

***Aggregatibacter actinomycetemcomitansin* ulkokalvon
lipopolysakkaridin ja HofQ-kanavaproteiinin potentiaalinen kyky häiritä
ihmisen immuunivastetta.**

Pro Gradu tutkielma

Turun yliopisto

Biokemian laitos

Biokemia

Toukokuu 2020

Laura Kovesjoki

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

TURUN YLIOPISTO

Biokemian laitos

KOVESJOKI, LAURA: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ulkokalvon lipopolysakkaridin ja HofQ-kanavaproteiinin potentiaalinen kyky häiritä ihmisen immuunivastetta.

Pro gradu -tutkielma, 68 s

Biokemia

huhtikuu 2020

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

Aggregatibacter actinomycetemcomitans on gram-negatiivinen bakteeri ja yksi parodontiittia aiheuttavista bakteereista. Se muodostaa biofilmin ientaskuun hampaan pinnalle ja aiheuttaa tulehduksen, joka tuhoaa hampaiden tukikudoksia. Bakteerin ulommalla solukalvolla on HofQ-proteiini, joka todennäköisesti kuljettaa DNA:ta solukalvon läpi ja emHofQ on siitä N-terminaalinen solukalvon ulkoinen osa. Ulommalla solukalvolla on myös lipopolysakkarideja (LPS), jotka koostuvat lipidistä ja pitkästä polysakkaridiketjusta. Polysakkaridissa on toistojakso, O-antigeeni, jonka rakenne määrää bakteerin serotyypin.

Tutkimuksen tavoite oli selvittää, voisiko LPS:llä ja HofQ:lla olla merkitystä IL-8:n sisäännotossa bakteerisolun sisään. HofQ:sta tutkittiin sen solukalvon ulkoista osaa, emHofQ:ta. emHofQ:sta tuotettiin kolmea muokattua proteiinia, joissa oli muutettu aminohappoja kahdesta silmukasta (K134-K139, D164-S167). Nämä kaksi silmukkaa muodostavat pinnan, johon IL-8:n arveltiin sitoutuvan. Sitoutumiskokeilla testattiin IL-8:n ja IL-1 β :n sitoutumista emHofQ-proteiiniin ja IL-8:n sitoutumista LPS:n eri serotyyppeihin

Sitoutumiskokeet osoittivat, että IL-8 ja IL-1 β sitoutuvat *A. actinomycetemcomitans* emHofQ-proteiinissa kahden silmukan (K134-K139, D164-S167) muodostamaan pintaan. Lisäksi eri kantojen LPS:iin IL-8 sitoutuu eri voimakkuuksilla. Sitoutumisen voimakkuus ei ollut riippuvainen serotyypistä tai epäpuhtautena olevien proteiinien tai DNA:n määristä.

Tulosten perusteella näyttää siltä, että LPS saattaa konsentroida IL-8:a solun pinnalle, josta HofQ siirtää sitä kalvojen väliseen tilaan.

Asiasanat: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, emHofQ, interleukiini-8, LPS, sytokiini

Tärkeintä ei ole määränpää vaan matka.
Kun yksi määränpää on saavutettu, alkaa uusi matka.
Omistettu niille henkilöille, jotka matkaavat kanssani kohti tuntematonta.

Sisällys

LYHENTEET	3
1. KIRJALLISUUSKATSAUS	5
1.1 Parodontiitti	5
1.2 Biofilmi.....	7
1.3 <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	8
1.4 Luonnollinen kompetenssi	9
1.5 HofQ ja DNA:n sisäänotto.....	11
1.6 Sytokiinit.....	12
1.7 Immuunireaktion alkaminen ja sytokiinien merkitys siinä.....	15
1.8 Gram-negatiivisen bakteerin solukalvon rakenne	17
1.9 LPS	18
1.9.1 <i>A. actinomycetemcomitansin</i> LPS:ää on seitsemää eri serotyyppiä.....	21
1.9.2 LPS:n rooli infektiossa	24
1.9.3 LPS:n eri serotyyppien aiheuttama vaste ihmisen eri immuunisoluissa ..	25
1.10 Työn tavoitteet	30
2. MATERIAALIT JA MENETELMÄT	31
2.1 LPS	31
2.1.1 LPS:n eristys	31
2.1.2 IL-8 tuotto.....	33
2.1.3 IL-8 puhdistus	33
2.1.4 LPS:n epäpuhtauksien määrittelyt	35
2.1.5 IL-8/IL-1 β /IFN- γ – LPS EMSA	35
2.1.6 LPS – IL-8 EuLISA.....	36
2.2 Muokatut emHofQ -proteiinit	36
2.2.1 Kloonaus ja transformaatio tuottokantaan	36
2.2.2 emHofQ tuottotestaukset.....	38
2.2.3 emHofQ tuotto.....	39
2.2.4 emHofQ puhdistus	39
2.2.5 IL-8/IL-1 β – emHofQ EuLISA.....	40

3.	TULOKSET.....	41
3.1	LPS	41
3.1.1	IL-8:n tuottoa ja puhdistusta optimoitiin.....	41
3.1.2	EMSA osoitti, että LPS vuorovaikuttaa IL-8:n ja IFN- γ :n kanssa	41
3.1.3	EuLISA osoitti IL-8:n sitoutuvan LPS:ään	43
3.1.4	LPS:n epäpuhtaudet eivät vaikuttaneet IL-8:n sitomisen voimakkuuteen 45	
3.2	emHofQ	48
3.2.1	emHofQ-proteiineja päätettiin tuottaa 16 °C:ssa 2xTY-mediumissa.....	49
3.2.2	emHofQ-proteiineja saatiin puhdistettua hyvin puhtaana.....	51
3.2.3	EuLISA osoitti emHofQmut sitoutuvan villityyppiä huonommin sytokiineihin.....	52
4.	TULOSTEN TARKASTELU.....	55
4.1	LPS	55
4.2	LPS:n eristysmenetelmä ja pitoisuuden määrittäminen olivat mahdollisia virhelähteitä LPS-työssä	56
4.2.1	LPS:n eristysmenetelmää pitää kehittää.....	56
4.2.2	LPS:n pitoisuuden määrittäminen ei ollut toistettava	57
4.3	emHofQ	58
4.4	Sytokiinien sisäänoton mahdollinen merkitys bakteereille	59
5.	PÄÄTELMÄT	60
	KIRJALLISUUS.....	62

LYHENTEET

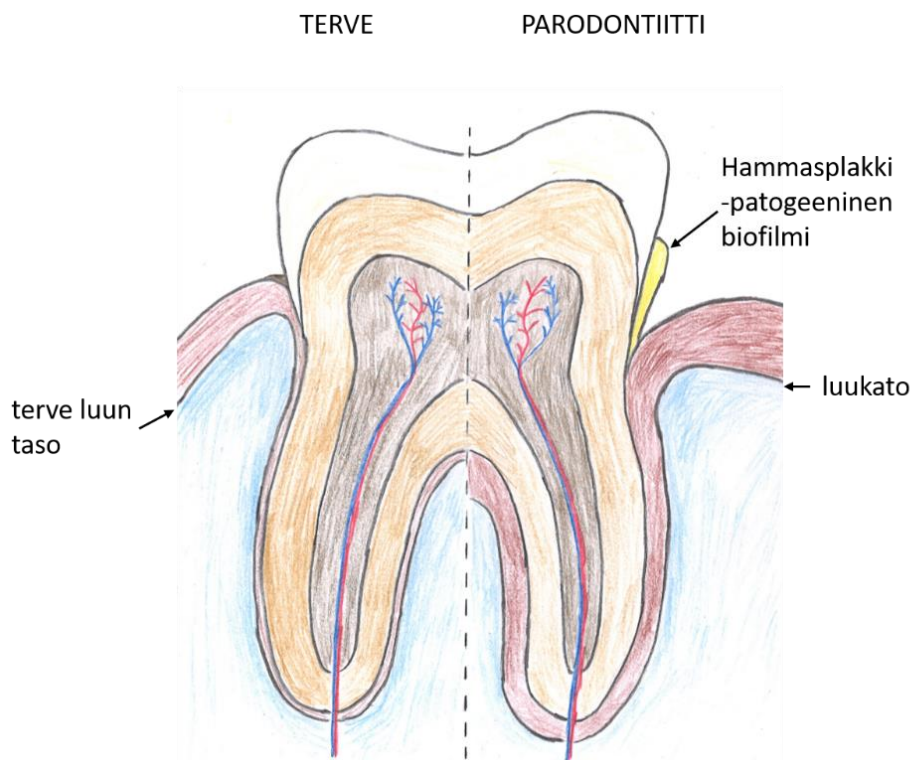
BSA	naudan seerumin albumiini (<i>engl.</i> bovine serum albumin)
DNA	deoksiribonukleiinihappo
EMSA	elektroforeettinen liikkumisen muuttumismääritys (<i>engl.</i> electrophoretic mobility shift assay)
EuLISA	europiumvälitteinen immunomääritysmenetelmä (<i>engl.</i> europium-linked immunosorbent assay)
flp	fimbriaalinen pieni proteiini (<i>engl.</i> fimbrial low-mol. weight protein)
HACEK	ryhmä gram-negatiivisia endokardiittia aiheuttavia, suun patogeenisia bakteereita
IFN- γ	interferoni- γ , sytokiini
IL	interleukiini, sytokiiniiryhmä
IPTG	isopropyyli- β -D-tiogalaktopyranosidi
K _d	dissosiaatiovakio
kDa	kilodalton, molekyyli­massayksikkö, 1 Da=1,66053886·10 ⁻²⁷ kg
LA	Luria agar, kasvatusalusta
<i>lac</i>	laktoosi-promootteri, aktivoidaan IPTG:llä
LB	Luria broth, kasvatusmediumi
LPS	lipopolysakkaridi
MHC	antigeenia esittelevä solun pintaproteiini (<i>engl.</i> major histocompatibility complex)
NK-solu	luonnollinen tappajasolu (<i>engl.</i> natural killer cell)
PBS	fosfaattipuskuroitu suolaliuos (<i>engl.</i> phosphate buffered saline)
PGA	poly-N-asetyyli­glukosamiini
RANKL	osteoklastien erilaistumiseen vaikuttava tekijä (<i>engl.</i> receptor activator of nuclear factor- κ B ligand)
SDS	natriumdodekyylisulfaatti (<i>engl.</i> sodium dodecyl sulfate)
SOC	(<i>engl.</i> super optimal broth with catabolic repressor)
TB	kasvatusmediumi (<i>engl.</i> Terrific broth)
Th	T-auttajasolu (<i>engl.</i> T helper cell)
TNF- α	tuumorinekroositekijä- α (<i>engl.</i> tumor necrosis factor α)

Treg	T-säätelijäsolu (<i>engl.</i> T regulatory cell)
TSA	kasvatusalusta (<i>engl.</i> tryptic soy agar)
2xTY	kasvatusmediumi (<i>engl.</i> Yeast Extract Tryptone)

1. KIRJALLISUUSKATSAUS

1.1 Parodontiitti

Parodontiitti on suun kiinnityskudosten sairaus (kuva 1). Sen oireita ovat veren vuotaminen ienkudoksesta, kipu, ikenien vetäytyminen ja hampaiden löystyminen. Näistä seuraa parodontiittisen ientaskun kehittyminen. (Henderson ym. 2010) Parodontiittia edeltävä, lievin iensairauden muoto on ientulehdus, jossa hampaan pinnalla esiintyvä biofilmi aiheuttaa tulehduksen. Maailmanlaajuisesti yli puolet ihmisistä kärsii ientulehduksesta. Ientulehduksesta seuraa alveoliluun ja sidekudoksen häviäminen, jolloin kyse on parodontiitista. (Pihlstrom ym. 2005) Ruotsissa ja USA:ssa tehdyissä tutkimuksissa parodontiittia esiintyi noin puolella aikuisväestöstä ja Saksassa lähes kaikilla. Maailmanlaajuisesti vakavaa parodontiittia arvioidaan esiintyvän 11 %:lla maailman väestöstä. (Slots 2017) Parodontiitille altistavat mm. tupakointi, ylipaino ja ikääntyminen (Hajishengallis 2014).



Kuva 1 Parodontiitti verrattuna terveeseen kudokseen. Parodontiitissa hampaan pinnalla on bakteerien muodostama hammasplakki eli biofilmi, joka aiheuttaa ikeniin tulehduksen. Tulehduksesta seuraa hampaan kiinnityskudosten ja luun hajotus ja hampaan löystyminen. Kuva piirretty (Darveau 2010) mukaan.

Parodontiittia aiheuttavat useat bakteerit yhdessä. Ne muodostavat biofilmin hampaan pinnalle, ientaskuun. (Pihlstrom ym. 2005; Henderson ym. 2010;

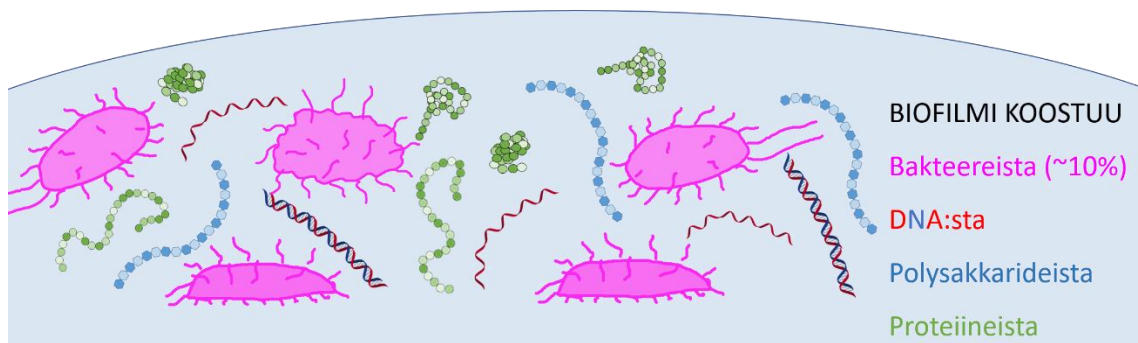
Hajishengallis 2014) Hampaan pinnalla esiintyvää hammasplakkia kutsutaan biofilmiksi. Ientaskussa esiintyvä bakteeribiofilmi aiheuttaa isännässään tulehduksen, joka tuhoaa hampaiden tukikudoksia. Proteolyttisiä, kudoksia tuhoavia entsyymejä vapauttavat sekä bakteerit että isäntä. (Pihlstrom ym. 2005) Sairauden myöhäisessä vaiheessa osteoklastit hajottavat luuta. Hoitamattomana parodontiitista voikin seurata jopa hampaiden menetys. (Hajishengallis 2014) Parodontiittia aiheuttavista bakteereista monet ovat gram-negatiivisia ja anaerobisia. Parodontiitissa usein esiintyviä bakteereita ovat mm. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* ja *Treponema denticola* (Pihlstrom ym. 2005; Henderson ym. 2010; Hajishengallis 2014).

Parodontiitti edesauttaa myös muissa kuin suun sairauksissa. Tällaisia ovat ateroskleroosi, sydänsairaudet, diabetes, rasvamaksa, nivelreuma ja raskauskomplikaatiot. (Henderson ym. 2010; Komazaki ym. 2017) Parodontiitin hoito vähentää diabeteksen haitallisia vaikutuksia (Graziani ym. 2017).

Parodontiittia voidaan hoitaa kirurgisesti, kirurgittomin menetelmin ja suuhygieniasta huolehtimisella. (Graziani ym. 2017) Parodontiitin hoidon pohjan luo suuhygieniasta huolehtiminen eli hampaiden ja hammasvälien huolellinen puhdistus ja fluorihammastahnan käyttö. Se ei kuitenkaan yksinään riitä parodontiitin pysäyttämiseen. Hammaslääkärin vastaanotolla biofilmiä ja hammaskiveä voidaan poistaa hampaan pinnalta ja ientaskusta mekaanisesti raaputtamalla. Kirurgisia toimenpiteitä voidaan käyttää apuna silloin, jos ikenien tulehtunut pehmytkudos estää pääsyn hampaan juureen. Kun pehmytkudos on pois tieltä, saadaan biofilmi ja hammaskivi poistettua ja hampaan harjaus onnistuu paremmin. Kliinisten toimenpiteiden jälkeisellä suuhygienialla on suuri merkitys hoidon onnistumiselle, sillä bakteerien kolonisaatio hampaiden pinnalla alkaa pian toimenpiteiden jälkeen uudelleen. Tupakointi paitsi altistaa parodontiitille, myös heikentää hoitojen onnistumista merkittävästi tupakoimattomiin verrattuna. Myös ylipaino heikentää parantumista kirurgittomien toimenpiteiden jälkeen. (Graziani ym. 2017)

1.2 Biofilmi

Biofilmi (kuva 2) on bakteerien kasvu ympäristö. Biofilmin kuivamassasta usein vain alle 10 % on itse mikrobeja. Bakteerien lisäksi biofilmissä on bakteerien erittämää komponentteja kuten proteiineja, DNA:ta ja sokerimolekyylejä. Myös isäntäorganismi saattaa erittää biofilmiin materiaalia ja materiaalia vapautuu biofilmiin myös solujen hajotessa. Biofilmin mikrobit voivat käyttää biofilmin molekyylejä ravinnoksi ja DNA:ta horisontaaliseen geeninsiirtoon. Biofilmin sisältämät biopolymeerit pitävät bakteerisolut toistensa läheisyydessä, mikä mahdollistaa bakteerisolujen välisen kommunikoinnin. (Flemming ja Wingender 2010) Biofilmi voi muodostua sekä eläville että elottomille pinnoille (Hall ja Mah 2017).



Kuva 2 Bakteribiofilmi. Bakteribiofilmi koostuu bakteereista ja niiden erittämistä komponenteista. Biofilmissä on bakteereita vain noin 10 % ja niitä voi olla montaa eri lajia. Bakteerien lisäksi biofilmissä on DNA:ta, polysakkarideja ja erilaisia proteiineja. Jos kyse on patogeenisestä biofilmistä, on biofilmissä sekä bakteerien että isäntäorganismien erittämää materiaalia.

Biofilmissä elää useita mikrobilajeja yhdessä ja ihmisten suussa esiintyy noin 700 eri bakteerilajia. (Kolenbrander ym. 2010)

Biofilmissä elävät bakteerit ovat vapaana liuoksessa eläviä bakteereita vastustuskykyisempiä antimikrobisille molekyyleille kuten antibiooteille. (Hall ja Mah 2017) Biofilmi haittaa antimikrobisten aineiden tunkeutumista biofilmiin. (Costerton ym. 1999; Llama-Palacios ym. 2017) Syynä on se, että bakteribiofilmin soluväliaineen polymeerit hidastavat diffuusiota ja kaikkien aineiden liikkuminen biofilmissä on hitaampaa kuin vedessä. Antibiootin biofilmiin tunkeutumiskyky riippuu sekä antibiootista että biofilmistä, johon se on tunkeutumassa. Antimikrobinen aine saatetaan myös tehdä vaarattomaksi biofilmin uloimmissa kerroksissa ennen kuin se kulkeutuu diffuusiolla syvemmälle biofilmiin. Näin käy esimerkiksi reaktiivisille oksidanteille, mikä saattaa selittää fagosyyttisten solujen kykenemättömyyttä tuhota

biofilmin organismeja. (Costerton ym. 1999) Biofilmin soluväliaine suojaa myös immuunisoluilta (Lewis 2008).

Biofilmi on bakteerille erilainen kasvuympäristö verrattuna vapaana liuoksessa elämiseen. Biofilmissä eläminen vaikuttaa proteiinien tuotantoon. Biofilmissä bakteerilla on hitaampi aineenvaihdunta, joten aineenvaihduntaan, biosynteesiin ja kuljetukseen liittyviä proteiineja tuotetaan vähemmän ja immunogeenisiä ja virulenssia aiheuttavia proteiineja puolestaan tuotetaan enemmän kuin liuoksessa elävillä bakteereilla. (Llama-Palacios ym. 2017) Biofilmin bakteerisolut kasvavat ja jakaantuvat hitaammin kuin liuoksessa elävät bakteerisolut (Lewis 2008).

1.3 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, aiemmalta nimeltään *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, on ihmisillä ja muilla kädellisillä esiintyvä gram-negatiivinen suun patogeeni. Se kasvaa parhaiten aerobisessa ympäristössä, jossa on hiilidioksidia 5-10 %. Se on sauvabakteeri, tosin lyhyissä kasvatuksissa bakteeri esiintyy usein pyöreässä muodossa. *A. actinomycetemcomitans* on yksi parodontiittia aiheuttavista bakteereista ja on usein aiheuttamassa nimenomaan taudin vakavaa muotoa. (Henderson ym. 2002, 2010)

A. actinomycetemcomitans on yksi HACEK-ryhmän bakteereista. Ryhmän nimi tulee siihen kuuluvien sukujen alkukirjaimista. Sukuja ovat *Haemophilus*, *Aggregatibacter*, *Cardiobacterium*, *Eikenella* ja *Kingella*. Ne ovat kaikki gram-negatiivisia, hitaasti kasvavia bakteereita, jotka kolonisoivat suuonteloa. Ne voivat aiheuttaa ihmisellä tulehduksellista endokardiittia eli sydänläppien tulehdusta. (Paturel ym. 2004)

A. actinomycetemcomitans kolonisaatio vaikuttaa diabeteksen ja alkoholista riippumattoman rasvamaksan syntyyn. Potilailta mitattujen anti-*Aa* IgG vasta-aineiden määrä seerumissa korreloi positiivisesti viskeraalisen eli vatsaontelossa esiintyvän rasvan määrän, plasman insuliinin määrän paastossa ja insuliiniresistenssin kanssa. (Komazaki ym. 2017)

Yksi tärkeimmistä *A. actinomycetemcomitansin* virulenssimekanismeista on sen kyky tarttua tiukasti pinnoille (esim. hammas, lasi tai muovi) ja toisiinsa. Ilman tätä kykyä ne

eivät pystyisi kolonisaatioon. Juuri eristetyt kannat muodostavat agarille pieniä, tiukasti tarttuvaa (karkeat), tähden muotoisia pesäkkeitä. Kasvatusliuoksessa ne tarttuvat tiukasti astian pohjaan tai toisiinsa. Adheesiosta vastaavat pitkät fibrillit, jotka koostuvat 6,5 kDa Flp1-proteiineista (*engl.* fimbrial low-mol. weight protein). Tarttumiselle tärkeä geeniklusteri on *tad* (*engl.* tight adherence), joka koodaa Flp1:n eritysjärjestelmää. Laboratorio-olosuhteissa *A. actinomycetemcomitans* muuttaa fenotyyppiään ja menettää kykynsä tarttua pintoihin ja muodostaa agarille helposti irtoavia (sileitä) pesäkkeitä. (Henderson ym. 2002)

A. actinomycetemcomitansilla on myös muita virulenssitekijöitä. Näitä ovat esimerkiksi LPS (lipopolysakkaridi) ja toksiinit kuten leukotoksiinit ja CDT (*engl.* cytolethal distending toxin). Bakteerit kuten kaikki elämän muodot tarvitsevat selviytyäkseen rautaa. *A. actinomycetemcomitansilla* esiintyykin rautaa sitovia proteiineja, joilla on myös havaittu olevan virulenttisia ominaisuuksia. *A. actinomycetemcomitans* vaikuttaa myös isännän kudoksiin edistämällä osteoklastien toimintaa ja estämällä osteoblastien aktivaatiota. Jotkut kannat kykenevät myös tunkeutumaan isännän soluihin (Henderson ym. 2010). Eri *A. actinomycetemcomitansin* kantojen välillä on n.16% ero perimässään ja ne eroavat myös tuottamiensa virulenssitekijöiden osalta (Poulsen ym. 1994; Kittichotirat ym. 2016). Toiset kannat ovatkin virulentimpia kuin toiset.

