Protein-Client Protein Interactions. *Plants (Basel)* **9**:814.

Fischer, R. G., Lira Junior, R., Retamal-Valdes, B., Figueiredo, L. C. de, Malheiros, Z., Stewart, B. & Feres, M. (2020) Periodontal disease and its impact on general health in Latin America. Section V: Treatment of periodontitis. *Braz Oral Res* **34**.

Flynn, J. & Gorry, P. (2019) Flow Cytometry Analysis to Identify Human CD4+ T Cell Subsets. *Methods Mol Biol* **2048**:15–25.

Hardy, G. E. (2004) The Burden of Chronic Disease: The Future is Prevention. *Prev Chronic Dis* **1**:A04.

Kurien, B. T. & Scofield, R. H. (2015) Western Blotting: An Introduction. Teoksessa B. T. Kurien & R. H. Scofield (Toim.), *Western Blotting* (Vsk. 1312, ss. 17–30). New York, NY: Springer New York.

Könönen, E., Gursoy, M. & Gursoy, U. K. (2019) Periodontitis: A Multifaceted Disease of Tooth-Supporting Tissues. *J Clin Med* **8**:1135.

Lerminiaux, N. A. & Cameron, A. D. S. (2019) Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Can J Microbiol* **65**:34–44.

Liao, X., Makris, M. & Luo, X. M. (2016) Fluorescence-activated Cell Sorting for Purification of Plasmacytoid Dendritic Cells from the Mouse Bone Marrow. *J Vis Exp* 54641.

Maula, T., Vahvelainen, N., Tossavainen, H., Koivunen, T., T Pöllänen, M., Johansson, A., … Ihalin, R. (2021) Decreased temperature increases the expression of a disordered bacterial late embryogenesis abundant (LEA) protein that enhances natural transformation. *Virulence* **12**:1239–1257.

McKinnon, K. (2018) Flow Cytometry: An Overview. https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.ezproxy.utu.fi/29512141/ (Luettu 3.11.2022)

Mishra, M., Tiwari, S. & Gomes, A. V. (2017) Protein purification and analysis: Next generation Western blotting techniques. *Expert Rev Proteomics* **14**:1037–1053.

Paino & ja muut (2013) Virulence properties of Aggregatibacter actinomycetemcomitans biofilm and characterisation of its putative cytokine exploitation. 92.

Petersen, P. E. & Baehni, P. C. (2012) Periodontal health and global public health. *Periodontol 2000* **60**:7–14.

Pillai-Kastoori, L., Schutz-Geschwender, A. R. & Harford, J. A. (2020) A systematic approach to quantitative Western blot analysis. *Analytical Biochemistry* **593**:113608.

Robinson, J. P. (2022) Flow cytometry: Past and future. *BioTechniques* **72**:159–169.

Schirmacher, A. M., Hanamghar, S. S. & Zedler, J. A. Z. (2020) Function and Benefits of Natural Competence in Cyanobacteria: From Ecology to Targeted Manipulation. *Life (Basel)* **10**:249.

Sharma, D., Misba, L. & Khan, A. U. (2019) Antibiotics versus biofilm: An emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* **8**:76.

Solano, C., Echeverz, M. & Lasa, I. (2014) Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology* **18**:96–104.

Song, Y., Tian, T., Shi, Y., Liu, W., Zou, Y., Khajvand, T., … Yang, C. (2017) Enrichment and single-cell analysis of circulating tumor cells. *Chem Sci* **8**:1736–1751.

Srikumaran, S. (2020) Leukotoxins. *Toxins (Basel)* **12**:231.

Stacy, A., Abraham, N., Jorth, P. & Whiteley, M. (2016) Microbial Community Composition Impacts Pathogen Iron Availability during Polymicrobial Infection. *PLoS Pathog* **12**:e1006084.

Stewart, P. S. (2015) Antimicrobial Tolerance in Biofilms. *Microbiol Spectr* **3**:10.1128/microbiolspec.MB-0010–2014.

Teughels, W., Dhondt, R., Dekeyser, C. & Quirynen, M. (2014) Treatment of aggressive periodontitis. *Periodontology 2000* **65**:107–133.

The Australian Prevention Partnership centre (2023, kesäkuuta 1) What is the burden of chronic disease? https://preventioncentre.org.au/about-prevention/what-is-the-burden-of-chronic-disease/ (Luettu 1.6.2023)

Vega, B. A., Belinka, B. A. & Kachlany, S. C. (2019) Aggregatibacter actinomycetemcomitans Leukotoxin (LtxA; Leukothera®): Mechanisms of Action and Therapeutic Applications. *Toxins (Basel)* **11**:E489.

Venkatesan, N., Perumal, G. & Doble, M. (2015) Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. *Future Microbiology* **10**:1743–1750.

Vora, N., Shekhar, P., Esmail, M., Patra, A. & Georgakoudi, I. (2022) Label-free flow cytometry of rare circulating tumor cell clusters in whole blood. *Sci Rep* **12**:10721.

Wang, G., Su, H., Abou-Elwafa, S. F., Zhang, P., Cao, L., Fu, J., … Wei, L. (2023) Functional analysis of a late embryogenesis abundant protein ZmNHL1 in maize under drought stress. *Journal of Plant Physiology* **280**:153883.

Yamazhan, T., Aydemir, S., Tünger, A., Serter, D. & Gökengin, D. (2005) In vitro activities of various antimicrobials against Brucella melitensis strains in the Aegean region in Turkey. *Med Princ Pract* **14**:413–416.

Yan, J. & Bassler, B. L. (2019) Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms. *Cell Host & Microbe* **26**:15–21.

Ünal Turhan, E., Erginkaya, Z., Korukluoğlu, M. & Konuray, G. (2019) Beneficial Biofilm Applications in Food and Agricultural Industry. Teoksessa A. Malik, Z. Erginkaya, & H. Erten (Toim.), *Health and Safety Aspects of Food Processing Technologies* (ss. 445–469). Cham: Springer International Publishing.