Osa *A. actinomycetemcomitans* kannoista on luontaisesti kompetentteja eli kykeneviä ottamaan sisään DNA:ta. Kompetentteja kantoja on serotyypeissä a, d ja e. (Fujise ym. 2004; Kittichotirat ym. 2011)

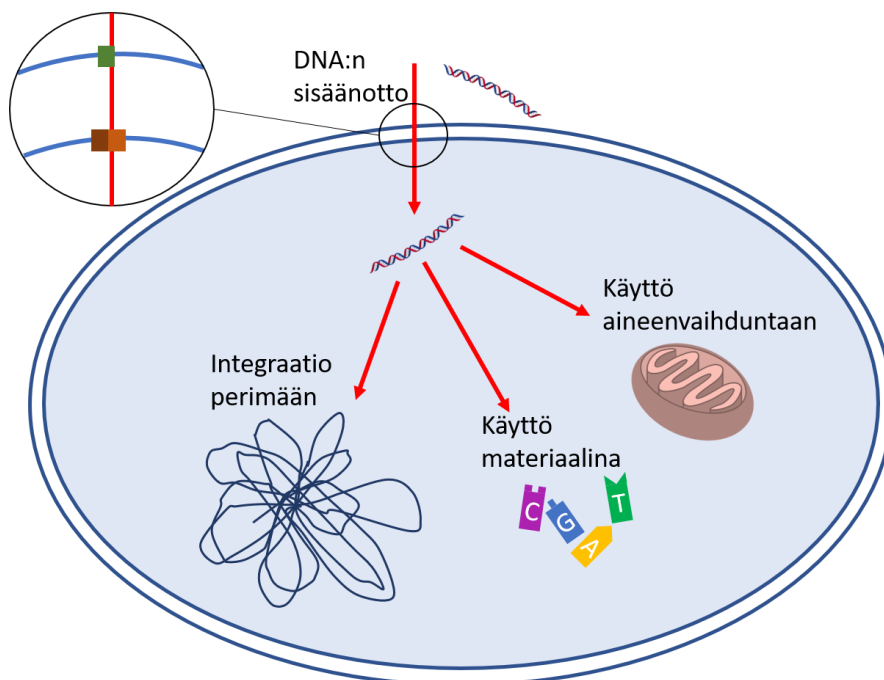
1.4 Luonnollinen kompetenssi

Kompetenttius tarkoittaa sitä, että bakteeri kykenee ottamaan ympäristöstään DNA:ta ja liittämään sen osaksi perimäänsä. Tätä tapahtumaa kutsutaan myös transformaatioksi tai horisontaaliseksi geeninsiirroksi. (Seitz ja Blokesch 2013; Munita ja Arias 2016) DNA:n rekombinaatio bakteerin genomiin voi tapahtua vain jos genomissa on liitettävän DNA:n kanssa tarpeeksi identtistä sekvenssiä. Horisontaalista geeninsiirtoa voidaan käyttää vahingoittuneen genomien korjaamiseen tai bakteerin evoluutioon. (Veening ja Blokesch 2017) Transformaation, jossa solu ottaa

ulkopuoleltaan paljasta DNA:ta, lisäksi tapoja solun ulkopuolisen DNA:n vastaanottamiselle on virusvälitteinen transduktio ja bakteerien ”seksi” eli konjugaatio. Horisontaalinen geeninsiirto on tärkein bakteerien evoluution ajaja. (Munita ja Arias 2016)

Horisontaalisen geeninsiirron avulla esimerkiksi vastustuskyky antibiooteille siirtyy bakteerilta toiselle ja on tullut maailmanlaajuisesti ongelmaksi. WHO onkin nimennyt mikrobien vastustuskyvyn antibiooteille yhdeksi 2000-luvun vakavimmista terveysuhista (Munita ja Arias 2016)

Ympäristössä oleva DNA on usein pilkkoutunutta, jolloin sitä ei voida liittää osaksi perimää. Se on myös usein peräisin luonnonvalinnan kautta kuolleista bakteereista, joiden DNA sisältää keskimääräistä enemmän mutaatioita eikä sen liittämistä perimään ole bakteerisolulle hyötyä. Luonnollista kompetenssia voidaan käyttää geneettisen muuntumisen lisäksi ravinnon hankintaan. Bakterisolun sisään otettua DNA:ta voidaan hyödyntää kierrättämällä nukleotidit bakterisolun omaan DNA-synteesiin tai käyttää metaboliaan (Veening ja Blokesch 2017). Kuvassa 3 on yhteenveto horisontaalisesta geeninsiirrosta.



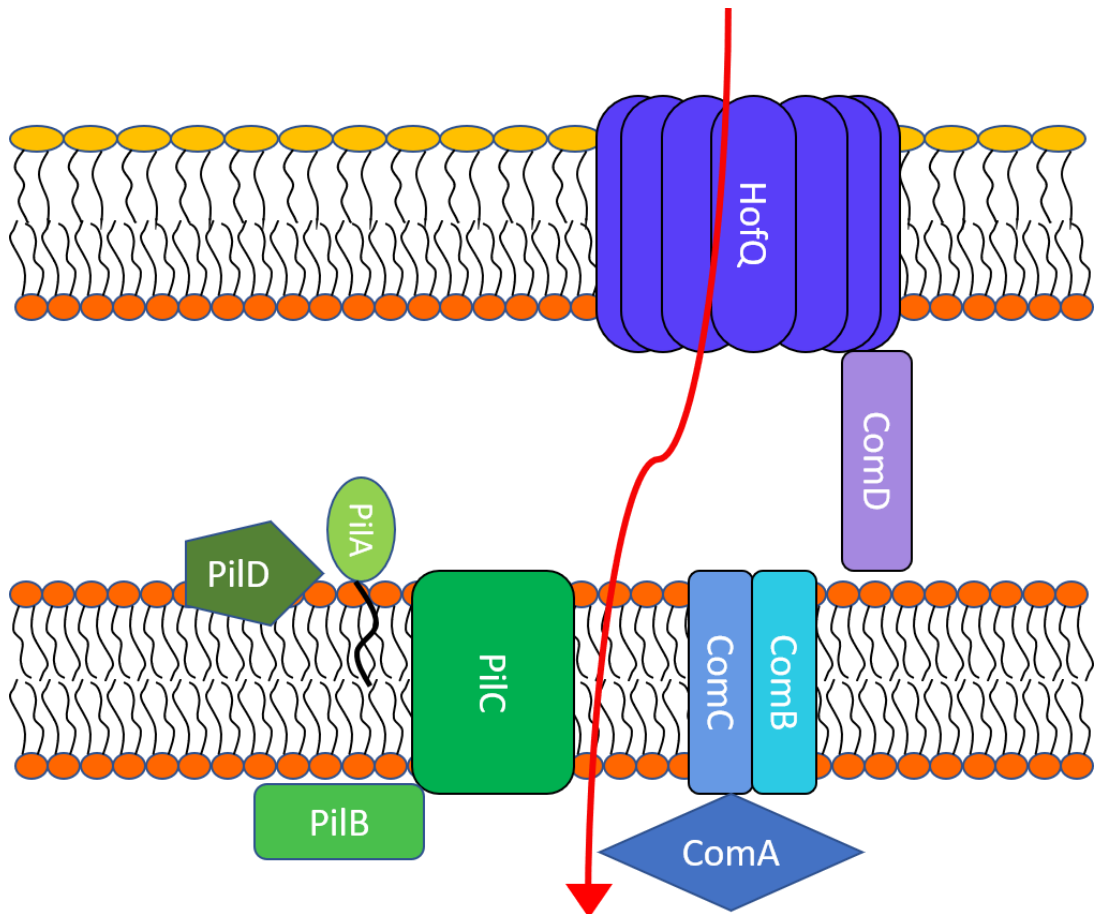
Kuva 3 Horisontaalinen geeninsiirto. Horisontaalisessa geeninsiirrosta DNA-palanen otetaan solun ulkopuolelta sisäpuolelle. Sisään otettu DNA voidaan liittää perimään jos genomista löytyy liitettävän DNA:n kanssa tarpeeksi identtistä sekvenssiä. Sisään otettu DNA voidaan myös hajottaa ja käyttää joko materiaalina uuden DNA:n muodostamiseen tai käyttää aineenvaihdunnassa. Gram-negatiivisilla bakteereilla on kaksi solukalvoa, joten myös DNA:n sisäänotto on kaksivaiheinen.

Useat ympäristön tilat voivat aktivoida bakteerin ottamaan DNA:ta solun ulkopuolelta. Tällaisia ovat muun muassa ympäristön korkea solutiheys, pH:n muutos, replikaatiostressi ja jotkin antibiootit. Jotkin bakteerit voivat myös erittää aineita, jotka tappavat muita bakteereita, jos niillä ei ole mekanismeja suojautua näitä aineita vastaan. Tällöin vapautuva DNA ei ole vielä pilkkoutunut ja sisältää useita geenejä ja genomisia saarekkeita, jotka saalistajasolu voi liittää genomiinsa. (Veening ja Blokesch 2017)

1.5 HofQ ja DNA:n sisäänotto

HofQ on *A. actinomycetemcomitansilla* ulommalla solukalvolla esiintyvä Sekretiini-perheen kanavaproteiini, joka todennäköisesti kuljettaa DNA:ta bakteerin ulomman solukalvon läpi sisään. Sekretiinit ovat superperhe homo-oligomeerisiä, tynnyrimäisiä kanavaproteiineja. (Tarry ym. 2011) HofQ:lle löytyy homologeja monilta muilta gram-negatiivisilta bakteereilta, mikä osoittaa DNA:n sisäänoton eli horisontaalisen geeninsiirron tärkeyden bakteereille (Palchevskiy ja Finkel 2006). *A. actinomycetemcomitansin* HofQ:n homologeja gram-negatiivisilla bakteereilla ovat HofQ esim. *Echerichia colilla*, ComE esim. *Haemophilus influenzaella* ja PilQ esim. *Neisseria gonorrhoeaella*. (Palchevskiy ja Finkel 2006; Tarry ym. 2011)

A. actinomycetemcomitansilla, kuten muillakin gram-negatiivisilla bakteereilla, on kaksi solukalvoa, sisempi ja ulompi, joten myös DNA:n sisäänotto soluun on kaksivaiheinen (Zijngel ym. 2012). HofQ on 12-14 monomeerin muodostama kanava ulommalla solukalvolla. Sen solukalvon ulkoisen osan (*engl.* extra-membranous domain, emHofQ) on todistettu sitovan DNA:ta (Tarry ym. 2011). Tämä viittaa siihen, että HofQ-proteiini osallistuu DNA:n sisäänottoon (Tarry ym. 2011) kuten homologit muilla gram-negatiivisilla bakteereilla (Palchevskiy ja Finkel 2006). HofQ:n siirrettyä DNA:n kalvojen väliseen tilaan Com-proteiinikompleksi yhdessä PilABCD-kompleksin kanssa siirtää DNA:n edelleen kalvojen välisestä tilasta bakteerisolun sisään (Zijngel ym. 2012). Kuvassa 4 on kuva koneistosta, jolla DNA otetaan solun sisään.



Kuva 4 HofQ:n merkitys DNA:n sisänotossa *A.actinomycetemcomitans*illa. HofQ siirtää DNA:n solun ulkopuolelta kalvojen väliseen tilaan, josta Com- ja Pil-proteiinikompleksit siirtävät ne edelleen solun sisään. Tarkkaa mekanismia ei tunneta. Punainen nuoli kuvaa DNA:n reittiä solun sisään. Kuva piirretty Zijng ym., (2012) mukaan

1.6 Sytokiinit

Sytokiinit eli tulehduksenvälittäjäaineet ovat isännän, esim. ihmisen erittämiä glykoproteiineja. Ne säätelevät immuunipuolustuksen toimintaa. Sytokiineilla solut voivat viestiä läheisille soluille (parakriininen viestintä), kaukana oleville soluille (endokriininen viestintä) ja itselle (autokriininen viestintä). Sytokiinit voivat aiheuttaa isännässä kudostuhoa, jos reaktio taudinaiheuttajaan tai muuhun tulehdusreaktion laukaisevaan tekijään on liian voimakas. Näin käy myös parodontiitissa. Toisaalta jotkut sytokiinit suojelevat kudoksia. Jotkin lääkeaineista kohdistavatkin vaikutuksensa vahingollisiin sytokiineihin. (Garlet 2010; Holdsworth ja Can 2015; Groeger ja Meyle 2019) Luukatoa esiintyy tulehduksessa, jos tulehdusta edistävät sytokiinit pääsevät kudokseen luun lähelle tarpeeksi suuressa konsentraatiossa. Tulehdusta estävillä

sytokiineilla on päinvastainen vaikutus. (Cochran 2008) Sairauden seurauksen määrää tasapaino tulehdusta edistävien ja estävien sytokiinien vaikutusten välillä (Dinarello 2000). Eri sytokiineja tuotetaan eri valkosoluissa (Akdis ym. 2016).

IFN- γ (interferon-gamma) on 20-25 kDa kokoinen dimeerinen proteiini. IFN- γ aktivoi fagosyyttiset solut kuten makrofagit (Garlet 2010; Dembic 2015a). Se edesauttaa tulehduksellisten sytokiinien tuotantoa ja aiheuttaa siten tulehdusreaktion *A. actinomycetemcomitansin* seurauksena. IFN- γ :aa esiintyy suuria määriä parodontiittisissa taskuissa (Garlet 2010). IFN- γ :aa tuottavat Th1-solut ja NK-solut (Dembic 2015a; Akdis ym. 2016). IFN- γ saa aikaan TNF- α :n (eng. tumor necrosis factor - alpha) ja IL-1 β :n (eng. interleukin -1 beta) tuotannon (Garlet 2010). Eri tutkimuksissa on saatu ristiriitaisia tuloksia siitä, stimuloiko IFN- γ osteoklastien muodostusta aiheuttaen kudostuhoa vai estääkö se osteoklastien toimintaa (Cochran 2008; Garlet 2010). Parodontiitissa IFN- γ estää osteoklastien muodostusta (Graves 2008).

TNF- α on 17 kDa kokoinen proteiini. Se esiintyy liuoksessa pääosin homotrimeerinä, jonka koko on 52 kDa. Trimeerinen muoto TNF- α :sta on noin 8 kertaa niin aktiivinen kuin monomeerinen muoto. (Smith ja Baglioni 1987) TNF- α on Th1-solujen tuottamaa (Dembic 2015b). TNF- α on merkittävä luukatoa aiheuttava sytokiini parodontiitissa (Graves 2008).

Interleukiineja (IL) on sekä kudostuhoa edistäviä (IL-8, IL-6 ja IL-1 β) että hidastavia (IL-10) (Cochran 2008; Garlet 2010). Interleukiineja tuotetaan monissa eri soluissa, niin valkosoluissa kuin kudostenkin soluissa (Dembic 2015c; Akdis ym. 2016).

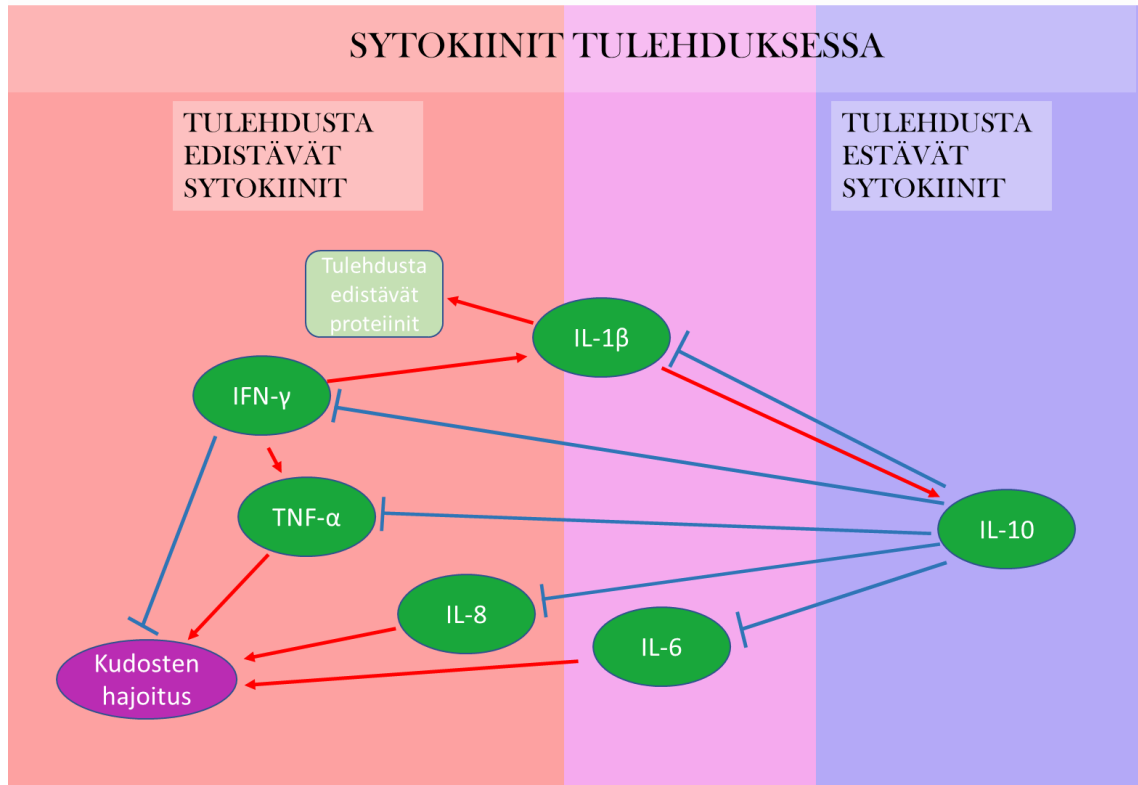
IL-10 on homodimeeri, jonka koko on 18 kDa (Dembic 2015c). Yksi monomeeri muodostuu kuudesta α -kierteestä. IL-10:tä tuottavat monet solut kuten Th1-, Th2-, Th17- ja Treg- solut, makrofagit, monosyytit ja B-solut. (Trivella ym. 2010) IL-10 on tulehdusta estävä sytokiini. Se tukahduttaa tulehdusta edistävien sytokiinien TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6 ja IL-8 tuotannon. (Dinarello 2000; Walter 2014; Dembic 2015c) IL-10 edistää T-lymfosyyttien erilaistumista Th2-soluiksi ja estää Th1-solujen kehitystä (Dembic 2015c). IL-10 estää yhdessä IFN- γ :n kanssa osteoklastien muodostusta parodontiitissa (Graves 2008).

IL-8 on pieni, n. 8,4 kDa kokoinen sytokiini/kemokiini. Se koostuu lyhyestä N-terminaaliosasta, kolmesta β -laskoksesta ja C-terminaaliosasta α -kierteestä (Baggiolini ja Clark-Lewis 1992; Dembic 2015d). IL-8 sitoutuu reseptoriinsa monomeerinä, mutta muodostaa helposti myös dimeerejä, varsinkin korkeissa pitoisuuksissa (Fernando ym. 2004). IL-8:a tuotetaan monissa niin immuunipuolustuksen kuin muissakin elimistön soluissa, suussa myös odontoplasteissa ja keratinosyyteissä (Levin ym. 1999; Akdis ym. 2016; Groeger ja Meyle 2019). IL-8 on tulehdusta edistävä sytokiini (Dinarello 2000), jonka tuotto liittyy vahvasti kudoksissa esiintyvään infektiin ja tulehdukseen (Huang ym. 1999). IL-8 on suun terveydelle tärkeä kemokiini. Se auttaa immuunisoluja siirtymään ienkudokseen ja auttaa niitä tarttumisessa. Se myös auttaa kudosten uudelleenmuodostumisessa ja verisuonten muodostumisesta (Groeger ja Meyle 2019). Terveessä ikenessä IL-8:n konsentraatiogradientti johdattaa fagosyyttiset solut kohti ientaskua, mutta parodontiittisessä kudoksessa tämä mekanismi on häiriintynyt (Tonetti ym. 1994, 1998).

IL-6 on yksiketjuinen sytokiini, joka on 21-28 kDa kokoinen glykoproteiini. Se on rakenteeltaan neljän pitkän α -kierteen muodostama nippu. (Ataie-Kachoe ym. 2014) IL-6 on tulehdusta edistävä sytokiini. Se edistää B-solujen ja Th17- ja Th22-solujen kehitystä ja jakautumista. (Demic 2015c; Akdis ym. 2016) Tulehdusta edistävien vaikutusten lisäksi IL-6:lla on myös tulehdusta estäviä vaikutuksia (Ferguson-Smith ym. 1988). IL-6:ta tuottavat muun muassa Th2-solut, monosyytit, makrofagit ja keratinosyytit (Demic 2015e; Groeger ja Meyle 2019). IL-6 aiheuttaa luun hajotusta parodontiitissa (Graves 2008).

IL-1 β tuotetaan inaktiivisessa muodossa ja aktivoidaan katkaisemalla kaspasi-1:llä. Aktiivinen IL-1 β monomeeri on kooltaan 17 kDa ja on prekursorin C-terminaaliosassa päässä. (Hailey ym. 2009) IL-1 β :aa tuottavat ainakin makrofagit ja keratinosyytit (Demic 2015c; Groeger ja Meyle 2019). IL-1 β saa aikaan tulehdusta edistävien proteiinien tuotannon ja Th17-solujen tuotannon ja edesauttaa IL-10 tuottoa (Akdis ym. 2016).

Kuten edellä nähtiin, sytokiinit jaetaan tulehdusta edistäviin ja estäviin. Sytokiinit myös vaikuttavat toisten sytokiinien tuotantoon. Kuvassa 5 on yhteenveto tässä pro gradu tutkielmassa käsitellyistä sytokiineista.



Kuva 5 Sytokiinit tulehduksessa. Eri sytokiineilla on eri tehtäviä tulehduksessa. Osa edistää tulehdusta kun taas osa estää sitä. Sytokiinit vaikuttavat toistensa expressioon. Kuvassa sininen viiva merkitsee estävää vaikutusta, kun taas punainen nuoli merkitsee edistävää vaikutusta. Tarpeeseen nähden liian suuresta tulehdusreaktiosta seuraa kudostuhoa.

1.7 Immuunireaktion alkaminen ja sytokiinien merkitys siinä

Immuunireaktio alkaa kun kudoksessa esiintyy bakteerien aiheuttamia vaurioita ja dendriittisolun esittelee pinnallaan uutta peptidiä. Niihi lymfocytti tunnistaa dendriittisolun esittelemän peptidin ja aktivoituu, jos muut tekijät kuten Th-solujen antamat signaalit ja sytokiinit suosivat aktivoitumista. Dendriittisolun tuottaa interleukiineja, jotka voivat auttaa lymfocyttia jakaantumaan. (Garlet 2010; Dembic 2015f)

Lymfocyttienä on B- ja T-lymfocyttienä. T-lymfocyttit ovat aluksi naiiveja, mutta voivat jakaantua erityyppisiksi T-lymfocyttieiksi. Eri T-lymfocyttienä ovat Th1, (T-auttaja 1, engl. T helper 1) Th2, Th9, Th17, Th22 ja Treg (T- säätelijä, engl. T regulatory). Eri lymfocyttit tuottavat eri sytokiineja. Th1 solut erittävät sytokiineja IL-2 ja IFN- γ ja Th2

solut sytokiineja IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ja IL-13. Th9-solut puolestaan tuottavat IL-9:ää, Th17 solut IL-17:ta ja Th22-solut IL-22:ta. Th1-solut usein edesauttavat tulehdusreaktiota ja liittyvät myös kudostuhoon kun taas Th2-solut estävät tulehdusreaktiota. (Garlet 2010; Dembic 2015f)

Treg-solut ovat kehittyneet normaaleista T-soluista, jotka ovat siirtyneet lepotilaan liian aikaisin. Ne eivät enää kykene auttamaan naapurisoluja kasvussa ja kehityksessä vaan päinvastoin tukahduttavat niitä. (Dembic 2015f)

T-lymfosyytit tuottavat sytokiineja. Mutta sytokiinit myös säätelevät T-lymfosyyttien toimintaa (taulukko 1). Sytokiinit IL-2, IL-12, IL-18, IL-27 ja IFN- γ vaikuttavat naiivien T-lymfosyyttien kehitykseen Th1-soluiksi. Sytokiini IL-4 puolestaan vaikuttaa Th2-solujen kehitykseen, sytokiinit IL-2, IL-4 ja TGF- β Th9 solujen kehitykseen ja TGF- β , IL-6, IL-1, IL-21 ja IL-23 Th17 solujen kehitykseen. Th22 solujen kehitystä edistävät IL-2, IL-6 ja TNF. Treg solujen kehitykseen ja selviytymiseen puolestaan vaikuttavat TGF- β , IL-10 ja IL-2. (Dembic 2015e; Deng ym. 2017)

Taulukko 1 T-soluihin liittyvät sytokiinit. Sytokiinit auttavat T-solujen erilaistumisessa. Erilaistuneet T-solut puolestaan tuottavat lisää sytokiineja. Taulukossa keskellä näkyy T-solutyypin. Solutyypin vasemmalla puolella näkyvät sytokiinit jotka edesauttavat naiivin T-solun erilaistumista kyseiseksi solutyypiksi. Solutyypin oikealla puolella puolestaan näkyvät sen tuottamat sytokiinit.

Erilaistumiseen vaikuttavat sytokiinit	Solutyyppi	Tuotetut sytokiinit
IL-2, IL-12, IL-18, IL-27 ja IFN γ	Th1	IL-12 ja IFN- γ
IL-4	Th2	IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13
IL-2, IL-4 ja TGF- β	Th9	IL-9
TGF- β , IL-6, IL-1, IL-21 ja IL-23	Th17	IL-17
IL-2, IL-6 ja TNF	Th22	IL22
TGF- β , IL-10 ja IL-2	Treg	IL-10 ja TGF- β

Dendriittisolut esittelevät antigeeneja MHC-molekyyleihin (engl. major histocompatibility complex) liittyneenä. MHC molekyylejä on kahta eri tyyppiä, I ja II. Fagosytoidut antigeenit ja niiden peptidit dendriittisolu esittelee tyyppin II MHC-

molekyylissä. CD4 T-solut tunnistavat tyypin II ja CD8 T-solut tunnistavat tyypin I MHC-molekyyliin liittyneet peptidit. (Dembic 2015f)

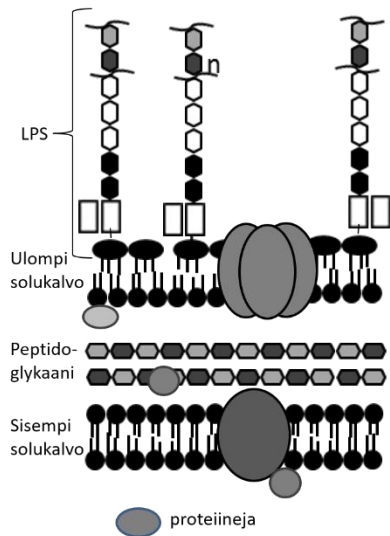
Suussa on dendriittisolujen lisäksi myös muita soluja, jotka pystyvät esittelemään antigeeneja. Ikenien epiteelissä on Langerhanssin soluja. Ne esittelevät antigeeneja tyypin II MHC-molekyyliin liitettynä. Syvemmillä ienkudoksessa on muita antigeeneja esitteleviä soluja. (Hovav 2014; Wilensky ym. 2014)

1.8 Gram-negatiivisen bakteerin solukalvon rakenne

Gram-negatiivisen bakteerin solukalvo (kuva 6) koostuu kahdesta lipidikaksoiskalvosta, sisemmästä ja ulommasta solukalvosta. Näiden kalvojen väliin jää kalvojen välinen tila, jossa sijaitsee peptidoglykaanitukiranka. (Bertani ja Ruiz 2018) Peptidoglykaani on polysakkaridiketju ja gram-positiivisilla bakteereilla se on solun uloin kerros. Gram-negatiivisilla soluilla esiintyy peptidoglykaanitukirangan päällä vielä ulompi solukalvo. (Rajagopal ja Walker 2017; Bertani ja Ruiz 2018)

Ulompi solukalvo on asymmetrinen kalvo, jonka periplasminen puoli koostuu fosfolipideistä ja solun ulkoinen puoli suurimmaksi osaksi lipopolysakkarideista (LPS). Lipopolysakkaridit koostuvat lipidiosasta ja siihen liittyneestä polysakkaridiketjusta. Ne muodostavat solun pinnalle polysakkaridikapselin, jota voidaan ajatella vielä yhtenä solukalvon kerroksena. (Benso 2017)

Ulomman solukalvon tehtävä on kontrolloida liukoisten aineiden kulkua sisään ja ulos solusta (Benso 2017). Ulomman solukalvon ansiosta gram-negatiiviset bakteerit ovat gram-positiivisia bakteereita vastustuskykyisempiä antibiooteille (Lewis 2008; Hall ja Mah 2017). Lipidien ja LPS:n lisäksi solukalvolla esiintyy proteiineja. Osa proteiineista ulottuu läpi koko ulomman solukalvon kun taas osa on solukalvoon liittyneenä ulottumatta kuitenkaan kalvon läpi. Osa proteiineista on kanavaproteiineja, jotka kuljettavat molekyylejä solukalvon läpi. (Raetz ja Whitfield 2002; Smith ym. 2015)



Kuva 6 Gram-negatiivisen bakteerin solukalvon rakenne. Gram-negatiivisella bakteerilla on kaksi solukalvoa, sisempi ja ulompi. Solukalvojen välissä on peptidoglykaanitukiranka. Ulomman solukalvon ulompi lipidikerros muodostuu LPS:stä.

1.9 LPS

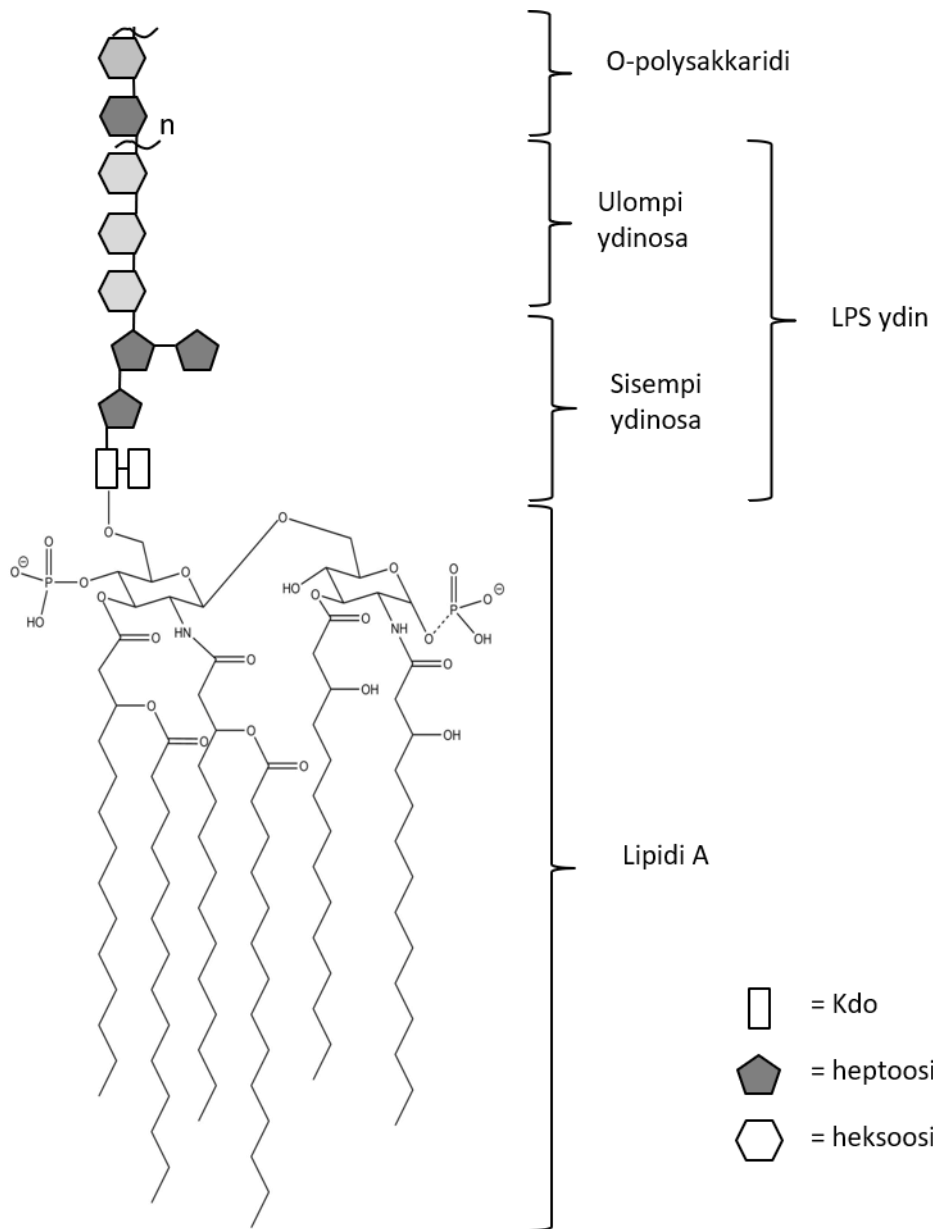
LPS on välttämätön gram-negatiivisille bakteereille. Se muodostaa ensimmäisen linjan puolustuksessa ulkoisia uhkia vastaan. Sen muodostama paksu, hydrofiilinen rakenne ja negatiivinen varaus estävät monia pieniä, hydrofobisia molekyylejä läpäisemästä solukalvoa. Näistä osa on antimikrobisia molekyylejä. (Bertani ja Ruiz, 2018)

LPS muodostaa gram-negatiivisen bakteerin uloimman kerroksen. Se on solun pinnan molekyyli, joka koostuu lipidiosasta (lipidi A) ja polysakkaridiosasta (kuva 7). Polysakkaridiketju jaetaan ydinosaan ja O-antigeenitoistojaksoon (Masoud ym. 1991; Müller-Loennies ym. 2003; Bertani ja Ruiz 2018). Ydinosa koostuu Kdo-yksiköistä (*engl.* 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid), heptooseista ja heksooseista (Heinrichs ym. 1998; Bertani ja Ruiz 2018).

Lipidi A on glykosamiinifosfolipidi ja se muodostaa suuren osan gram-negatiivisten bakteerien ulomman solukalvon ulommasta lipidikerroksesta. Eri bakteerilajeilla lipidi A:n rakenteessa on pieniä eroja. Glukosamiinirakenteeseen on eri lajeilla liittynyt eri rasvahappoja ja fosforyloinnissa voi olla vaihtelua. Eroja on myös amiinien määrissä ja glukosamiiniin joillain lajeilla kiinnittyneissä sokerirakenteissa. (Masoud ym. 1991; Raetz ja Whitfield 2002; Bertani ja Ruiz 2018) *A. actinomycetemcomitansin* lipidi A koostuu 1,6-glukosamiini disakkaridista, jonka molempiin sokereihin on liittynyt fosforiryhmät ja rasvahappoja. *A. actinomycetemcomitanssilla* yleisimmässä lipidi A:n

rakenteessa on suoraan sokerimolekyyleihin liittyneenä yhteensä neljä 3-hydroksimyristiinihappoa molempien sokerien 3-hiiliin ja aminoryhmiin. Ensimmäisen sokerin rasvahappojen 3-hiiliin on liittyneenä vielä kaksi myristiinihappoa esterisidoksella. Sokeri on s0020 resrefama, jonka 6-hiileen polysakkaridiketju on Kdo-yksiköiden välityksellä liittynyt. Rasvahappojen paikat A. *actinomyces* *comitans* lipidi A:ssa saattavat vaihdella. Lisäksi Lipidi A:ssa esiintyy jonkin verran myös palmitiinihappoa. (Masoud ym. 1991)

Ydinosa koostuu Kdo yksiköistä, heptooseista ja heksooseista. Kdo tai joissain tapauksissa sen johdannainen Ko (*engl.* *D-glycero-D-talo-oct-ulosonic acid*) on ainoa molekyyli, joka löytyy kaikista LPS:n ydinosaista (Raetz ja Whitfield 2002). Se jaetaan sisempään ja ulompaan ydinosaan. Sisemmän ydinosan rakenne on hyvin konservoitunut, mutta ulommassa ydinosassa on enemmän vaihtelua. *Escherichia coli* on Kdo-yksiköihin liittyneenä kahden heptoosin ketju, joista toisen sivuketjuna on kolmas heptoosi. Nämä kolme heptoosia muodostavan sisemmän ytimen. Ulompi ydinosa sisältää heksooseja, kuten glukooseja ja galaktooseja sekä heptoosin. (Bertani ja Ruiz 2018) Ydinosaan voidaan myös liittää fosforiryhmiä ja muita sokereita (Heinrichs ym. 1998; Raetz ja Whitfield 2002). *A. actinomyces* *comitans* ydinosassa esiintyy D-glukoosia, D-galaktoosia, *D-glycero-D-manno*-heptoosia ja *L-glycero-D-manno*-heptoosia (Masoud ym. 1991; Perry ym. 1996a). LPS:n ydinosan jälkeen on O-antigeenitoistojakso (Raetz ja Whitfield 2002; Bertani ja Ruiz 2018). O-antigeenitoistojakso on polysakkariditoistojakso, jonka rakenne määrää *A. actinomyces* *comitans* LPS:n serotyypin (Perry ym. 1996b, a; Kaplan ym. 2001; Takada ym. 2010).



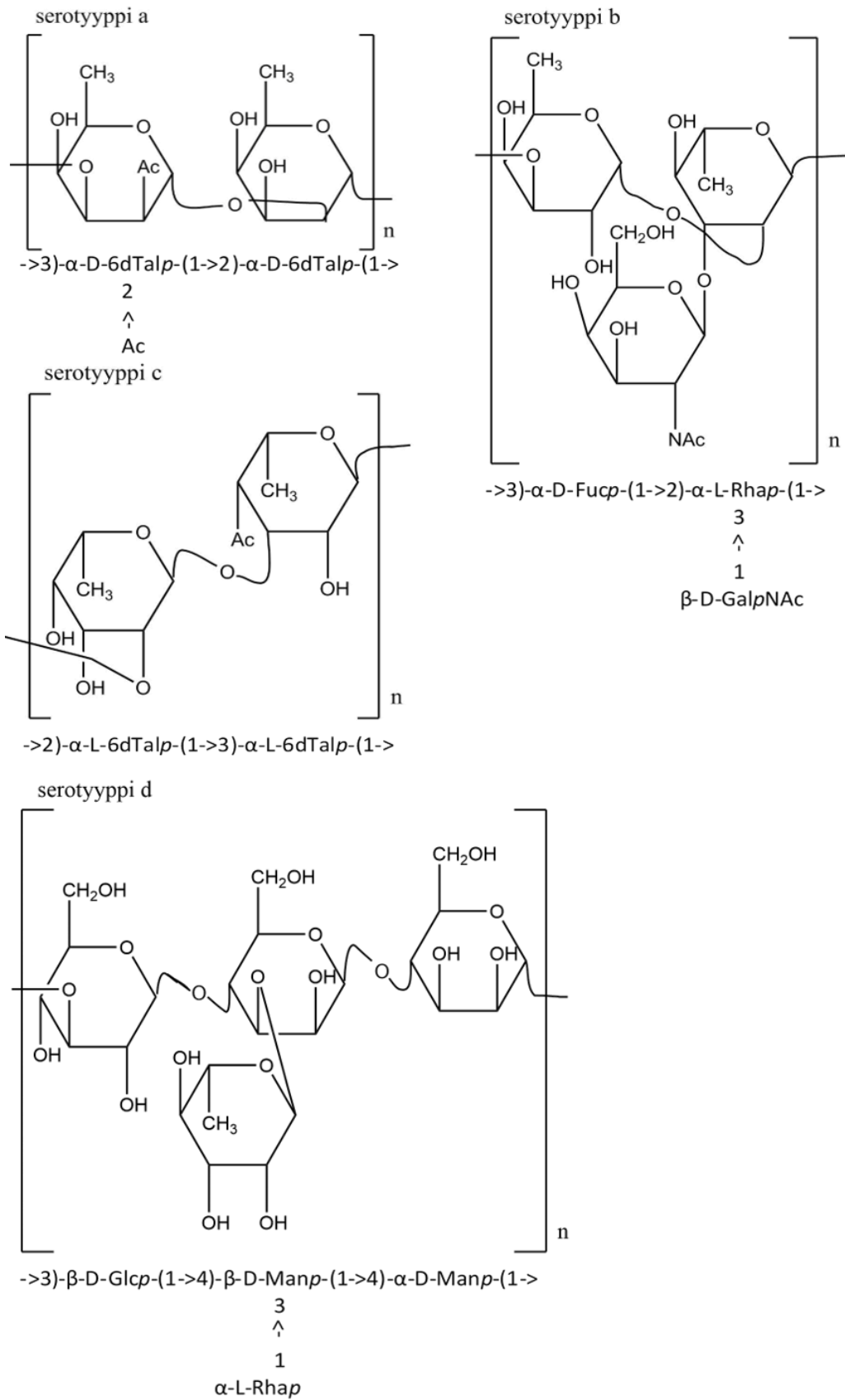
Kuva 7 LPS:n rakenne. LPS-koostuu lipidi A:sta, ydinosa ja O-polysakkaridista. Lipidi A on glukosamiinifosfolipidi, joka koostuu A. actinomycetemcomitansilla 1,6-glukosamiini disakkaridista, siihen liittyneistä neljästä 3-hydromyristiinihaposta ja niihin liittyneistä kahdesta myristiinihaposta. Disakkaridin molempiin sokereihin on liittynyt lisäksi kaksi fosfaattimolekyyliä. Lipidi A:han on liittynyt edelleen ydinosa, joka koostuu kahdesta Kdo-yksiköstä, heptooseista ja heksooseista. Ydinosa jaetaan sisempään ja ulompaan ydinosaan. Näistä sisemmän osan rakenne on konservoituneempi kuin ulomman ydinosan, jonka rakenne vaihtelee enemmän niin eri bakteerilajien välillä kuin lajien sisälläkin. A. actinomycetemcomitansin ydinosa koostuu D-glukooseista, D-galaktooseista, D-glycero-D-manno-heptooseista ja L-glycero-D-manno-heptooseista. Ydinosan jälkeen on O-antigeeni, joka on polysakkaridiketju, joka koostuu oligosakkariditoistojaksosta. LPS:ssä O-polysakkaridin rakenne vaihtelee eniten niin eri bakteerilajien välillä kuin lajien sisällä eri kantojen välilläkin. O-polysakkaridin rakenne määrää A.actinomycetemcomitansin serotyypin.

1.9.1 *A. actinomycetemcomitansin* LPS:ää on seitsemää eri serotyyppiä

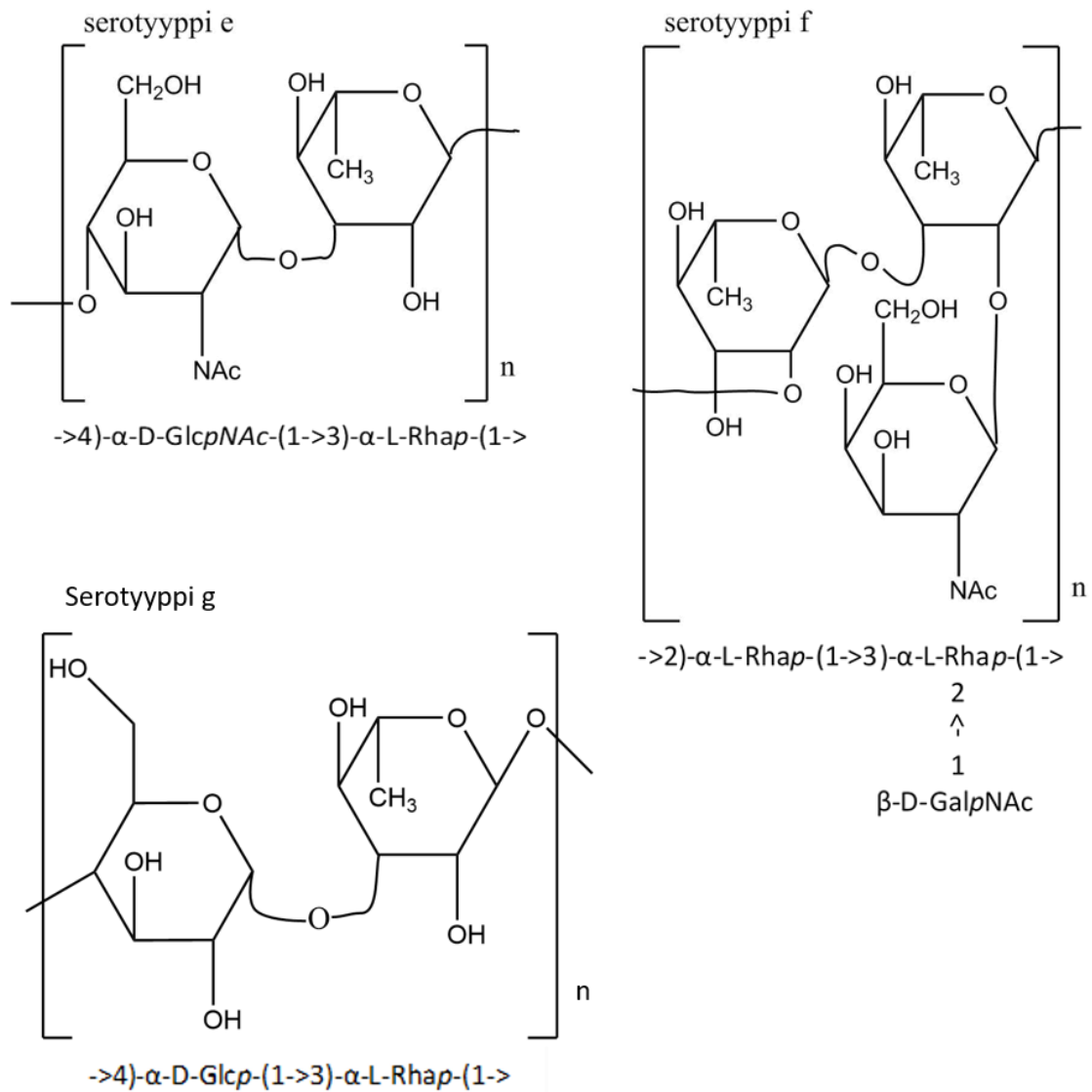
A. actinomycetemcomitansia on tunnistettu seitsemää eri serotyyppiä, a-g (Perry ym. 1996b, a; Kaplan ym. 2001; Takada ym. 2010). Lisäksi on serotyypittömiä kantoja (Kanasi ym. 2010). Serotyyppi määritetään serotyypispesifisellä PCR:llä tai immunoblottauksella käyttäen serotyypispesifisiä vasta-aineita (Kaplan ym. 2001; Kanasi ym. 2010).

Eri alueilla parodontiittipotilailta eristetyissä näytteissä esiintyy *A. actinomycetemcomitanssin* eri serotyyppijä eri suhteissa. Suomessa esiintyy eniten serotyyppiä c (36 %), seuraavaksi eniten serotyyppiä b ja kolmanneksi serotyyppiä a. Neljää muuta serotyyppiä esiintyy huomattavasti vähemmän. (Pietiäinen ym. 2018) Yhdysvalloissa esiintyy puolella potilaista serotyyppiä c, neljäsosalla serotyyppi a, serotyyppiä b oli kolmanneksi eniten ja loppuja serotyyppijä esiintyy huomattavasti vähemmän (Chen ym. 2010a) Aasialaisilla esiintyy paljon muualla harvinaisia serotyyppijä. Korealaisilla esiintyy eniten serotyyppiä c (60 %) ja seuraavaksi eniten yleensä harvinaista serotyyppiä d (20 %) (Kim ym. 2009). Japanilaisilla puolestaan esiintyy eniten yleensä harvinaista serotyyppiä e (47 %), seuraavaksi eniten serotyyppiä c (41 %) ja kolmanneksi eniten serotyyppiä d (25 %) (Yoshida ym. 2003). Yksilöllä on usein vain yhden serotyypin infektio, mutta on mahdollista että samalla yksilöllä on myös useiden serotyyppien *A. actinomycetemcomitansseja* (Yoshida ym. 2003; Chen ym. 2010a; Pietiäinen ym. 2018).

O-antigeenitoistojakson rakenne määrää *A. actinomycetemcomitansin* serotyypin. O-antigeeni on sakkariditoistojakso, usein disakkariditoistojakso. (Perry ym. 1996a, b; Kaplan ym. 2001; Takada ym. 2010) Kuvissa 8 ja 9 näkyy eri serotyyppien rakenteet. Toistojakso koostuu yleensä kahdesta sakkaridista kuten serotyypeillä a, c, e ja g. Näihin saattaa olla liittyneenä joko N-asetyyliiryhmä, kuten serotyypillä a, tai kolmas sokeri, kuten serotyypeillä b ja f. Ainoastaan d-serotyypillä on rakenteessaan trisakkariditoistojakso, johon on vielä liittynyt sivuketjuna neljäs sokeri. Kaikkien serotyyppien LPS:issä esiintyvät sokerit ovat kuusihiilisiä pyranooseja, eli rengasmuodossaan esiintyviä sokereita. (Perry ym. 1996b, a; Kaplan ym. 2001; Takada ym. 2010)



Kuva 8 Serotyyppien a-d rakenteet. Kuvassa on serotyyppien a-d O-polysakkaridien rakenteet. Rakennekuvan alapuolella on ilmoitettu yksinkertaisemmassa muodossa rakenteessa esiintyvät sokerit ja niiden liittyminen toisiinsa.



Kuva 9 Serotyyppien e-g rakenteet. Kuvassa on serotyyppien e-g O-polysakkaridien rakenteet. Rakennekuvan alapuolella on ilmoitettu yksinkertaisemmassa muodossa rakenteessa esiintyvät sokerit ja niiden liittyminen toisiinsa.

a-serotyypin disakkariditoistojakso koostuu kahdesta $\alpha\text{-D-6}$ deoxytalopyranoosista, jotka ovat liittyneet toisiinsa 1- \rightarrow 3- ja 1- \rightarrow 2-sidoksilla. Näistä ensimmäisessä esiintyy myös asetylaatiota 2-hiilessä. (Perry ym. 1996b) Serotyyppillä b toistojakso muodostuu $\alpha\text{-D-fucopyranoosista}$ ja $\alpha\text{-D-rhamnopyranoosista}$, jotka ovat liittyneet toisiinsa 1- \rightarrow 3 ja 1- \rightarrow 2 sidoksilla. Rhamnoosin 3-hiileen on liittynyt 1-hiilestään kolmas monosakkaridi, $\beta\text{-D-N-asetyyligalaktosamiini}$. (Perry ym. 1996a) Serotyyppillä c puolestaan toistojakson muodostaa kaksi $\alpha\text{-L-6-deoxytalopyranoosia}$, jotka ovat liittyneet toisiinsa 1- \rightarrow 2- ja 1- \rightarrow 3-sidoksilla. Serotyyppi d:n toistojakso on muita serotyyppijä pidempi. Se koostuu $\beta\text{-D-glukopyranoosista}$, $\beta\text{-D-mannopyranoosista}$ ja $\alpha\text{-D-mannopyranoosista}$, jotka ovat liittyneet toisiinsa 1- \rightarrow 3, 1- \rightarrow 4 ja 1- \rightarrow 4 sidoksilla. $\beta\text{-D-mannopyranoosin}$ 3-hiileen on

liittynyt 1-hiilestään neljäs monosakkaridi, α -L-Rhamnopyranoosi. Serotyyppi e koostuu α -D-N-asetyyli-glucosamiinista ja α -L-rhamnopyranoosista, jotka ovat liittyneet toisiinsa 1->4 ja 1->3-sidoksilla. (Perry ym. 1996b) Serotyyppi f koostuu kahdesta α -L-rhamnopyranoosista, jotka ovat liittyneet 1->2 ja 1->3 sidoksilla toisiinsa. Jälkimmäisen 2-hiileen on liittynyt 1-hiilestään kolmas sokeri, β -D-N-asetyyli-galaktosamiini. (Kaplan ym. 2001) Serotyyppi g muodostuu α -D-glycopyranoosista ja α -L-rhamnopyranoosista, jotka ovat liittyneet toisiinsa 1->3 ja 1->4 sidoksilla toisiinsa (Takada ym. 2010).

1.9.2 LPS:n rooli infektiossa

Bakteerin pinnalla esiintyvä LPS on merkittävässä roolissa infektiossa. LPS indusoi tulehdusta edistävien sytokiinien tuotannon monissa ihmisen soluissa. (Levin ym. 1999; Díaz-Zúñiga ym. 2014, 2015; Yang ym. 2019)

Odontoplastit ovat ensimmäisiä suun soluja, jotka kohtaavat suun patogeeneit. *Echerichia colin* LPS:llä tehdyssä tutkimuksessa LPS sai aikaan sen, että odontoplastit aktivoituivat tuottamaan tulehdusta edistävää kemokiinia IL-8. (Levin ym. 1999)

Hiirikokeissa LPS:n on todettu ientaskuun annosteltuna aiheuttavan ienten vetäytymisen. LPS ei kuitenkaan aiheuttanut tulehdusta ikeniin. Tutkimuksessa käytetty LPS oli todennäköisesti *P. gingivaliksen*, mutta sitä ei tutkimuksessa yksiselitteisesti kerrottu. (Scanu ym. 2019)

LPS saa aikaan osteoklastien jakautumisen ja aiheuttaa siten luun hajotusta. Osteoklastien jakaantumisen aktivoi nimenomaan LPS:n lipidi A, jonka rakenne on hyvin konservoitunut ja parodontiitissa sekä *P. gingivalis*, *P. intermedia* ja *A. actinomycetemcomitans* voivat aktivoida tämän jakaantumisen. (Ito ym. 1996) B-solut aiheuttavat luukatoa, mutta myös T-solut pystyvät edistämään LPS:n indusoimaa luun hajotusta B-solujen puuttuessa (Garlet 2010).

Luun hajotuksen lisäksi LPS aktivoi myös päinvastaisen tapahtuman. NG2⁺-solut ovat multipotentteja eli ne voivat jakaantua sekä adiposyyteiksi eli rasvasoluiksi että odontoplasteiksi. LPS-induktion seurauksena ihmisen hampaan ytimen NG2⁺-solujen lisääntyminen, liikkuminen ja odontoplastinen jakautumiskyky lisääntyvät. Odontoplastit muodostavat uutta hammasta, joten ne auttavat hammasvaurion korjaamisessa. (Bleicher 2014; Yang ym. 2019)

LPS:llä ja nimenomaan LPS:n O-polysakkaridilla on tärkeä rooli leukotoksiinien erityksessä. Ehjä O-polysakkaridi on tärkeä Tol-C riippuvaisen leukotoksiinien erityskoneiston toiminnalle. *A. actinomycescomitans* b-serotyypillä tehdyssä tutkimuksessa O-polysakkaridin muuttaminen, niin että siitä puuttuivat D-GalpNAc ja L-Rhap, vaikutti leukotoksiinien eritykseen. O-polysakkaridin muokkaamisella oli vain pieni vaikutus ulomman solukalvon kalvoproteiinien, kuten TolC:n, määrään. Membraaniin liittyvien leukotoksiinien määrä kasvoi ja bakteerien kasvatusmediumin leukotoksiinien määrä puolestaan väheni muokkaamisen seurauksena. (Tang ym. 2012)

Eri rakenteiden myötä eri serotyypin välillä on eroa myös siinä miten ne vaikuttavat ihmisen immuunisoluihin. Serotyypit a-c ovat kaikkein yleisimmät (Henderson ym. 2010). Niistä b-serotyyppi on kaikkein aggressiivisin ja aiheuttaa usein suurimman vasteet ihmisen immuunisolussa (Díaz-Zúñiga ym. 2014, 2015, 2017; Alvarez ym. 2015; Melgar-Rodríguez ym. 2016).

Suomen väestössä tehdyssä tutkimuksessa potilailla, joilla oli serotyypin b tai c *A. actinomycescomitans*, esiintyi muita serotyyppijä enemmän sepelvaltimotautia ja oli todennäköisemmin merkittävä ahtauma valtimossa. (Pietiäinen ym. 2018) Samassa tutkimuksessa havaittiin *A. actinomycescomitans* määrän syljessä ja ikenen alapuolella, hampaan vieressä (subgingivaalisessa tilassa) olevan korkein potilailla, joilla oli serotyypin c infektio. Seerumissa olevien *A. actinomycescomitans* spesifisten IgA ja IgG tyypin vasta-aineiden määrät olivat suurimmat potilailla, joilla oli serotyypin b tai c infektio. (Pietiäinen ym. 2018)

1.9.3 LPS:n eri serotyypin aiheuttama vaste ihmisen eri immuunisolussa

Eri T-lymfosyytit tuottavat eri transkriptionsäätelijöitä ja interleukiineja. (Dembic 2015f) Näiden määriä mittaamalla voidaan selvittää, onko kyseistä solutyyppiä läsnä eli onko kyseinen solutyyppi aktivoitunut bakteerin vaikutuksesta (Díaz-Zúñiga ym. 2014, 2015, 2017; Alvarez ym. 2015).

Kun dendriittisoluja tai dendriittisoluja yhdessä naiivien T-lymfosyyttien kanssa ärsytetään serotyypeillä a-c, ne tuottavat Th1-soluihin liittyviä sytokiineja sekä Th1 transkriptionsäätelijää, T-bet. Vaikutus on havaittavissa sekä bakteereilla että LPS:llä stimuloituissa soluissa. LPS saa siten aikaan naiivien T-lymfosyyttien muuttumisen

Th1-soluiksi. Serotyypillä b on serotyyppejä a ja c tilastollisesti merkitsevästi suurempi vaikutus. (Díaz-Zúñiga ym. 2014, 2015; Alvarez ym. 2015)

Kun naiiveja T-lymfosyyttejä ärsytetään LPS:llä yhdessä dendriittisolujen kanssa, Th2 liittyvää sytokiinia IL-4 tuotetaan hieman indusoimattomia enemmän. Th2 transkriptionsäätelijän GATA3:n määrissä puolestaan ei havaittu muutosta. Serotyyppien välillä ei ollut havaittavissa merkittäviä eroja. LPS voi siis mahdollisesti saada aikaan pienen Th2 solujen lisääntymisen. (Alvarez ym. 2015; Díaz-Zúñiga ym. 2015)

Ärsytettäessä dendriittisoluja eri serotyyppien bakteereilla tai LPS:illä ne eivät tuota Th9 liittyviä sytokiineja. Kun naiiveja T-lymfosyyttejä puolestaan ärsytetään yhdessä dendriittisolujen kanssa eri serotyypeillä, tuottavat T-lymfosyytit b-serotyypillä indusoitaessa IL-9:ää merkitsevästi indusoimattomia ja muilla serotyypeillä indusoituja soluja enemmän. Vaikutus oli havaittavissa sekä bakteereilla että LPS:llä indusoitaessa. Serotyypin b LPS auttaa siis hieman Th9-solujen muodostumista. (Díaz-Zúñiga ym. 2017)

A. actinomycetemcomitansin ja sen LPS:n serotyypit a-c saavat dendriittisolut ja dendriittisolujen kanssa stimuloitua naiivit T-lymfosyytit tuottamaan Th17-soluihin liittyviä sytokiineja sekä Th17 transkriptionsäätelijää RORC2:sta. Serotyypillä b stimuloitaessa vaikutus on merkitsevästi muita serotyyppejä suurempi. LPS-indusoinnin seurauksena naiivit T-lymfosyytit siis jakautuvat Th17 soluiksi. (Díaz-Zúñiga ym. 2014, 2015; Alvarez ym. 2015)

Dendriittisolujen ja naiivien T-lymfosyyttien ja dendriittisolujen yhdessä indusoiminen *A. actinomycetemcomitansin* tai sen LPS:n serotyypeillä a-c lisää Th22 liittyvien sytokiinien määrää. Erityisen merkittävä sytokiinien tuotannon lisäys on serotyypillä b ja ero serotyyppeihin a ja c onkin tilastollisesti merkitsevä. Naiivit T-lymfosyytit siis erilaistuvat Th22-lymfosyyteiksi LPS:n vaikutuksesta (Díaz-Zúñiga ym. 2017)

Treg solujen transkriptionsäätelijää Foxp3 ja Treg liittyvää sytokiinia IL-10 tuotetaan serotyypeillä a-c indusoiduissa soluissa vain vähän enemmän kuin indusoimattomissa soluissa. LPS-stimulaatio ei siis juurikaan lisää Treg-lymfosyyttien määrää (Alvarez ym. 2015; Díaz-Zúñiga ym. 2015)

T-lymfosyytit tuottavat sytokiinien lisäksi myös monia kemokiineja ja niiden reseptoreita vastauksena stimulaatioon *A. actinomycescomitansin* eri serotyypeillä. Kemokiinien ja niiden reseptorien määrät lisääntyivät erityisesti serotyypillä b stimuloitaessa. Poikkeuksen muodostivat CCL1 ja CCR3, joita tuotettiin eniten serotyypin a stimulaatiossa. Osaan tutkittujen kemokiinien ja niiden reseptorien määriin LPS-stimulaatio ei vaikuttanut eikä eri serotyyppien välillä ollut merkittäviä tilastollisia eroja. (Alvarez ym. 2015)

A. actinomycescomitansin serotyypit a-c saavat aikaan myös osteoklastien aktivoitumisen immuunisolujen välityksellä. LPS-stimulaation seurauksena Th17-solut tuottavat enemmän RANKL:a (*engl.* receptor activator of nuclear factor- κ B ligand), joka osallistuu osteoklastien erilaistumiseen ja aktivoitumiseen. Serotyypillä b stimuloitaessa RANKL tuotto oli merkitsevästi suurempi kuin serotyyppien a ja c stimulaatiossa. (Melgar-Rodríguez ym. 2016)

Infektoivan *A. actinomycescomitansin* serotyyppi saattaa vaikuttaa myös muisti T-solujen syntymiseen. Melgar-Rodríguez ym., (2016) tekemässä tutkimuksessa löytyi parodontiittipotilailta useimmin serotyypille b reaktiivisia muisti T-soluja. Tutkimuksen potilasmäärä oli kuitenkin niin pieni, että tuloksista ei voi vetää varmoja johtopäätöksiä. (Melgar-Rodríguez ym. 2016)

Samalla yksilöllä voi olla yhden serotyypin infektion sijasta useiden serotyyppien infektio. Voisi ajatella, että tämä mahdollisesti lisääisi infektion aiheuttamaa immuunivastetta. Näin ei kuitenkaan välttämättä ole. Rojas ym., (2018) tekemässä tutkimuksessa tutkittiin *A. actinomycescomitansin* serotyyppien a-c vaikutusta dendriittisolujen erittämien sytokiinien ja kemokiinien määrään. Tutkimuksessa havaittiin, että serotyyppi a alentaa serotyypin b aiheuttamaa immuunivastetta. Vaikutus havaittiin sekä LPS- että bakteeristimulaatiossa. Serotyypillä c ei havaittu vastaavaa. Tutkimuksen mukaan näyttäisi siltä että serotyyppi a aktivoi Th2-lymfosyyttivasteen ja estää Th1/Th17-vastetta. (Rojas ym. 2018)

Tarkemmat tiedot immuunisolujen LPS-stimulaation seurauksena tuottamista sytokiineista, kemokiineista ja muista proteiineista näkyy taulukossa 2. Yhteenvetona

voidaan todeta, että LPS-saa aikaan naiivien T-lymfosyyttien muuttumisen Th1, Th17 ja Th22 lymfosyyteiksi, mutta ei juurikaan aktivoi Th2, Th9 ja Treg erilaistumista.

Taulukko 2 Eri solujen aiheuttamat LPS vasteet. Taulukossa on vedetty yhteen eri solujen tuottamat vasteet, jotka ne tuottavat LPS-stimulaation seurauksena. Eri tutkimuksissa on saatettu käyttää stimulaatioon joko eri serotyypin LPS:ää ja/tai *A. actinomycetemcomitansia*

solutyyppi a	ala- tyyppi b	sytokiini/proteiini c	muutos d	serotyyppi e	tutkimus f
odontoplastit		IL-8	+	<i>E. coli</i>	(Levin ym. 1999)
dendriittisolut		IL-1 β , IL-12, IFN- γ , TNF- α (Th1)	+	b , a, c	(Díaz-Zúñiga ym. 2014)
		IL-6, IL-23 (Th17)	+	b , a, c	
		IL-10 (Treg)	0		
		IL-4, TGF- β (Th9)	0		(Díaz-Zúñiga ym. 2017)
		IL-6, TNF- α (Th22)	+	b , a, c	
T-lymfosyytit (yhdessä dendriittisolujen kanssa)	Th1	IL-1 β , IL-12, IFN- γ , TNF- α , (ts) T-bet	+	b , a, c	(Díaz-Zúñiga ym. 2015)
	Th2	IL-4	pieni +	a, b, c	(Díaz-Zúñiga ym. 2015)
		(ts) GATA3	0		(Díaz-Zúñiga ym. 2015)
	Th9	IL-9	pieni +	b	(Díaz-Zúñiga ym. 2017)
	Th17	IL-6, IL-17A, IL-21, IL-23, (ts) RORC2	+	b , a, c	(Díaz-Zúñiga ym. 2015)
		(p) RANKL (osteoklastit)	+	b , a, c	(Melgar-Rodríguez ym. 2016)
	Th22	IL-22	+	b , a, c	(Díaz-Zúñiga ym. 2017)
	Treg	IL-10, (ts) Foxp3	pieni +	a, b, c	(Díaz-Zúñiga ym. 2015)
		CCL2, CCL3, CCL5, CCL20 ja CCL28 ja CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CCR7, CCR9 ja CCR10		b	(Alvarez ym. 2015)
		CCL1 ja CCR3		a	
	CCL11, CCL17, CCL25, CCR4 ja CCR8		0		

a) Tutkimuksessa käytetty solutyyppi

b) Käytetyn solutyypin alatyyppi, jos kyseisellä solutyypillä on alatyyppejä, joita tutkimuksessa on tutkittu

c) Solun tuottamat sytokiini, kemokiini, transkriptionsäätelijä tai muu proteiini. (ts) proteiinin edessä tarkoittaa transkriptionsäätelijää ja (p) muuta proteiinia. Jos proteiinien perässä on suluisia jokin solutyyppi, tarkoittaa se solua, jonka kehittymistä/jakautumista kyseinen proteiini edistää.

d) Muutos, jonka stimulaatio on aiheuttanut (0=ei muutosta, +=lisääntynyt tuotto)

e) Serotyyppi, jolla muutos on havaittu, mikäli tutkimus on vertailut eri serotyyppejä. Tutkimuksissa on käytetty vain serotyyppejä a-c. Mikäli sarakkeessa näkyy useita serotyyppejä joista yksi on lihavoitu, tarkoittaa se sitä, että vaikutus on havaittu kaikilla merkityillä serotyypeillä mutta kyseisellä serotyypillä vaikutus on ollut muita serotyyppejä tilastollisesti merkitsevästi suurempi.

f) Tutkimus, jossa vaikutus on havaittu

1.10 Työn tavoitteet

Parodontiitti on vaikea ja monimuotoinen sairaus, jota esiintyy maailmanlaajuisesti (Pihlstrom ym. 2005). Se ei vaikuta ainoastaan paikallisesti vaan myös systeemisesti aiheuttaen yksilössä muun muassa sydänsairauksien, diabeteksen ja raskauskomplikaatioiden syntymistä (Henderson ym. 2010; Komazaki ym. 2017). Tämän vuoksi sairauden mekanismien ymmärtäminen on tärkeää, jotta voidaan kehittää parannuskeinoja. *A. actinomycetemcomitans* on mukana usein nimenomaan taudin vakavissa muodoissa joten sen tutkiminen voi auttaa meitä saavuttamaan tämän tavoitteen.

Työn tavoitteena oli selvittää tapoja, joilla bakteerisolu ottaa sytokiineja, kuten IL-8:aa, sisään ja siten aistii aiheuttamaansa tulehdusta. DNA kuljetetaan bakteerisoluun todennäköisesti HofQ-proteiinin kautta (Palchevskiy ja Finkel 2006; Tarry ym. 2011), ja nyt mietittiin, voisiko HofQ osallistua myös sytokiinien sisäänottoon. Haluttiin myös selvittää, mihin osaan HofQ-proteiinissa IL-8 sitoutuu ja mitkä ovat sitoutumiselle merkittäviä aminohappoja. Gram-negatiivisen bakteerisolun pinta on täynnä lipopolysakkarideja, joten haluttiin myös selvittää mikä niiden vaikutus sytokiinien sisäänotossa on. IL-8:n sitoutuminen LPS:oli huomattu jo aiemmin ja sitä haluttiin selvittää lisää. Työssä tutkittiin eri sytokiinien sitoutumista eri Aa-kannoista eristettyyn LPS:ään ja sitoutumisen riippuvuutta LPS:n serotyypistä.

2. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

2.1 LPS

LPS:ää eristettiin useista eri *A. actinomycetemcomitans* -kannoista, kuutta eri serotyyppiä, sekä vertailun vuoksi myös kahdesta muusta bakteerista *E.colista* ja *P.aeruginosasta* (taulukko 3). Käytetyt *A. actinomycetemcomitans* -kannat olivat sileitä, jotta ulkokalvon adheesioproteiineista ei tulisi eristettyyn LPS:ään proteiinikontaminaatiota.

Taulukko 3 Bakterikannat, joista eristettiin LPS:ää. Työssä vertailtiin eri *A. actinomycetemcomitans* -kantoja, vertailun vuoksi käytettiin myös *P.aeruginosaa* ja *E. colia*.

serotyyppi	kanta	viite
a	D7S Δflp1	(Wang ja Chen 2005; Chen ym. 2010b)
	SUNY ab75	ATCC 43717
	SA3138	(Asikainen ym. 1995)
b	Y4	ATCC 43718
	HK1651	ATCC 700685
	S23A	(Huang ym. 2013)
c	NCTC9710	ATCC33384
	SA1151	(Asikainen ym. 1995)
	SA1216	(Asikainen ym. 1995)
d	SA492	(Saarela ym. 1992)
	O75U	(Claesson ym. 2017)
e	173	(Höglund Åberg ym. 2013)
f	Tr.GU 17-4	(Kanasi ym. 2010)
<i>P.aeruginosa</i>		ATCC 27853
<i>E.coli</i> XL1-Blue		Agilent Technologies, #200249

2.1.1 LPS:n eristys

Aggregatibacter actinomycetemcomitansia kasvatettiin TSA-maljoilla (3,7 % (w/v) tryptone soy agar (LAB), 0,3 % (w/v) agar (LAB)), joissa 5 % (v/v) defibrinoitu lampaan veri kynttiläpurkissa, vähähappisissa olosuhteissa, 37 °C:ssa kolme päivää. *P.aeruginosa* (ATCC 27853) ja *E.coli* (XL1-Blue) bakteereita kasvatettiin TSA+lampaan veri -maljoilla yksi päivä 37 °C:ssa. Solut kerättiin ja suspensoitiin 24 ml:aan PBS:ää (2,7 mM KCl, 1,8 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,4). Solut hajotettiin jäällä sonikoimalla (12 µm amplitudi, 5x30 s tai kunnes solut olivat silmämääräisesti

hajonneet). Hajoamattomat solut ja liukenematon solujäte sentrifugoitiin pohjaan (1700 g, 20 min, +4 °C - +10 °C). Supernatantista ultrasentrifugoitiin kalvot pohjaan 100 000 g 1 h, +4 °C-+10 °C, 50.2Ti roottori (Optima™ L-90K Ultracentrifuge, Beckman Coulter)). Kalvot (pelletti) käsiteltiin 45 ml 1 % N-Lauroyl-sarcosiinilla huoneenlämmössä 1-2 h. Ulommat solukalvot ultrasentrifugoitiin pohjaan 100 000 g, 1 h, +4 °C - +10 °C, 50.2Ti roottori).

LPS saatiin erilleen ulommasta solukalvosta 800 µl:lla hajotuspuskuria (5 % (v/v) 2-merkaptetaanoli, 2 % SDS (w/v), 10 % (v/v) glyseroli, 0,125 M Tris-HCl, pH 6.8) inkuboimalla näytettä 100 °C:ssa, 10 min tai kunnes pelletti oli kokonaan liuennut. Proteiinit pilkottiin proteinaasi K:lla (100 µg/ml (Thermo Scientific) 60 °C:ssa 90 min). LPS:ää puhdistettiin vielä saostamalla: Suspensioon lisättiin 1/10 tilavuutta 3 M natrium asetaattia, pH 5.2 ja saostettiin LPS 2x tilavuutta jääkylmää etanolia (ETAX A) yli yön -20 °C:ssa. Sentrifugoitiin 16 000 g, 10 min, +4 °C. Liuotettiin pelletti 800 µl:aan 50 mM Tris-HCl, 100 mM natrium asetaatti, pH 8.0 ja saostettiin LPS 2x tilavuutta jääkylmää etanolia (ETAX A) 20 min, -80 °C:ssa. Sentrifugoitiin 16 000 g, 10 min, +4 °C. Kuivattiin pelletti Speedvacilla (V-AL, 30 °C). LPS-pelletti liuotettiin steriiliin MQ-veteen. Säilytettiin LPS:ää -20 °C:ssa.

Mitattiin LPS pitoisuudet ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kitillä (GenScript). Reaktiutilavuus mittauksissa puolitettiin, laimennosten tekoon käytettiin tavallisia eppendorf-putkia ja standardisuorana käytettiin 0-0,25 Eu/ml. Jatkossa LPS:llä tehtäviin kokeisiin laimennoksia laskettaessa LPS-pitoisuuksia verrattiin NCTC9710-kannasta eristettyyn LPS:ään, joka oli jokaisessa pitoisuusmittauksessa mukana. Tällä pyrittiin minimoimaan eri mittauskertojen välisen vaihtelun vaikutusta.

LPS-eristyksistä ajettiin SDS-geeli, jotta nähtiin mahdolliset epäpuhtaudet LPS:ssä ja LPS:n puhdistuminen eri vaiheissa. Keitettiin näytteitä SDS-näytepuskurissa (62,5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) glyseroli, 0,01 % (w/v) bromofenoli sininen, 0,1 % (v/v) 2-merkaptetaanoli) 100 °C:ssa 5 min. Näytteet ajettiin Criterion™ Precast Gel 4-20 % Tris-HCl (BioRad) -geelillä. Ajopuskurina käytettiin 25 mM Tris, 192 mM glysiini ja kokostandardina PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) (0,5 µl). Geeliä ajettiin 100 V 10 min ja 180 V 1 h.

Värjättiin geeli hopeavärjäyksellä huoneenlämmössä, 40 rpm tasoravistelussa. Proteiinit kiinnitettiin geeliin kiinnitysluoksella (29 % (v/v) etanoli, 10 % (v/v) etikkahappo) 1-18 h. Geeliä huuhdeltiin 19 % (v/v) etanolilla 15 min ja MQ-vedellä 15 min. Geeli herkistettiin värjäykselle herkistysliuoksella (1,2 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 1,5 min, minkä jälkeen geeliä huuhdeltiin MQ:lla 2x20 s. Geeliä värjättiin hopealiuoksella (11,8 mM hopeanitraatti) 30 min ja huuhdeltiin MQ:lla 20 s. Geeli kehitettiin kehitysliuoksella (217 mM K_2CO_3 , 60 μM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,0259 % (v/v) formaldehydi), kunnes geeli oli värjäytynyt sopivan tummaksi. Värjäytyminen pysäytettiin pysäytysliuoksella (413mM Trizma base, 2,5 % (v/v) etikkahappo) 2 min ja lopuksi geeliä huuhdeltiin MQ-vedellä 2 x 10 min.

2.1.2 IL-8 tuotto

IL-8:a tuotettiin His-hännällisenä. Histidiinihäntää tarvitaan sekä puhdistuksessa että sitoutumiskokeissa. IL-8 tuotossa ja puhdistuksessa oli ongelmia, joten sitä jouduttiin tuottamaan ja puhdistamaan useita kertoja ja samalla optimoimaan. Tehtiin esikasvatukset siirrostamalla pesäke *E.coli* BL21(DE3)RIL IL-8/pET15b -soluja LA-maljalta 5ml:aan 2xTY-mediumia (1,6 % (w/v) tryptoni, 1,0 % (w/v) hiivauute, 86 mM NaCl) +ampisilliini 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ +kloramfenikoli 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Kasvatetaan yli yön 30 °C:ssa. Lisättiin 2,5-5 ml y/y kasvatusta /500ml TB-mediumia (1,2 % (w/v) tryptoni, 2,4 % (w/v) hiivauute, 0,4 % (v/v) glyseroli, 17 mM KH_2PO_4 , 72 mM K_2HPO_4) + ampisilliini (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) + kloramfenikoli (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Kasvatettiin 37 °C:ssa, 250 rpm kunnes $A(600\text{ nm}) \approx 1,2$. Plasmidin sisältämän *lac* (laktoosi) -promootterin ansiosta IL-8:n tuotto saatiin indusoitua 1 mM IPTG:llä (isopropyyl- β -D-tiogalaktopyranosidi). Tuotettiin IL-8:a ensimmäisillä kerroilla 30 °C:ssa 250 rpm 3,5 h ja viimeisessä tuotossa huoneenlämmössä, 250 rpm, 6 h. Sentrifugoitiin solut pohjaan (JA-10-roottori, 6000 rpm, 10 min, +4 °C). Kaavittiin solut talteen ja pakastettiin -20 °C:ssa.

2.1.3 IL-8 puhdistus

IL-8 puhdistettiin nikkeli-affiniteettikromatografialla ja kokoerottelukromatografialla. Solut suspensoitiin A-puskuri (20 mM Na_2HPO_4 , 300 mM NaCl, 20 mM imidatsoli, pH 7,5-8) + 10mM MgCl_2 + 0,2 mM PMSF + 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNAasi I. Hajotettiin solut sonikoimalla. Sonikoinnissa käytettiin ensin soniprep 150 (MSE) -sonikaattoria ja pientä

kärkeä (5x15 s, 1 min tauoin, 10 µm amplitudi) ja seuraavissa puhdistuksissa 100 Watt Ultrasonic disintegrator (MSE) -sonikaattoria ja keskikokoista kärkeä (4x30 s, 1 min tauoin, n. 12 µm amplitudi). Solujätteet sentrifugoitiin pohjaan (JA-20-roottori, 32000 g, 10 min, +4 °C) ja supernatantti suodatettiin 0,45 µm suodattimella. Puhdistettiin N-His IL-8 ensin nikkeli-affiniteettikromatografialla (HisTrap™ HP 5ml (GE Healthcare)). Näyte ajettiin pylvääseen ja sitä pestiin A-puskurilla (pH ensimmäisissä puhdistuksissa 7,5, seuraavissa 8). Puhdistuksen protokollaan lisättiin ensimmäisten puhdistusten jälkeen pesu 5%:lla B-puskurilla (20 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 500 mM imidatsoli, pH 7,5), jolloin imidatsoli oli 44mM. N-His IL-8 eluutiin pylväästä 60 %:lla B-puskurilla (308 mM imidatsoli). Eluutiofraktioiden tilavuus oli 3 ml. Nikkeli-affiniteetti-fraktioita konsentroidiin Amicon® Ultra 15 Ultracel®-3K konsentraattorilla ja konsentroidu näyte suodatettiin 0,45 µm:n suodattimella. Puhdistuksen viimeinen vaihe tehtiin kokoerottelukromatografialla (HiLoad™ 26/600 Superdex™ 200pg (GE Healthcare), eluutio 1 CV PBS).

Puhdistuksesta ajettiin SDS-geeli, jotta nähtiin missä kokoerottelufraktioissa ja paljonko IL-8:aa oli. Näytteitä keitettiin SDS-näytepuskurissa 100 °C:ssa 5 min. Kokostandardina oli PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) ja ajopuskurina 25 mM Tris, 192 mM glysiini, 0,1 % SDS. Ajettiin 4-20 % Tris-HCl geelillä (Bio-Rad) 100 V 10 min, 180 V 1 h. Geeli värjättiin Bio-Safe™ Coomassie G-250 Stain (Bio-Rad) värillä. Konsentroidiin viimeisestä puhdistuksesta fraktiot, jotka kokoerottelukromatografian ja geelin perusteella sisälsivät IL-8:aa, Amicon® Ultra 15 Ultracel®-3K konsentraattorilla. Puhdas proteiini jaettiin eriin ja pakastettiin -80 °C:seen.

Proteiinipitoisuus määritettiin Lowry-menetelmällä (Lowry ym. 1951). BSA:sta tehtiin (*engl.* bovine serum albumin) standardit 0-150 µg/ml ja IL-8:sta 1/50 ja 1/100 laimennokset. Yhdistettiin 1:1 CTC liuosta ja näytettä/standardia, jolloin reaktioliuoksessa oli 2,5 % (w/v) Na₂CO₃, 0,025 % CuSO₄ · 5 H₂O, 0,025 % kaliumtartraatti, 0,2M SDS, 2,5% (w/v) SDS. Pidettiin huoneenlämmössä 10 min. Lisättiin 1:4 20 % Folin-Ciocalteu reagenssia (Merck) niin että pitoisuus reaktiossa oli 4 % ja reaktiotilavuus 500 µl. Vortexoitiin välittömästi ja pidettiin huoneenlämmössä 30 min. Pipetoitiin näytteitä ja standardeja kuoppalevyille 200 µl/kuoppa ja jokaista

näytettä kaksi rinnakkaista. Mitattiin absorbanssi A(750nm). Laskettiin näytteiden proteiinipitoisuudet vertaamalla absorbanseja standardisuoraan.

2.1.4 LPS:n epäpuhtauksien määritykset

Määritettiin proteiiniepäpuhtaudet LPS:issä Lowry-menetelmällä kuten IL-8:n pitoisuus tuotossa. Tehtiin LPS:stä 1/10 laimennokset. Reaktiivilavuus standardeilla 500 µl ja LPS-näytteillä 250 µl. Standardeista pipetoitiin kuoppalevylle kaksi rinnakkaista ja LPS-näytteitä yksi rinnakkainen. Mitattiin absorbanssi A(750nm). Laskettiin näytteiden proteiinipitoisuudet vertaamalla absorbanseja standardisuoraan.

Määritettiin PGA-epäpuhtaudet LPS:ssä Congo redillä. Päälystettiin 96-kuoppalevyn kuopat poly-L-lysiinillä (Sigma) 1 µg/kuoppa PBS:ssä huoneenlämmössä yli yön ja +4 °C:ssa 3-4 päivää. Kuopat pestiin 3x PBS:llä, minkä jälkeen kuopat päälystettiin poly-L-lysiiniin sitoutuvalla LPS:llä PBS:ssä, 37 °C:ssa, 1 h. Poistettiin kuopista LPS-päälystysliuos ja lisättiin 100 µl 1 % Congo red dye (Sigma) -väriä. Inkuboitiin huoneenlämmössä 2 min. Pestiin 2 x 200 µl MQ:lla. Irrotettiin sitoutunut väri 150 µl:lla 50 % DMSO (Sigma) huoneenlämmössä 1 h. Mitattiin A(405nm) Multiscan GO -levylukijalla 100 µl:sta DMSO:ta.

Ajettiin 1% agarosigeeli LPS-näytteistä, jotta nähtiin, onko LPS:issä DNA:ta. Näytteet olivat näytekurissa (Orange DNA loading buffer (Thermo Scientific)) sellaisina laimennoksina, että kaikkia LPS:iä on saman verran geelillä, laimein näyte oli laimentamattomana. Kokostandardina oli O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder ready-to-use (Thermo Scientific). DNA saatiin näkyviin Midori Green Advance DNA Stain (NIPPON Genetics) -värillä. Ajettiin TAE-puskurissa (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM etikkahappo) 1 h 85 V. Kuvattiin geeli UV-valolla. Tarkat DNA-pitoisuudet LPS:issä määritettiin NanoDrop-laitteella.

2.1.5 IL-8/IL-1β /IFN-γ – LPS EMSA

LPS:ien vuorovaikutusta eri sytokiinien kanssa testattiin EMSA:lla (*engl.* electrophoretic mobility shift assay). LPS:iä (1/50 laimennos) inkuboitiin sytokiinien (rekombinanttisesti tuotetut IL-8 ja IL-1β 1µg/reaktio, kaupalliset IL-1β (ReliaTech

GmbH, cat. 400-002-DC) ja IFN- γ (ReliaTech GmbH, cat. 100-039) kanssa ja ilman sytokiineja. Sytokiineista tehtiin myös reaktiot ilman LPS:iä. Reaktiopuskurina oli 50 % PBS (kaupalliset sytokiinit olivat valmiiksi eri PBS:ssä kuin mitä muissa reaktioissa käytettiin) ja reaktiutilavuus 6 μ l. Näytteitä inkuboitiin huoneenlämmössä 1 h, minkä jälkeen näytteisiin lisättiin natiivinäytepuskuri (31,25mM Tris-HCl, pH 6,8, 18,75 % (v/v) glyseroli, 0,005 % Orange G) ja näytteet ajettiin Criterion™ Precast Gel 4-20 % Tris-HCl -geelillä (BioRad). (Ajopuskurina 25 mM Tris, 192 mM glysiini ja kokostandardina PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) (0,5 μ l). Ajettiin 100 V 10 min ja 180 V 1 h.) Geeli värjättiin hopeavärjäyksellä, kiinnitys geeliin tehtiin yli yön.

2.1.6 LPS – IL-8 EuLISA

IL-8:n sitoutumista LPS:ään tutkittiin EuLISA:lla (europiumvälitteinen immunomääritysmenetelmä, *engl.* europium-linked immunosorbent assay). Kuopat päällystettiin poly-L-lysiinillä (Sigma) 1 μ g/kuoppa PBS:ssä huoneenlämmössä yli yön ja +4 °C:ssa 3-4 päivää. Kuopat pestiin 3x PBS:llä, minkä jälkeen kuopat päällystettiin poly-L-lysiiniin sitoutuvalla LPS:llä PBS:ssä (kontrolleihin PBS), 37 °C:ssa, 1 h. Kuopat pestiin 3x PBS-T:llä (PBS + 0,05 % Tween-20). Tyhjät sitoutumispaikat täytettiin 200 μ l:lla Alternative block solutionia (BB5, ImmunoChemistry) huoneenlämmössä yli yön. Pestiin kuopat 3x PBS-T:llä. Kuoppiin lisättiin N-His IL-8 (0-46 μ M), joka sitoutuu LPS:ään Delfia Assay bufferissa (Perkin Elmer) +4 °C:ssa yli yön. Kutakin pitoisuutta oli kaksi rinnakkaista. Kuopat pestiin 3x PBS-T:llä. Sitoutuminen karakterisoitiin Delfia Eu-N1-Anti-6xHis vasta-aineella 500 ng/ml Delfia Assay Bufferissa inkuboimalla huoneenlämmössä 1 h. Pestiin kuopat 3x PBS-T:llä. Fluoresenssi saatiin 100 μ l:lla Delfia Enhancement solutionia (Perkin Elmer) pitämällä huoneenlämmössä 5 min. Aikaerotteinen fluoresenssi mitattiin (Europium) Victor³™ 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer) -levylukijalla. Jokaisesta LPS:stä toistoja tehtiin kolme ja BSA:sta 15.

2.2 Muokatut emHofQ -proteiinit

2.2.1 Kloonaus ja transformaatio tuottokantaan

Tilattiin emHofQ geenit, joissa oli muokattu kahdesta silmukasta (silmukat L1 ja L2) aminohappoja (L1: H136A, F137A, K139A, L2: D165A, R166A, L1L2: H136A, F137A,

K139A, D165A, R166A). Jatkossa lyhenteellä emHofQmut viitataan kaikkiin kolmeen muokattuun emHofQ-proteiiniin, emHofQL1 tarkoittaa proteiinia, jonka silmukasta 1 on muokattu aminohappoja ja niin edelleen. emHofQmut tuotettiin histidiinihännällisinä. Histidiinihäntää tarvitaan sekä puhdistuksessa että sitoutumiskokeissa. Geeniplasmidit transformoitiin *E.coli* XL1-Blue soluihin elektroporaatiolla (0,04 ng DNA:ta/ μ l bakteereita, elektroporaatio 1250 V, 5 ms). Bakteereita pidettiin SOC-mediumissa (0,5 % (w/v) hiivauute, 2 % (w/v) tryptoni, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glukoosi) 37 °C:ssa, 250 rpm, 1 h, jonka jälkeen bakteerit maljattiin LA (1 % (w/v) tryptoni, 0,5 % (w/v) hiivauute, 86 mM NaCl, 1,6 % (w/v) agar) +ampisilliini (100 μ g/ml) -maljoille ja kasvatettiin 37 °C:ssa yön yli.

Plasmidia tuotettiin lisää siirrostamalla steriilisti maljalta pesäke 5 ml:aan LB-mediumia (1 % (w/v) tryptoni, 0,5 % (w/v) hiivauute, 86 mM NaCl) +ampisilliini (100 μ g/ml) ja kasvattamalla yli yön 37 °C:ssa, 250 rpm. Kasvatuksista sentrifugoitiin solut pohjaan (5000 rpm, 10 min, +4 °C) ja plasmidit eristettiin GeneJET plasmid Miniprep Kitillä (Thermo Scientific), eluutio 35 μ l MQ-vettä. Geenit ja pET36b-plasmidit digestoititiin NdeI ja XhoI -katkaisuentsyymeillä [50 ng DNA/ μ l, FD NdeI (Thermo Scientific) FD green bufferissa (Thermo Scientific), reaktiutilavuus 40 μ l], 37 °C:ssa yön yli. Lisättiin FD XhoI (Thermo Scientific) ja katkaistiin 37 °C:ssa 4,5 h). Katkaistut geenit ja plasmidi eristettiin ajamalla ne 1 %:lle agarosigeelille. DNA saatiin näkyviin Midori Green Advance DNA Stainilla (NIPPON Genetics), kokostandardina oli O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder ready-to-use (Thermo Scientific) ja ajo-olosuhteet 85 V 1 h 20 min. Geenit ja pet36b-plasmidi eristettiin geeliltä GeneJET Gel Extraction Kitillä (Thermo Scientific), inkubaatio tehtiin 65 °C:ssa 10 min ja DNA eluointiin 30 μ l MQ-vettä. Digestoitu pET36b plasmidi defosforyloitiin FastAP Thermosensitive alkaline Phosphatasella (Thermo Scientific) 37 °C:ssa 30 min, reaktiutilavuus oli 20 μ l reaktio pysäytettiin 75 °C:ssa 5 min).

Katkaistut *emhofQ*-geenit liitettiin pET36b-plasmidiin T4 DNA ligaasilla (Thermo Scientific), reaktiutilavuus oli 20 μ l, katkaistua geeniä käytettiin 0/75/100 ng, katkaistua ja defosforyloitua pET36b käytettiin 50 ng ligation bufferissa (Thermo Scientific). Inkuboitiin huoneenlämmössä 4 h. Inaktivoitiin 65 °C:ssa 10 min.

Ligaatioseos transformoitiin *E.coli* XL1-Blue soluihin elektroporaatiolla (25 µl soluja, 1 µl DNA:ta) 1250 V, 5 ms, minkä jälkeen lisättiin 500 µl SOC-mediumia. Inkuboitiiin 37 °C:ssa, 250 rpm 1 h ja maljattiin LA +kanamysiini (30 µg/ml) -maljoille. Transformantteja kasvatettiin 37 °C:ssa yli yön. Valikoiduista pesäkkeistä tehtiin esikasvatukset ja plasmidineristykset kuten edellä. Tarkastettiin kloonauksen onnistuminen tekemällä 7 µl:n testireaktiot, joista katkaistiin plasmidi XhoI:llä ja NdeI:llä ja ajamalla näytteet agarosigeelillä. Plasmidia käytettiin reaktiossa 400-500 ng, restriktioentsyymit XhoI ja NdeI FD green bufferissa. Katkaistiin 37 °C:ssa 2,5 h. Ajettiin digestionäytteet 1 % agarosigeelillä, jossa Midori Green, 85 V, 1 h, kokostandardina käytettiin O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder ready-to-use (Thermo Scientific). Kloonauksen onnistuminen varmistettiin vielä sekvensoinnilla.

Transformoitiin emHofQ-mut/pET36b-plasmidit *E.coli* tuottokantaan BL21(DE3)RIL: 50 µl soluja, 1 µl plasmidia, pidettiin jäällä 15 min, transformoitiin 42 °C:ssa 2 min, lisättiin 1ml SOC-mediumia ja inkuboitiiin 1 h 37 °C:ssa, 250 rpm. Maljattiin solut LA +kanamysiini (30 µg/ml) +kloramfenicoli (30 µg/ml) -maljoille ja kasvatettiin 37 °C:ssa yli yön.

2.2.2 emHofQ tuottotestaukset

Testattiin emHofQmut tuottoa eri olosuhteissa, jotta saataisiin selvitettyä sopivat olosuhteet proteiinin tuottoon. *E. coli* BL21(DE3)RIL pET36b/emHofQmut soluja esikasvatettiin LB + kanamysiini (30 µg/ml) + kloramfenikoli (30 µg/ml) -mediumissa 30 °C:ssa, 250 rpm yli yön. Testikasvatukset tehtiin lisäämällä esikasvatuksia 2xTY ja TB – mediuimeihin. Mediuimeihin lisättiin kanamysiini (30 µg/ml) ja kloramfenicoli (30 µg/ml). Bakteereita kasvatettiin 30 °C:ssa kunnes A(600nm) oli 2xTY-kasvatuksissa n. 0,6 ja TB-kasvatuksissa 0,6-1,2. Proteiinien tuotto saatiin induoitua plasmidin sisältämän *lac*-promootterin ansiosta 1 mM IPTG:llä. Proteiineja tuotettiin ravistelussa 250-300 rpm 30 °C:ssa n. 3 h tai 16 °C:ssa yli yön. Kasvatuksista tehtiin näytteet, jotka ajettiin geelillä, jotta nähtiin, kuinka hyvin proteiineja oli tuottunut ja olivatko ne liukoisessa muodossa. Kasvatuksista tehtiin 3 ml:n näytteet, joista sentrifugoitiin solut pohjaan (5900 g, 15 min). Pelletti liuotettiin 300 µl:aan PBS:ää ja hajotettiin solut sonikoimalla (10 µm amplitudi, 3x5 s, 1 min tauoin). Sentrifugoitiin solujätteet pohjaan

(13400 g, 3 min). Tehtiin geelinäytteet sekä pelleteistä, että supernatanteista. Keitettiin näytteitä SDS-näytepuskurissa 100 °C, 5min ja ajettiin 4-20 % Tris-HCl Criterion™ Precast Gel (Bio-Rad) -geelillä 10 min 100 V ja 1 h 180 V. Kokostandardina oli PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) ja ajopuskurina 25 mM Tris, 192 mM glysiini, 0,1 % SDS. Geeli värjättiin Bio-Safe™ Coomassie G-250 Stain -värillä ohjeen mukaan. Epäiltiin sonikoinnin onnistumista, joten liuotettiin 16 °C-kasvatusten pelletit uudelleen 300 µl:aan PBS:ää. Hajotettiin solut uudelleen sonikoimalla (12 µm amplitudi, 3x10 s, 1min tauoin). Näytteet sentrifugoitiin ja ajettiin geeli kuten edellä.

2.2.3 emHofQ tuotto

Esikasvatusten perusteella emHofQ-mut tuotto-olosuhteiksi valittiin 2xTY-mediumi ja 16 °C. Tehtiin esikasvatukset siirrostamalla pesäke BL21(DE3)RIL pET36b/emHofQmut -maljalta 5x5 ml:aan 2xTY + kanamysiini (30 µg/ml) + kloramfenicoli (30 µg/ml) -mediumia ja kasvatettiin yli yön 30 °C:ssa, 250 rpm. Siirrostettiin 48 ml yli yön -kasvatusta 2400 ml:aan 2xTY-mediumia +kanamysiini (30 µg/ml) +kloramfenikoli (30 µg/ml). Kasvatettiin 30 °C:ssa, 250 rpm kunnes A(600nm)≈0,8. Proteiinien tuotto indusoitiin 1 mM IPTG:llä ja kasvatettiin 16 °C:ssa, 250 rpm yli yön. Sentrifugoitiin solut pohjaan (JA-10 roottori, 4000 g, 4 °C, 10 min). Pakastettiin solut -20 °C.

2.2.4 emHofQ puhdistus

Solut suspensoitiin A-puskuriin (pH 8,0, 20 ml/10 g soluja) +10 mM MgCl₂, 0,2 mM PMSF + 1 µg/ml DNase I. Solut hajotettiin sonikoimalla (12 µm amplitudi, 6x30 s, 1 min tauoin, jäällä). Solujätteet sentrifugoitiin pohjaan (JA-20 roottori, 32000 g, 10 min, +4 °C). Supernatantti suodatettiin 0,45 µm ja puhdistettiin Ni-affiniteettikromatografialla [pestiin A-puskurilla ja 5 % B-puskurilla (44 mM imidazoli) ja eluutiin 50 % B-puskurilla (260 mM imidazoli)]. Proteiinieluutiota konsentroidiin 10K-konsentraattorilla (Amicon®Ultra-15 Ultracel®-10K tai Vivaspin Turbo 10K MWCO) kunnes V≈10 ml ja suodatettiin näyte 0,45µm.

Proteiini puhdistettiin vielä kokoerottelukromatografialla [HiLoad™ 26/600 Superdex™ 200pg (GE Healthcare), eluutio 1 CV PBS]. Ajettiin puhdistuksesta SDS-geeli samalla

tavoin kuin IL-8 puhdistuksestakin ja konsentroidiin fraktiot (Amicon®Ultra-15 Ultracel®-10K -konsentraattori), joissa geelisuodatuskuvaajan ja geelin mukaan on emHofQ:ta. Jäädytettiin proteiinit erissä nestetyössä ja pakastettiin -80 °C:seen. Mitattiin proteiinipitoisuudet Lowry-menetelmällä.

2.2.5 IL-8/IL-1 β – emHofQ EuLISA

IL-8:n ja IL- β :n sitoutumista villityypin emHofQ-proteiiniin ja emHofQmut-proteiineihin testattiin EuLISA määrittelyksellä. Kuopat päällystettiin BSA:lla/IL-8:lla/IL-1 β :lla 1 μ g/kuoppa PBSN:ssä (PBS + 0,05 % natriumatsidi) huoneenlämmössä yli yön. Pestiin kuopat 3x PBS:llä. Täytettiin tyhjät sitoutumispaikat kuopissa 200 μ l Alternative block solutionilla (BB5, ImmunoChemistry) huoneenlämmössä yön yli. Pestiin kuopat 3x PBS-T:llä (PBS + 0,05 % Tween-20). Kuoppiin lisättiin emHofQ (0-2000 nM), joka sitoutuu BSA:han/IL-8:aan/IL-1 β :aan Delfia Assay bufferissa (Perkin Elmer), 50 μ l/kuoppa +4 °C:ssa yli yön. Rinnakkaisia oli kullakin emHofQ-pitoisuudella BSA:han yksi ja IL-8:aan/IL-1 β :aan kaksi. Villityypin emHofQ oli aiemmin rekombinanttisesti tuotettua proteiinia. Kuopat pestiin 3x PBS-T:llä. Sitoutuminen karakterisoitiin Delfia Eu-N1-Anti-6xHis vasta-aineella (Perkin Elmer) 500 ng/ml Delfia Assay Bufferissa 50 μ l/kuoppa. Vasta-aine sitoutui emHof-Q-proteiinin histidiinihäntään huoneenlämmössä 1 h. Kuopat pestiin 3xPBS-T:llä. Fluoresenssi saatiin 100 μ l:lla Delfia Enhancement solutionia (Perkin Elmer) antamalla reaktion tapahtua huoneenlämmössä 5 min. Aikaerotteinen fluoresenssi (Europium) mitattiin Victor³_{TM} 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer) -levylukijalla. Toistoja tehtiin kutakin emHofQ-pitoisuutta kohti IL-8:lla 3-6 ja IL-1 β :lla kolme.

3. TULOKSET

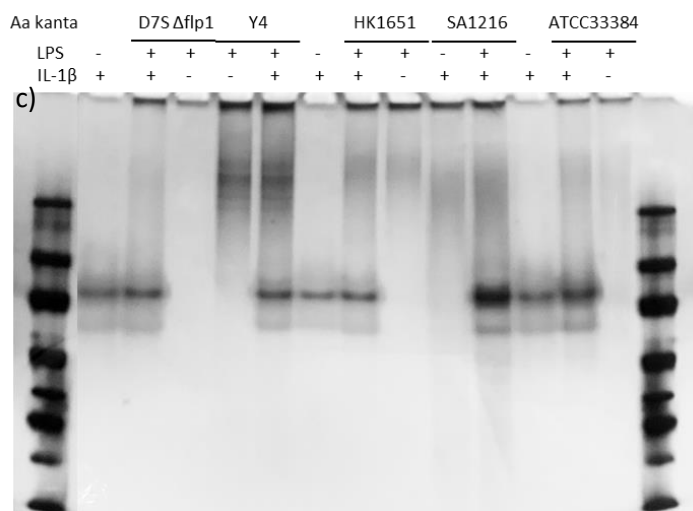
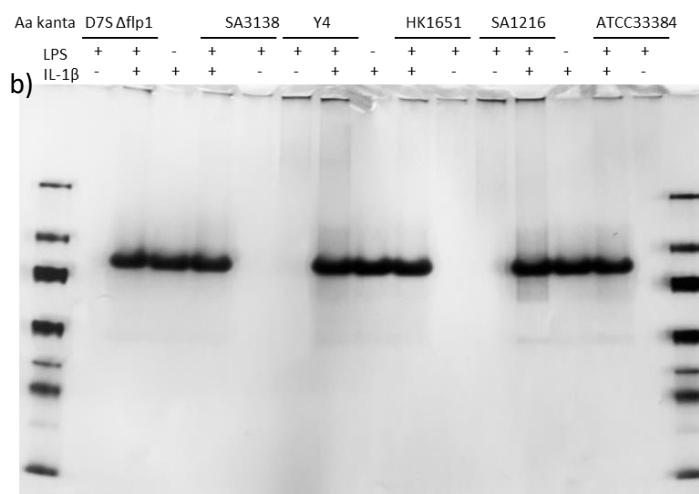
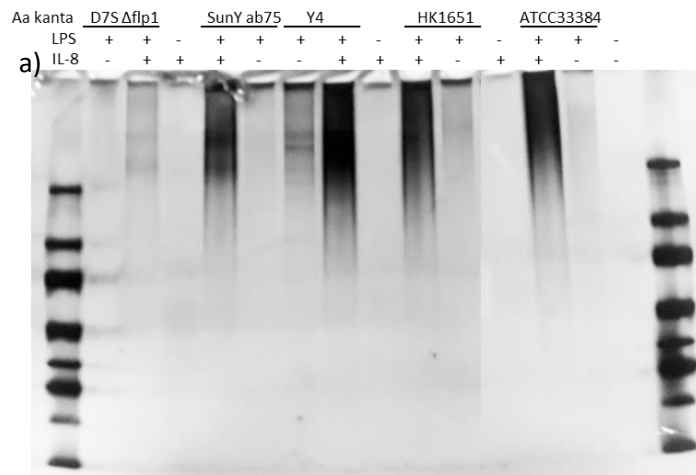
3.1 LPS

3.1.1 IL-8:n tuottoa ja puhdistusta optimoitiin

IL-8:n tuottoa ja puhdistusta optimoitiin, jotta IL-8:a saatiin puhdistettua tarpeeksi kokeita varten. IL-8:n tuottolämpötilaa laskettiin, jotta proteiini tuottuisi paremmin liukoisessa muodossa. Sonikaattoria ja sonikointiaikoja muutettiin, jotta saatiin solut paremmin hajotettua. Tällöin suurempi osa tuotetusta proteiinista vapautui liuokseen ja saatiin puhdistettua. N-His-hännällinen IL-8 puhdistettiin liukoisten proteiinien osasta nikkeli-affiniteettikromatografialla ja kokoerottelukromatografialla. Puhdistusta optimoitaessa nikkeli-affiniteettikromatografian sitoutumispuskurin pH:ta nostettiin sen varmistamiseksi, että histidiinihänkä olisi negatiivisesti varautunut ja IL-8 sitoutuisi pylvääseen.

3.1.2 EMSA osoitti, että LPS vuorovaikuttaa IL-8:n ja IFN- γ :n kanssa

Sytokiinien sitoutumista eri *A. actinomycetemcomitans* -kannoista eristettyihin LPS:iin testattiin aluksi EMSA:lla (elektroforeettinen liikkumisen muuttumismääritys, *engl.* electrophoretic mobility shift assay). LPS:ää ja sytokiinia (IL-8/IL-1 β /IFN- γ) inkuboitiin yhdessä ja erikseen, minkä jälkeen ajettiin natiivigeelielektroforeesi. Geeliltä nähtiin, vaikuttavatko molekyylit toistensa ajautumiseen geelillä. LPS on suurikokoinen molekyyli, joka ei juurikaan ajaudu yksinään natiivigeelille. Kuvasta 10 a nähdään, että IL-8 saa LPS:n ajautumaan geelille kun muuten se jää kaivon pohjalle, samanlainen vaikutus havaittiin myös IFN- γ :lla (kuva 11). IL-1 β :lla (kuva 10 b ja c) samanlaista vaikutusta ei havaittu. Tämä kertoo siitä, että IL-1 β ei vuorovaikuta LPS:n kanssa merkittävästi, mutta IL-8 ja IFN- γ vuorovaikuttavat. IL-8 ja IFN- γ eivät näkyneet värjäyksessä, mutta niiden vaikutus on selvä. EMSA-geeli on natiivigeeli eli molekyylejä ei denaturoida. Tällöin molekyylien ajautumiseen geelillä vaikuttaa koon lisäksi myös esimerkiksi varaus. Tämä tarkoittaa sitä, että näytteessä ollut sytokiini saattaa kulkeutua eri kohtaan kuin koon perusteella voisi odottaa. IL-8:n sitoutumista LPS:ään tutkittiin vielä tarkemmin EuLISA:lla.



Kuva 10 EMSA-geelit näyttävät sytokiinin vuorovaikutuksen LPS:n kanssa. Sytokiinin sitoutuminen saa LPS:n, joka muuten jää suurimmaksi osaksi kaivon pohjalle, ajautumaan geelille. Kuvassa ylhäällä näkyy *A. actinomycetemcomitans* -kanta, josta LPS on eristetty ja kannan alapuolella näkyy, onko näytteessä ollut LPS:ää tai sytokiinia. Näytteitä on inkuboitu tunnin ajan, antaen sytokiineille aikaa sitoutua, ennen kuin ne on ajettu geelille. Geeliltä a) nähdään, että IL-8 sitoutuu eri kannoista eristettyyn LPS:ään. Geeliltä b) ja c) nähdään, että IL-1β ei juurikaan sitoudu LPS:ään vaan ajautuu yksinään geelille. Geelillä c on kuitenkin havaittavissa pientä sitoutumista. Geelillä b on käytetty itse rekombinanttisesti tuotettua IL-1β:aa ja geelillä c kaupallista rekombinanttista IL-1β:aa.

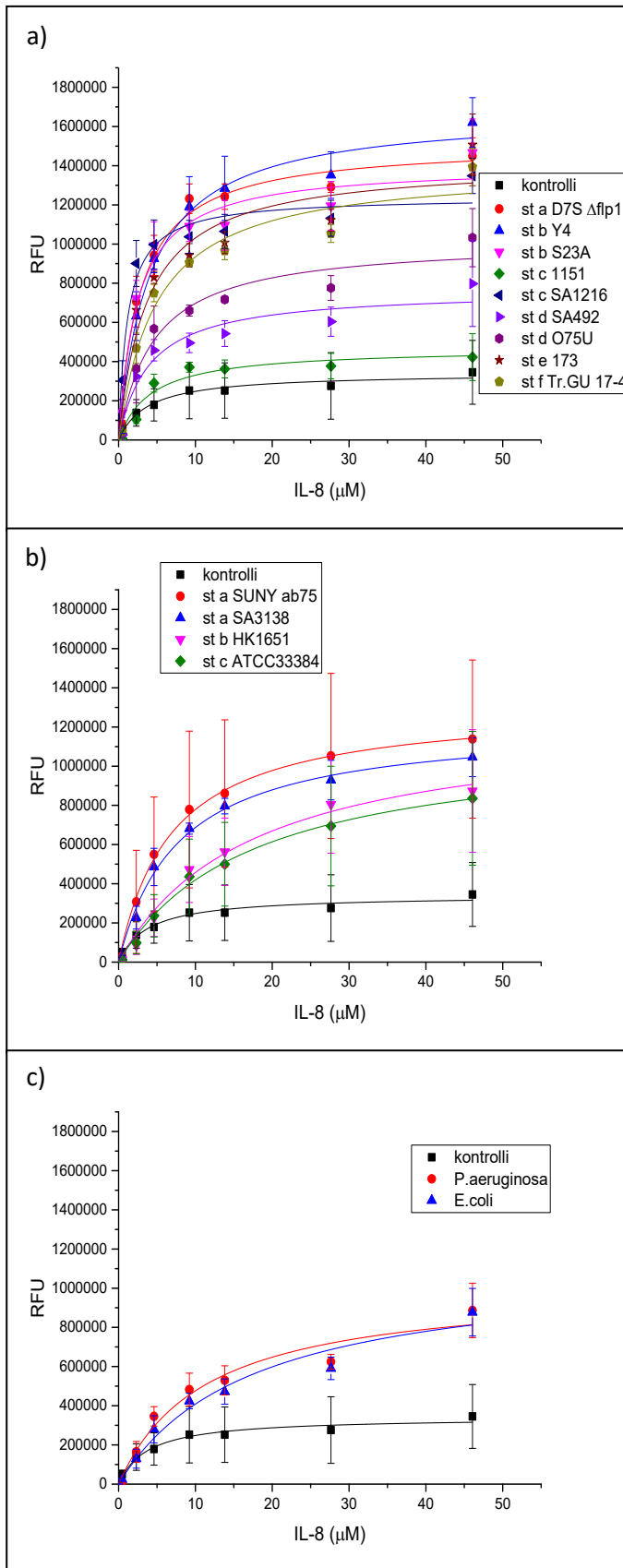
Aa kanta	SA3138		D7S Δ flp1			Y4		SA1216			HK1651		ATCC33384		
LPS	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
IFN- γ	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+



Kuva 11 EMSA-geelit näyttävät sytokiinin vuorovaikutuksen LPS:n kanssa. Sytokiinin sitoutuminen saa LPS:n, joka muuten jää suurimmaksi osaksi kaivon pohjalle, ajautumaan geelille. Kuvassa ylhäällä näkyy *A. actinomycetemcomitans* -kanta, josta LPS on eristetty ja kannan alapuolella näkyy, onko näytteessä ollut LPS:ää tai sytokiinia. Näytteitä on inkuboitu tunnin ajan, antaen sytokiineille aikaa sitoutua, ennen kuin ne on ajettu geelille. Geeliltä nähdään, että IFN- γ sitoutuu LPS:ään ja saa sen ajautumaan geelille.

3.1.3 EuLISA osoitti IL-8:n sitoutuvan LPS:ään

IL-8:n sitoutumista LPS:ään testattiin EuLISA-analyysillä. Pohja päällystettiin poly-L-lysiinillä, johon negatiivisesti varautunut LPS sitoutui. Kontrollissa pohjalla oli ainoastaan poly-L-lysiini. LPS:ään sitoutuu His-hännällinen IL-8. Sitoutuneen IL-8:n määrä saadaan selville histidiiniin sitoutuvalla europium-leimatulla vasta-aineella. EuLISA-kuvaajista (kuva 12) nähdään, että IL-8 sitoutuu eri LPS:iin eri voimakkuuksilla. LPS:t jaettiin K_d -arvon perusteella IL-8:a hyvin sitoviin ($K_d < 5 \mu\text{M}$) ja huonosti sitoviin ($K_d > 5 \mu\text{M}$). K_d -arvoja verratessa täytyy huomioida se, että edes IL-8:a hyvin sitovien K_d -arvot eivät kerro tiukasta sitoutumisesta. K_d -arvot on listattu taulukkoon 4. K_d -arvoista nähdään, että IL-8:n sitomisen voimakkuus oli riippumaton LPS:n serotyypistä.



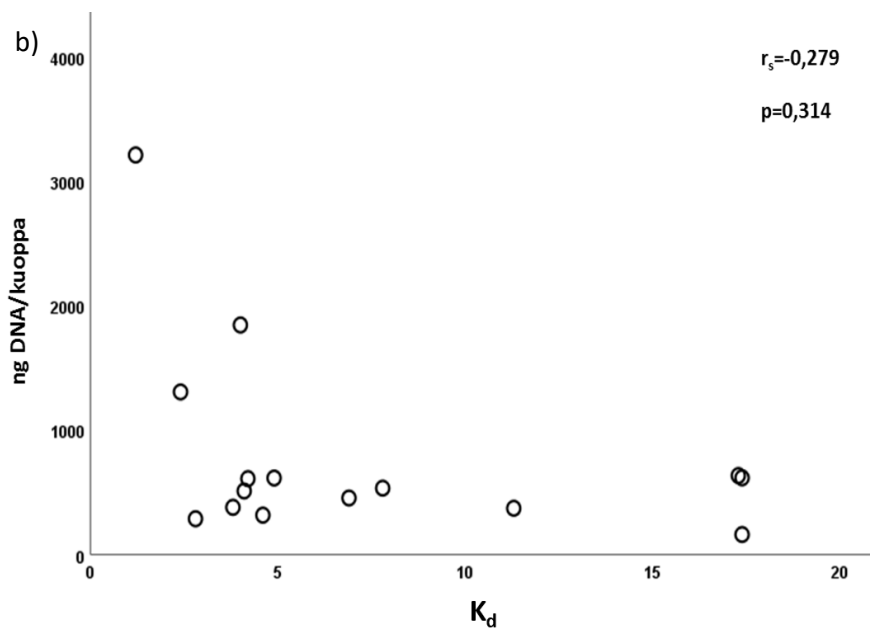
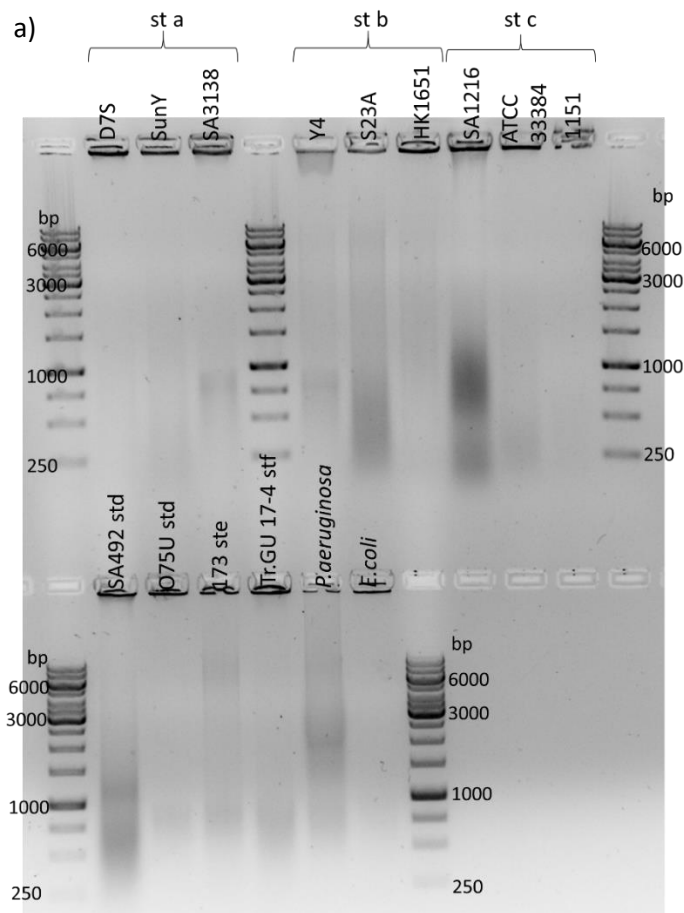
Kuva 12 IL-8:n sitoutuminen eri LPS:iin (EuLISA). Sitoutumiskuvaajat IL-8:n sitoutumisesta eri *A. actinomycetemcomitans*kannoista eristettyihin LPS:iin. LPS:t jaettu a) voimakkaisiin sitoihin ($K_d < 5 \mu\text{M}$) ja b) heikkoihin sitoihin ($K_d > 5 \mu\text{M}$). Kuvassa c) kontrollin ja kahden verrokina olleen eri lajin LPS:n sitoutumiskäyrät. $N=3$ (kontrollilla $N=15$)

Taulukko 4 Eri LPS:ille EuLISA:sta saadut dissosiaatiovakio (K_d) ja sitoutumismaksimi (v_{max}). Kannat jaettu voimakkaisiin sitoihin ($K_d < 5 \mu M$) ja heikkoihin sitoihin ($K_d > 5 \mu M$) sekä verrokkeihin *P.aeruginosa* ja *E.coli*.

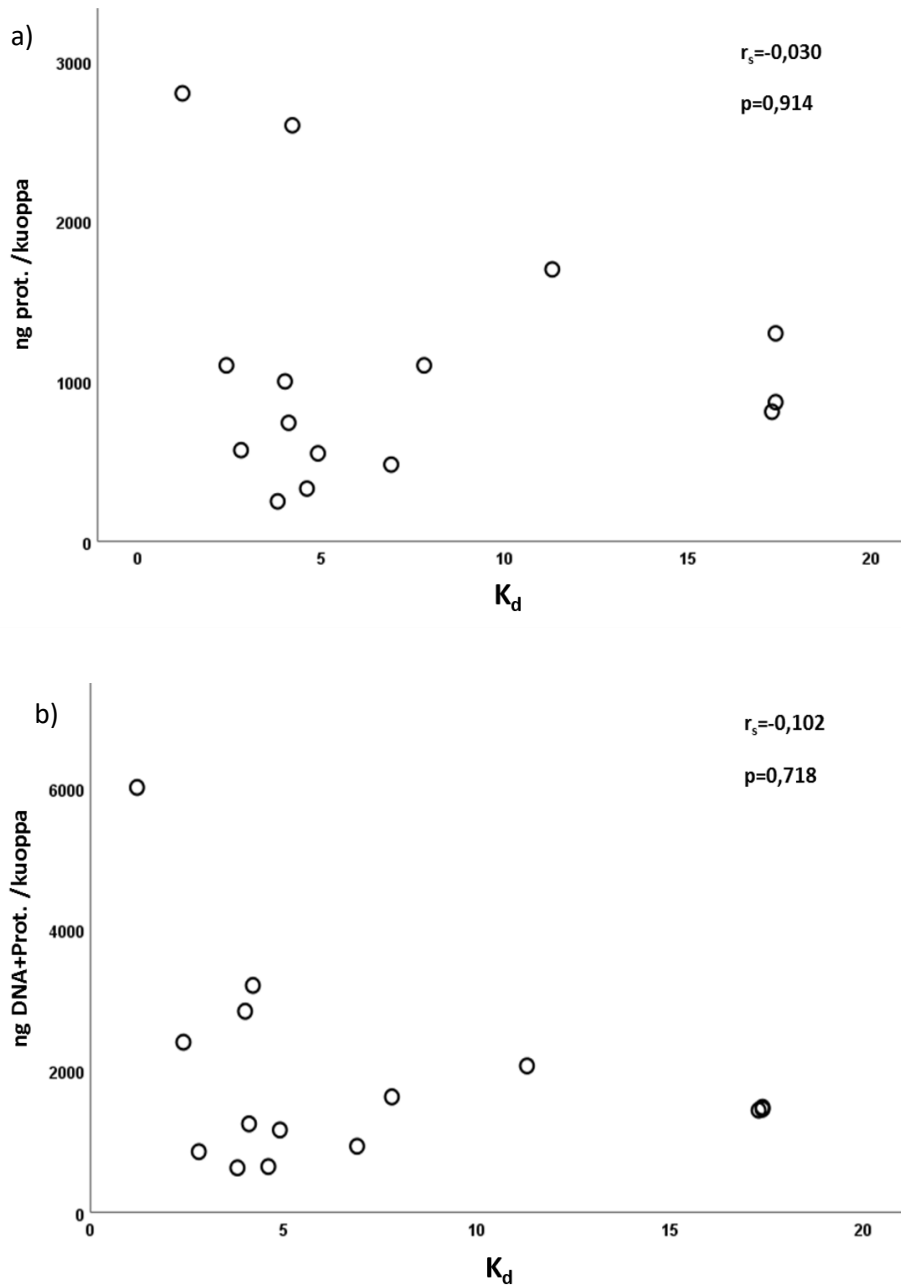
kanta	K_d (μM)	v_{max}	
st c SA1216	1,2±0,3	1,24±0,06	x10 ⁶
st b S23A	2,4±0,6	1,40±0,08	x10 ⁶
st a D7S Δ flp1	2,8±0,6	1,51±0,07	x10 ⁶
st e 173	3,8±1,3	1,42±0,02	x10 ⁶
st d SA492	4,0±1,3	0,76±0,07	x10 ⁶
st b Y4	4,1±0,8	1,68±0,08	x10 ⁶
st c 1151	4,2±1,4	0,47±0,05	x10 ⁶
st d O75U	4,6±1,2	1,02±0,08	x10 ⁶
st f Tr.GU 17-4	4,9±1,3	1,4±0,1	x10 ⁶
st a SUNY ab75	6,9±0,7	1,31±0,04	x10 ⁶
st a SA3138	7,8±0,9	1,22±0,05	x10 ⁶
st b HK1651	17,3±3,2	1,3±0,1	x10 ⁶
st c ATCC33384	17,4±2,0	1,15±0,06	x10 ⁶
<i>P.aeruginosa</i>	11,3±3,0	1,0±0,2	x10 ⁶
<i>E.coli</i>	17,4±4,8	1,1±0,2	x10 ⁶

3.1.4 LPS:n epäpuhtaudet eivät vaikuttaneet IL-8:n sitomisen voimakkuuteen

LPS:stä mitattiin epäpuhtauksia, jotka mahdollisesti voisivat sitoa IL-8:aa eristyksissä LPS:n sijasta. LPS:istä ajettiin agarosigeeli (kuva 13 a), jotta nähtiin oliko näytteissä DNA-epäpuhtauksia. Koska DNA:ta havaittiin, näytteistä mitattiin vielä tarkat DNA-pitoisuudet. Näytteistä mitattiin myös proteiini- ja PGA-pitoisuudet. Proteiini- ja DNA-pitoisuudet mitattiin suoraan eristetystä LPS:stä ja niiden määrät laskettiin /kuoppa. Pitoisuuksista piirrettiin kuvaajat (kuvat 13 b ja 14 a ja b), joissa x-akselilla on EuLISA:sta saatu K_d -arvo ja y-akselilla epäpuhtaus ng/kuoppa. Kuvaajat piirrettiin DNA- ja proteiinipitoisuuksista yhdessä ja erikseen. Kuvaajista laskettiin Spearmanin järjestyskorrelaatiokerroin ja p-arvo. Tilastollisten analyysien perusteella epäpuhtauksilla ei ollut merkitystä sitomisen voimakkuuteen ($p > 0,05$).



Kuva 13 LPS:ien DNA-epäpuhtaudet. Kuvassa a) on eri *A.actinomycetemcomitans*-kannoista eristetyt LPS:t ajettu agarosigeelille, jotta nähtäisiin, onko eri LPS:issä DNA-epäpuhtauksia. Kuvassa b) on verrattu LPS:ien DNA-pitoisuuksia EuLISA:sta saatuihin K_d -arvoihin. Kuvajasta on laskettu Spearmanin järjestyskorrelaatiokerroin (r_s) ja p -arvo. Kuvien perusteella DNA:n määrä ei korreloi EuLISA:sta saatujen K_d -arvojen kanssa ($p > 0,05$). DNA-epäpuhtauksien määrä ei siten vaikuttaisi selittävän sitoutumisen voimakkuuden vaihteluita.

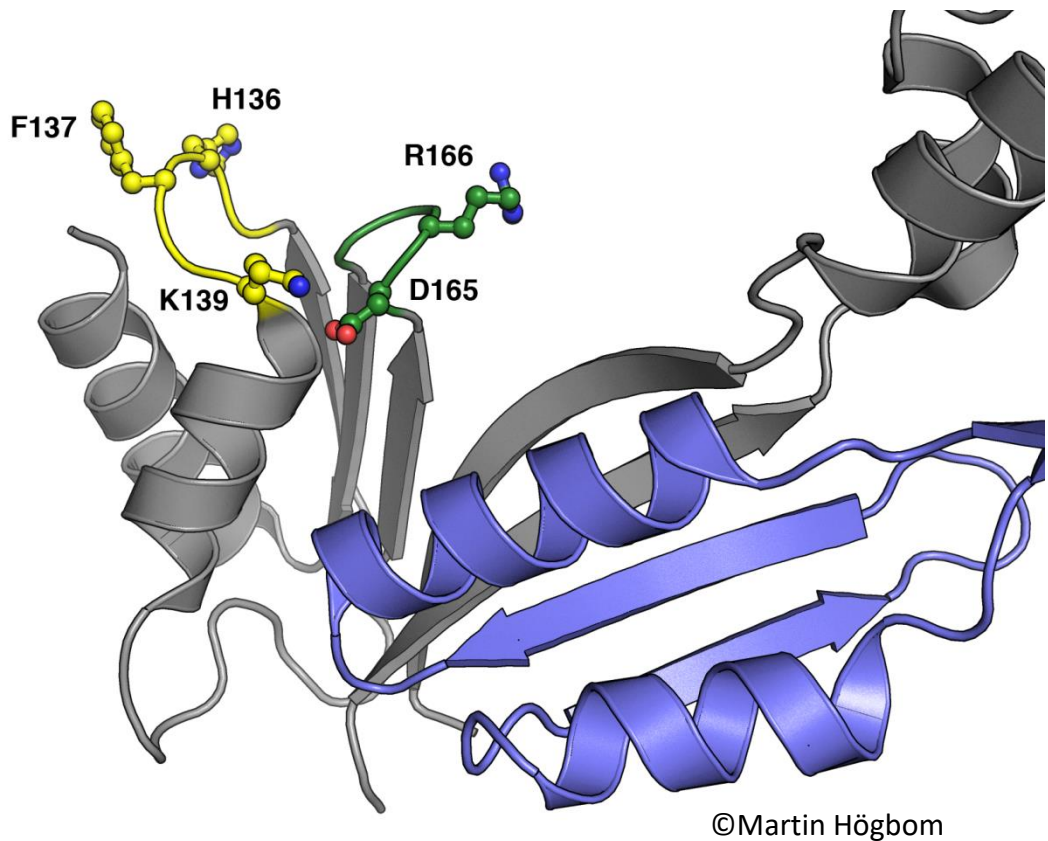


Kuva 14 LPS:ien epäpuhtauksien määrä verrattuna EuLISA:sta saatuihin K_d -arvoihin. Kuvaajista on laskettu Spearmanin järjestyskorrelaatiokerroin (r_s) ja p -arvo. Kuvassa a) on proteiinien määriä verrattu EuLISA:sta saatuihin K_d -arvoihin. Kuvassa b) on laskettu yhteen proteiinien ja DNA:n määrät ja verrattu niitä EuLISA:sta saatuihin K_d -arvoihin. Kuvien perusteella epäpuhtauksien määrä ei korreloi EuLISA:sta saatujen K_d -arvojen kanssa ($p > 0,05$). Epäpuhtauksien määrä ei siten vaikuttaisi selittävän sitoutumisen voimakkuuden vaihteluita.

PGA-pitoisuudet laskettiin päällystämällä kuoppalevy LPS:llä samalla tavalla kuin EuLISA:ssa ja mittaamalla sitten PGA-pitoisuus Kongo Redin avulla. Tällä tavalla saatiin tietää, paljonko PGA:ta oli mittauksessa läsnä. Tuloksena ei saatu taustasta poikkeavia arvoja, joten tuloksista voitiin päätellä, että PGA:ta ei ollut näytteissä niin paljoa, että se olisi vaikuttanut tuloksiin.

3.2 emHofQ

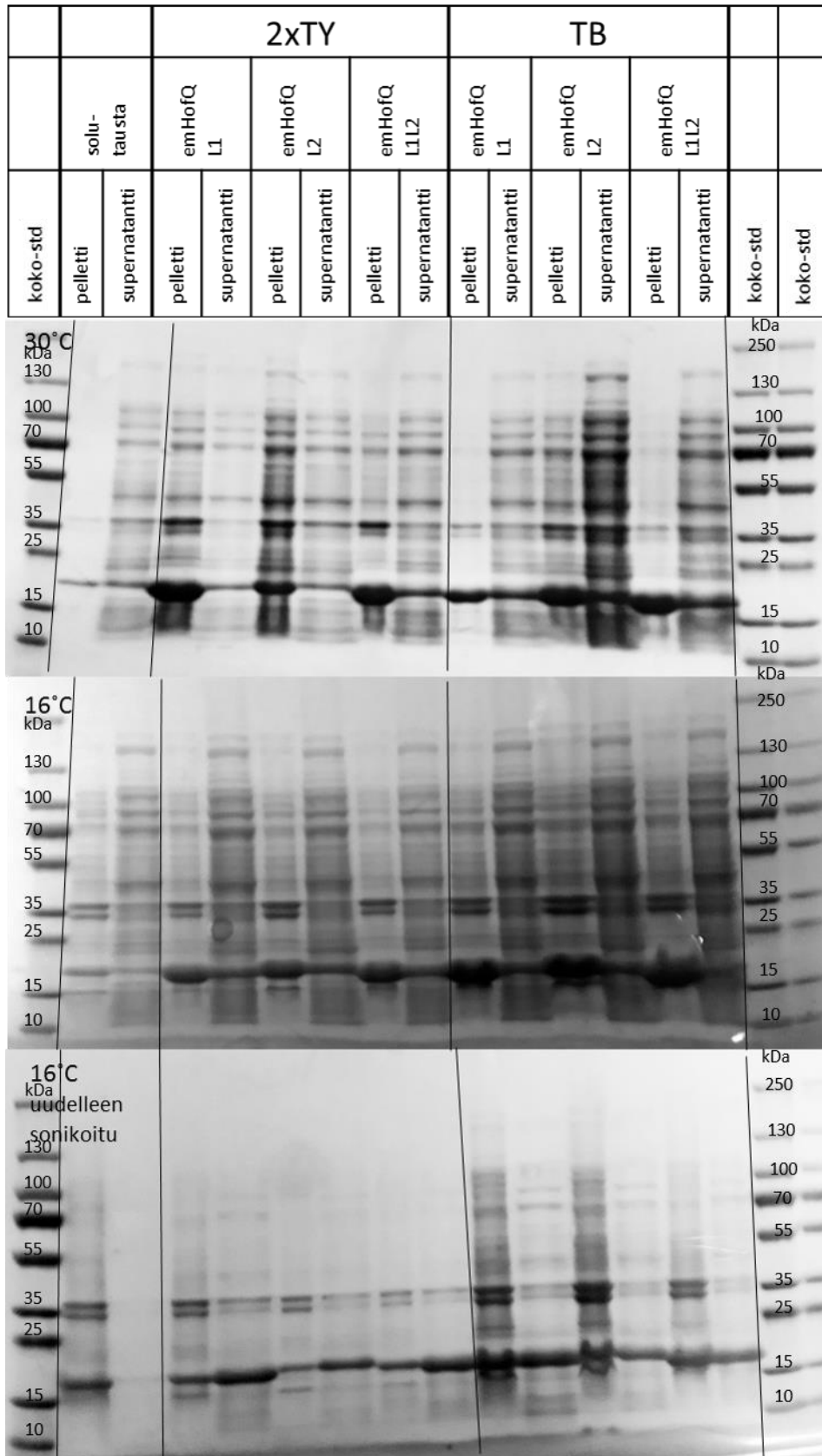
emHofQ-proteiini on histidiini-hännällisenä 20 kDa proteiini, Se on ulkokalvon HofQ-proteiinin N-terminaalinen, solukalvonulkoisen osa. Kuvassa 15 on proteiinin kolmiulotteinen rakenne. Rakenteeseen on merkitty aminohapot, jotka työssä tutkituissa muokatuissa proteiineissa on muutettu alaniiniksi. Aminohappoja on kahdessa eri silmukassa. Muokattuja proteiineja on kolme kappaletta, niistä yhdessä on muutettu silmukan 1 aminohapot (H136, F137, K139), toisessa silmukan 2 aminohapot (D165, R166) ja kolmannessa molempien silmukoiden aminohapot (H136, F137, K139, D165, R166).



Kuva 15 emHofQ-proteiinin rakenne. Kuvassa näkyy emHofQ:n rakenne ja proteiinin ne aminohapot, jotka vaihdettiin alaniineiksi IL-8 sitoutumiskokeita varten. Muokatut aminohapot sijaitsivat kahdessa eri silmukassa.

3.2.1 emHofQ-proteiineja päätettiin tuottaa 16 °C:ssa 2xTY-mediumissa

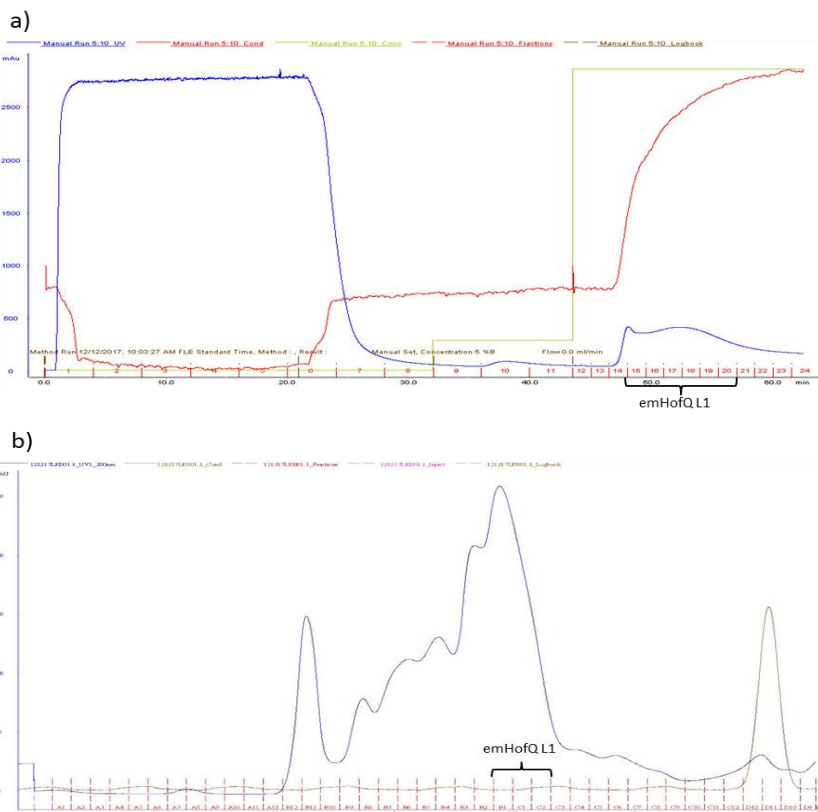
Muokattujen emHofQ-proteiinien tuottoa testattiin eri olosuhteissa, jotta saatiin selville missä olosuhteissa proteiinia tuottuu liukoisena eniten. Testattavina oli kaksi eri tuottolämpötilaa, 30 °C ja 16 °C, ja kaksi eri mediumia, 2xTY ja TB. Soluja kasvatettiin ensin samalla tavalla, kunnes ne saavuttivat tavoiteabsorbanssin, minkä jälkeen proteiinien tuotto indusoidtiin IPTG:llä. Indusoinnin jälkeen solut siirrettiin oikeaan tuottolämpötilaan, jossa niitä kasvatettiin eri ajan riippuen lämpötilasta. Kasvatuksista otettiin näytteet, joista solut sentrifugoitiin erilleen ja suspensoitiin pieneen määrään PBS:ää. Solut hajotettiin sonikoimalla ja solujätteet sentrifugoitiin pohjaan. Valmistettiin geelinäytteet sekä pelletistä että supernatantista ja ajettiin näytteet SDS-geelille (kuva 16). Geeliltä nähtiin, oliko proteiini tuottunut liukoisena, jolloin se löytyy supernatantista, vai liukenemattomassa muodossa, jolloin proteiini löytyy pelletistä. Geeliltä nähtiin, että molemmissa tuottolämpötiloissa tuotettu proteiini löytyi pelletistä, eli se olisi tuottunut liukenemattomana. Epäiltiin kuitenkin solujen hajotuksen onnistumista, sillä siinä oli aiemminkin ollut ongelmia. Hajotettiin 16°C:ssa kasvatetut solut uudelleen käyttäen toista sonikaattoria ja pidempää sonikointiaikaa. Fuugattiin jälleen solujätteet pohjaan ja ajettiin geeli samalla tavalla kuin aiemminkin. Nähtiin, että tällä kertaa proteiinia löytyi supernatantista varsinkin 2xTY-mediumkasvatuksista. Päätettiin tuottaa proteiinia 16°C:ssa, 2xTY-mediumissa.



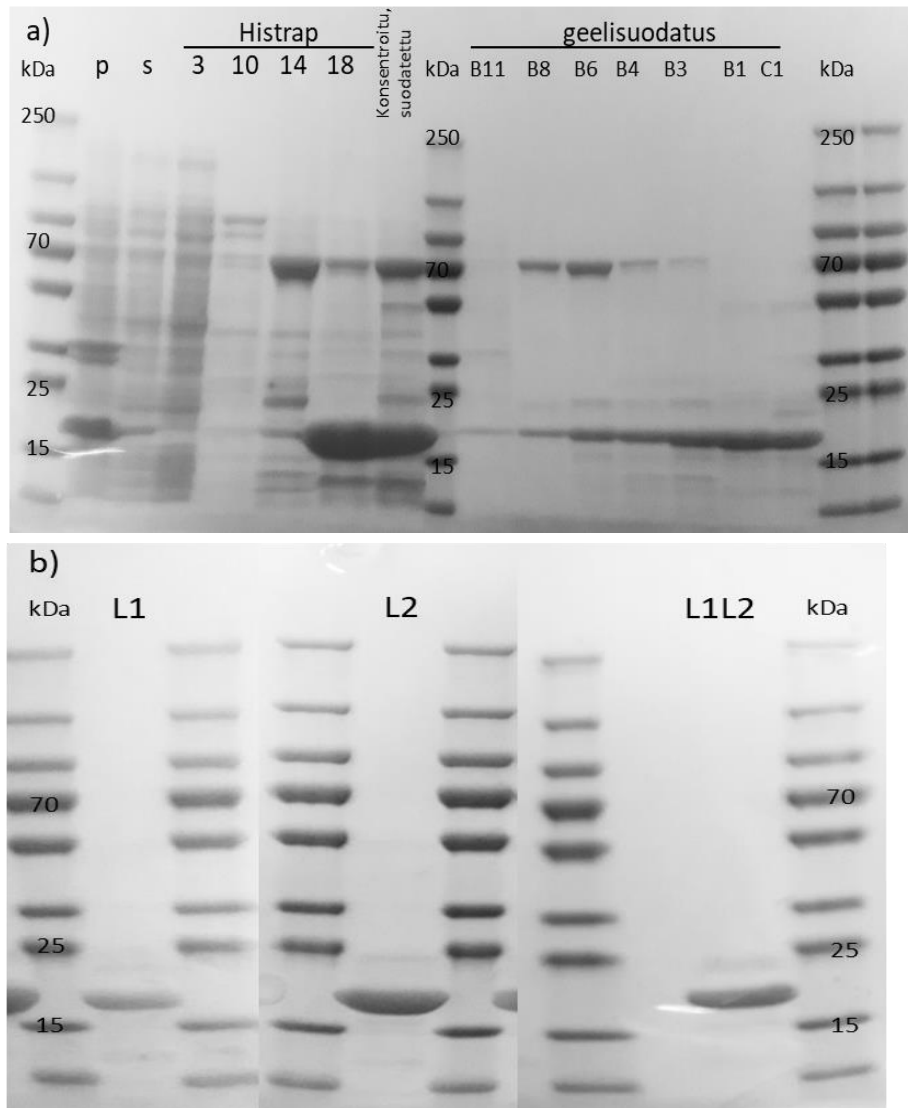
Kuva 16 muokattujen emHofQ-proteiinien tuottotestaukset eri lämpötiloissa. Kaikissa kolmessa geelissä on sama näytejärjestys. Kahdesta ensimmäisessä geelissä nähdään, että emHofQ (kDa) on jäänyt pellettiin, eikä ole liukoisena kuten pitäisi. Epäiltiin syy voisi olla tuotto-olosuhteitten sijasta solujen hajotuksessa, joten hajotettiin 16 °C -näytteet uudelleen ja ajettiin geelille. Tällä kertaa emHofQ löytyi liuksesta varsinkin 2xTY-medium -kasvatuksissa.

3.2.2 emHofQ-proteiineja saatiin puhdistettua hyvin puhtaana

emHofQ-proteiinia tuotettiin recombinanttisesti *E.coli* soluissa His-hännällisenä. Solut kerättiin sentrifugoimalla ja hajotettiin sonikoimalla. Solujätteet sentrifugoitiin erilleen. Proteiini puhdistettiin supernatantista nikkeli-affiniteettikromatografialla (kuva 17 a) ja kokoerottelukromatografialla (kuva 17 b). Puhdistuksista ajettiin SDS-geeli (kuva 18 a), jotta nähtiin, kuinka proteiini puhdistui ja missä geelisuodatusfraktioissa tuotettu proteiini on ja kuinka paljon proteiinia tuottui. Kuvissa 17 a ja b ja 18 a on emHofQ L1-proteiinin puhdistus. Kahden muun muokatun proteiinin puhdistus eteni vastaavasti. Geeliltä (kuva 18 a) nähdään, että proteiinia tuottui hyvin ja sen määrä ja puhtaus kasvavat fraktioissa puhdistuksen edetessä fraktiosta B8 fraktioon C1. Puhdistuksesta konsentroidiin fraktiot B1, C1 ja C2. Geelillä (kuva 18 b) on puhdistetut proteiinit. Nähdään, että proteiini saatiin puhdistettua hyvin puhtaana. Puhdistettujen proteiinien proteiinipitoisuus määritettiin Lowry-menetelmällä.



Kuva 17 EmHofQ-L1-proteiinin puhdistus. emHofQ-L1 puhdistettiin nikkeli-affiniteettikromatografialla (kuva a) ja kokoerottelukromatografialla (kuva b). Kaarisululla on merkitty fraktiot, jotka sisälsivät emHofQ-L1 proteiinia ja otettiin talteen. Muokattujen proteiinien emHofQ-L2 ja emHofQ-L1L2 puhdistus eteni hyvin samalla tavalla ja kuvaajat näyttivät samankaltaisilta.

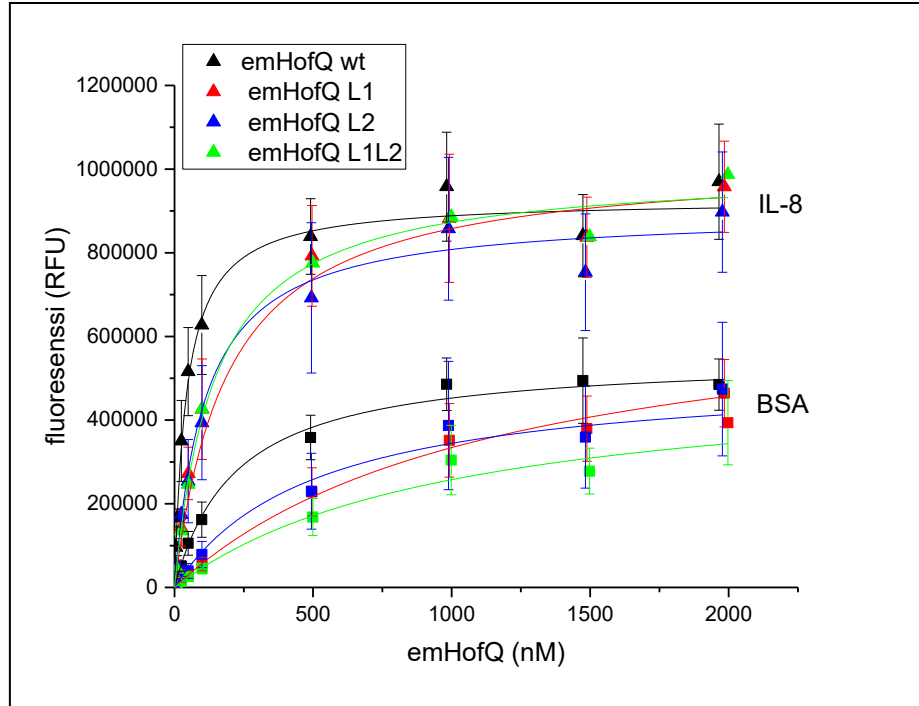


Kuva 18 muokattujen *emHofQ*-proteiinien puhdistus. Geelillä a) näkyy, miten *emHofQ*-L1 on puhdistunut puhdistuksen edetessä. Geelillä b) näkyvät puhdistetut proteiinit. Geeliltä nähdään, että proteiinit on saatu tuotettua hyvin puhtaina.

3.2.3 EuLISA osoitti *emHofQ*mut sitoutuvan villityyppiä huonommin sytokiineihin

IL-8:n ja IL-1 β :n sitoutumista villityypin *emHofQ*-proteiiniin ja muokattuihin *emHofQ*-proteiineihin testattiin EuLISA-analyysin avulla. Pohja päällystettiin hännättömällä, rekombinanttisesti *E. colissa* tuotetulla IL-8:lla/IL-1 β :lla, jonka pinnalle *emHofQ*-proteiinit sitoutuivat. Sitoutuneen *emHofQ*:n määrä määritettiin *emHofQ*:n histidiinihäntään sitoutuvalla Europium-leimatulla vasta-aineella ja aikaerotteisella fluoresenssilla. Tuloksista piirrettiin sitoutumiskäyrät *emHofQ*:n konsentraation suhteen. Havaittiin, että villityypin *emHofQ* sitoutui IL-8:aan voimakkaammin kuin muokatut proteiinit, muokattujen proteiinien välillä sitoutumisessa ei ollut paljon eroja

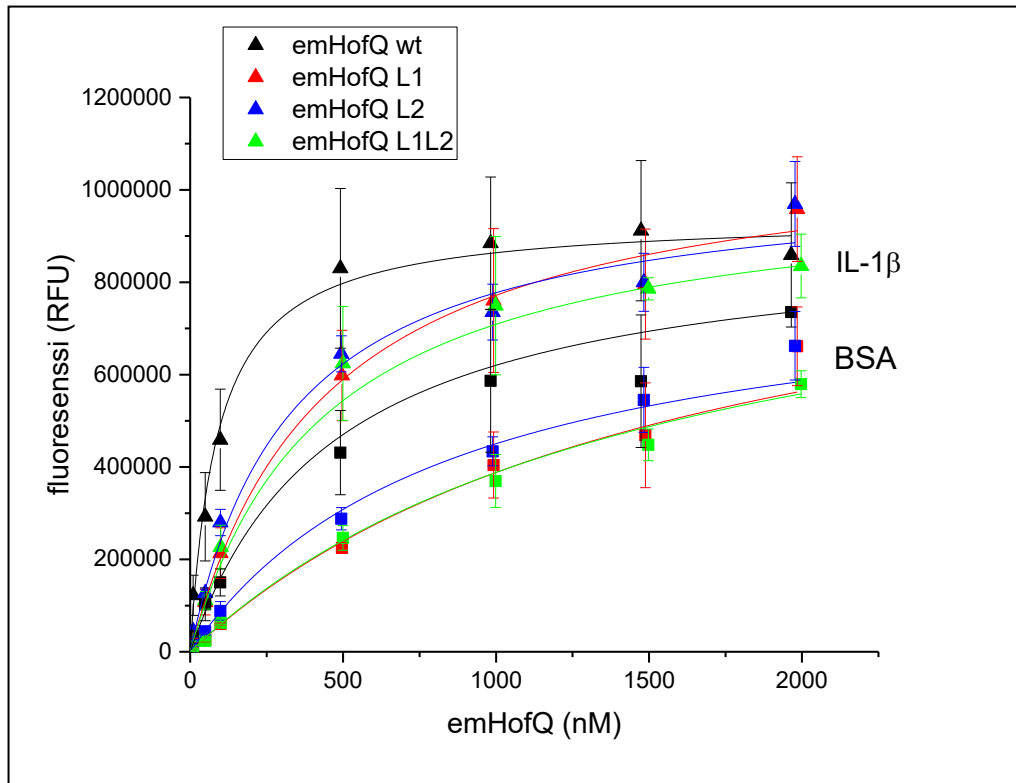
(kuva 19, taulukko 5). Sama vaikutus havaittiin emHofQ:n sitoutumisessa IL-1 β :aan (kuva 20, taulukko 6). emHofQ:n sitoutuminen IL-1 β :aan oli kuitenkin ylipäänsä heikompaa kuin IL-8:aan.



Kuva 19 emHofQ:n sitoutuminen IL-8:aan ja BSA-kontrolliin. Kuvaajasta nähdään, että emHofQ sitoutuu IL-8:aan. Villityypin emHofQ sitoutuu IL-8:aan muokattuja proteiineja paremmin. N=3-6

Taulukko 5 EmHofQ:n IL-8:aan sitoutumisen K_d- ja v_{max}-arvot. Taulukosta nähdään, että villityypin emHofQ sitoutuu paremmin IL-8:aan kuin muokatut emHofQ:t. Muokattujen proteiinien välillä ei ole suuria eroja sitoutumisessa.

		K _d (nM)	SD(K _d) (nM)	v _{max}	SD(v _{max})
IL-8	emHofQ wt	44	8	930 000	70 000
	emHofQ L1	190	60	1 000 000	200 000
	emHofQ L2	110	20	900 000	80 000
	emHofQ L1L2	150	20	1 000 000	30 000
BSA	emHofQ wt	220	60	550 000	9 000
	emHofQ L1	1 200	500	700 000	300 000
	emHofQ L2	500	100	520 000	90 000
	emHofQ L1L2	1 000	400	500 000	200 000



Kuva 20 emHofQ:n sitoutuminen IL-1 β :aan ja BSA-kontrolliin. Kuvaajasta nähdään, että emHofQ sitoutuu IL-1 β :aan. Villityypin emHofQ sitoutuu IL-1 β :aan muokattuja proteiineja paremmin. N=3

Taulukko 6 emHofQ:n IL-1 β :aan sitoutumisen K_d - ja v_{max} -arvot. Taulukosta nähdään, että villityypin emHofQ sitoutuu paremmin IL-1 β :aan kuin muokatut emHofQ:t. Muokattujen proteiinien välillä ei ole suuria eroja sitoutumisessa.

		K_d (nM)	$SD(K_d)$ (nM)	v_{max}	$SD(v_{max})$
IL-1 β	emHofQ wt	90	170	900 000	600 000
	emHofQ L1	450	160	1 100 000	300 000
	emHofQ L2	330	70	1 000 000	200 000
	emHofQ L1L2	440	70	1 000 000	100 000
BSA	emHofQ wt	470	160	910 000	60 000
	emHofQ L1	1 700	500	1 000 000	300 000
	emHofQ L2	860	540	800 000	300 000
	emHofQ L1L2	1 600	300	1 000 000	100 000

4. TULOSTEN TARKASTELU

4.1 LPS

Lipopolysakkaridi (LPS) on gram-negatiivisen bakteerin, kuten *A. actinomycetemcomitansin*, pinnan molekyyli, joka koostuu Lipidi A:sta ja polysakkaridista, joka jaetaan ydinosaan ja O-antigeenitoistojaksoon. (Raetz ja Whitfield 2002; Bertani ja Ruiz 2018) LPS muodostaa bakteerisolun uloimman kerroksen, joten ei liene kovin yllättävää, että se on tärkeä molekyyli infektiossa. Se aktivoi monet elimistön solut tuottamaan sytokiineja ja saa aikaan isännän immuunivasteen aktivoinnin (Levin ym. 1999; Díaz-Zúñiga ym. 2014, 2015, 2017; Alvarez ym. 2015)

Tässä työssä testattiin eri sytokiinien sitoutumista *A.actinomycetemcomitansin* eri kantojen ja serotyypin LPS:iin sekä EMSA:lla että EuLISA:lla. EMSA-geeileiltä nähtiin, että IL-8 ja IFN- γ sitoutuivat LPS:ään, mutta IL-1 β ei. Tämä saattaa johtua varauksista. LPS on sen sisältämien fosfaattiryhmien takia negatiivisesti varautunut neutraalissa pH:ssa. IL-8 ja IFN- γ puolestaan ovat positiivisesti varautuneita (teoreettiset pl:t ovat 9,0 ja 9,5 (ExPASy ProtParam tool)) ja sitoutuvat LPS:ään. IL-1 β on negatiivisesti varautunut (teoreettinen pl on 5,1) eikä todennäköisesti sen vuoksi sitoudu LPS:ään.

IL-8:n sitoutumista eri LPS:iin tutkittiin tarkemmin EuLISA:lla. IL-8 sitoutui eri voimakkuuksilla eri A α -kantojen LPS:iin, sitoutumisen voimakkuus oli kuitenkin riippumatonta LPS:n serotyypistä. LPS:t jaettiin kahteen ryhmään sen mukaan, miten voimakasta sitoutuminen oli: hyvin IL-8:aa sitoviin ($K_d < 5 \mu\text{M}$) ja heikosti LPS:ää sitoviin ($K_d > 5 \mu\text{M}$). LPS:t selvästi sitoivat IL-8:aa, mutta eivät erityisen voimakkaasti. Ensimmäisessä ryhmässä on kaikkia kuutta eri serotyyppiä ja jälkimmäisessä serotyyppejä a-c. Ensimmäisessä ryhmässä LPS:ään sitoutuvan IL-8:n määrä (v_{max}) vaihteli kuitenkin huomattavasti. Eniten IL-8:aa sitova LPS Y4 (st b) satoi 3,5 kertaa enemmän IL-8 kuin vähiten sitova LPS 1151 (st c). v_{max} oli myös serotyypistä riippumaton.

Koska sitoutumisen voimakkuus vaihteli huomattavasti kannasta toiseen, mutta oli serotyypistä riippumaton, selvitettiin muita tekijöitä, jotka voisivat vaikuttaa

sitoutumiseen. LPS:n epäpuhtauksista selvitettiin proteiinien, DNA:n ja PGA:n (Isopropyl β - D -1-thiogalactopyranoside) pitoisuudet. PGA-määrityksestä ei saatu mitattavia arvoja ja IL-8:n sitoutumisen voimakkuus oli riippumatonta proteiinien ja DNA:n määrästä, joten epäselväksi jäi, mikä tekijä sitoutumiseen vaikutti. Tulokset kuitenkin puoltavat johtopäätöstä, että sytokiineista ainakin IL-8 sitoutuu *A. actinomycetemcomitansin* LPS:ään. Se, mistä sitoutumisen voimakkuus riippuu, ei selvinnyt. Mahdollisesti LPS konsentroi sytokiineja, ainakin IL-8:aa, bakteerisolun pinnalle. IL-8 sitoutuu LPS:ään sellaisella voimakkuudella, että LPS pystyy luovuttamaan IL-8:n eteenpäin bakteerisolun sisään kuljetettavaksi.

4.2 LPS:n eristysmenetelmä ja pitoisuuden määrittäminen olivat mahdollisia virhelähteitä LPS-työssä

LPS EuLISA:ssa eri LPS:t sitoivat IL-8:a eri voimakkuuksilla, jotka eivät kuitenkaan olleet riippuvaisia epäpuhtauksina olevien DNA:n, proteiinien tai PGA:n määrästä eikä LPS:n serotyypistä. Ongelmallista oli, että eristetyt LPS:t ylipäättään sisälsivät merkittäviä määriä epäpuhtauksia. LPS:n pitoisuutta oli myös vaikea määrittää luotettavasti ja toistettavasti.

4.2.1 LPS:n eristysmenetelmää pitää kehittää

LPS EuLISA:ssa oli ongelmia, jotka saattavat johtua menetelmästä, jolla LPS:ää eristettiin. LPS:ään jäi melko paljon epäpuhtauksia, jotka mahdollisesti vaikuttavat tuloksiin. Sitoutumiskokeen tulokset eivät korreloineet epäpuhtauksien pitoisuuksien kanssa, mutta niiden vaikutusta ei silti voi sulkea kokonaan pois. Etenkään kun tulokset eivät riippuneet myöskään millään tavalla LPS:n serotyypistä.

Menetelmä on muokattu aiemmin julkaistusta menetelmästä (Paju ym. 2000). Käytetyssä menetelmässä epäpuhtautena olevat proteiinit pyrittiin hajottamaan proteinaasi K:lla. Tästä huolimatta niitä oli vielä eristetyssä LPS:ssäkin. Täytyisi siis miettiä miten niistä pääsisi paremmin eroon. Ratkaisu voisi olla esimerkiksi proteinaasikäsittelyn pidentäminen. Proteiinien hajotusta voisi parantaa myös proteinaasien määrää lisäämällä, mutta tällöin saatettaisiin pahimmassa tapauksessa

pahentaa ongelmaa, jos käytetyistä proteinaaseista ei päästä puhdistuksessa eroon vaan ne jäävät valmiiseen tuotteeseen.

LPS:ssä oli epäpuhtautena myös DNA:ta. Epäpuhtautena oleva DNA päätyy myös sitoutumiskokeisiin, sillä sekä DNA että LPS ovat negatiivisesti varautuneita niiden sisältämien fosfaattiryhmien takia ja sitoutuvat positiivisesti varautuneeseen poly-L-lysiiniin, jolla kuopat päällystettiin. DNA:sta voisi yrittää päästä eroon DNAaasi käsittelyllä. Käytetyssä menetelmässä LPS:ää puhdistettiin lopuksi saostamalla samalla menetelmällä, jota käytetään DNA:n saostamiseen (Ip ym. 2014), joten tämä vaihe ei edesauta DNA:sta eroon pääsemistä.

Saostusmenetelmän sijasta voidaan LPS:n puhdistamiseen käyttää geelisuodatusta (Perry ym. 1996a). Geelisuodatuksella päästäisiin todennäköisesti hyvin eroon epäpuhtauksista. Hankaluutena tässä menetelmässä olisi mahdollisesti se, että LPS:ää joutuisi puhdistuksen aikana enemmän hukkaan, jolloin lähtömateriaalina käytettäviä bakteereja täytyisi kasvattaa enemmän, jotta saataisiin sama määrä LPS:ää. Sileitä *A.actinomycetemcomitans*kantoja pystyttäisiin kasvattamaan maljojen sijasta myös liuoksessa, jolloin niiden kasvattaminen suurissa määrissä olisi helpompaa. Liuoksessa elävillä bakteerisolulla on kuitenkin erilainen aineenvaihdunta biofilmissä eläviin bakteereihin verrattuna (Llama-Palacios ym. 2017). Täten ei voi tietää, miten liuoksessa eläminen vaikuttaa normaalisti pinnoilla elävän bakteerin ulkoasuun.

4.2.2 LPS:n pitoisuuden määrittäminen ei ollut toistettava

Mahdollinen selitys eri LPS:ien kyvylle sitoa IL-8:a voisi olla siinä, että eri LPS:iä oli kuopan pohjalla eri verran, sillä LPS:n pitoisuus oli vaikea määrittää. LPS:n pitoisuus määritettiin endotoksiinimenetelmällä, joka mittaa LPS:n lipidiosan konsentraatiota. LPS-pitoisuuden määrittämisen toistettavuudessa oli ongelmia, samalle LPS:lle saatiin jostain syystä eri mittauseroilla eri pitoisuus.

Ongelmallista määrittämisessä oli se, että menetelmä LPS:n pitoisuuden määrittämiseen perustuu lipidi A:n pitoisuuden mittaamiseen. Koska O-polysakkaridin pituus saattaa vaihdella huomattavasti eri LPS:illä, (Bertani ja Ruiz 2018) ei O-polysakkaridin määrää eri näytteissä pystytty määrittämään. Vaikka eri LPS:illä olisi sama lipidi A-konsentraatio, saattaa LPS:n määrä painoyksikössä vaihdella. Meidän tutkimuksemme

tavoite oli vertailla nimenomaan eri serotyypin välisiä eroja eli O-polysakkaridien merkitystä sitoutumiselle. Ongelmallista oli myös se, että menetelmä oli luotu epäpuhtautena olevan LPS:n määrittämiseen ja oli siten todella herkkä. LPS:istä täytyi tehdä pitkät laimennossarjat, joiden tekemiseen käytetyn kaupallisen reagenssarjan endotoksiinittomat putket eivät riittäneet, joten määrittämiä saattoivat häiritä laimennossarjoihin käytettyjen putkien mahdollisesti sisältämät endotoksiinit. Menetelmä oli myös suunniteltu paljon pienemmille näytemäärille kuin mihin meillä oli tarvetta. On myös mahdollista, että inkubaatioajat, jotka menetelmässä olivat tarkkaan määritellyt, olivat todellisuudessa eri pituisia eri näytteille, johtuen inhimillisestä tekijästä. Riippuen siitä kuinka herkkä menetelmä on inkubaatioaikojen vaihtelulle saattaa tämä selittää tulosten heikkoa toistettavuutta. Jos tutkimuksia siis jatkettaisiin, olisi tärkeää pyrkiä löytämään tarkoitukseen paremmin soveltuva LPS:n määrän mittaumenetelmä.

LPS:n tarkalla pitoisuudella ei toisaalta välttämättä ole merkitystä tuloksiin. EuLISA:ssa pyrittiin käyttämään ylimäärää LPS:ää, jolloin ylimääräinen LPS huuhtoutui pois, eikä erot kuopan pohjalla olevan LPS:n määrässä välttämättä ole yhtä suuret kuin liuosten LPS-pitoisuuksissa. Ei ole kuitenkaan keinoa varmistua tässä. LPS sitoutuu huonosti kuopan pohjalle, joten kuopan pohja päällystettiin poly-L-lysiinillä. LPS sitoutuu kuopan pohjalla olevaan poly-L-lysiiniin (Péterfi ja Kocsis 2000).

4.3 emHofQ

Aggregatibakter actinomycetemcomitans on luontaisesti kompetentti eli kykenevä ottamaan sisäänsä DNA:ta. Aiemmin on havaittu, että HofQ on homologiensa tavoin merkittävässä roolissa DNA:n sisäännotossa siirtämällä DNA:ta ulomman solukalvon läpi kalvojen väliseen tilaan (Palchevskiy ja Finkel 2006; Tarry ym. 2011). Mietittiin, voisiko HofQ kuljettaa myös sytokiineja sisään joko yhdessä DNA:n kanssa tai yksin ja siten auttaa bakteerisolua aistimaan isännässään aiheuttamaa tulehdusta. Päätettiin tutkia IL-8:n ja IL-1 β :n sitoutumista emHofQ:hun.

Ryhmässämme oli jo aiemmin tehty alustavia sitoutumiskokeita ja selvitetty cross-linkkauksella emHofQ:n kohta joka olisi lähellä sitoutumiskohtaa (Ahlstrand ym. 2018).

emHofQ:sta tehtiin muokattuja proteiineja, joissa muutettiin useita aminohappoja silmukoista, joiden oli todettu sijaitsevan lähellä sitoutumiskohtaa.

emHofQ sitoutui paremmin IL-8:aan kuin IL-1 β :aan. Molemmilla sytokiineilla oli havaittavissa ero sitoutumisessa muokattujen ja villityypin proteiinien välillä. Tuloksista voitiin päätellä, että kahden silmukan muodostama pinta, josta aminohappoja muutettiin, on todennäköisesti sytokiinien sitoutumiskohta proteiinissa. Muokattujen emHofQ-proteiinien välillä ei havaittu merkittävää eroa. Tämä saattaa johtua siitä, että silmukat ovat yhteydessä toisiinsa vetysidoksin, niin että yhden silmukan muokkaaminen vaikuttaa toisen rakenteeseen muuttaen mahdollista sitoutumiskohtaa myös toisessa silmukassa. Sitoutuminen saattaa myös tapahtua molempiin silmukoihin yhtä aikaa, jolloin kumman silmukan tahansa muokkaaminen heikentää sitoutumista merkittävästi.

4.4 Sytokiinien sisäänoton mahdollinen merkitys bakteereille

Jos bakteerisolut ottavat sytokiineja sisäänsä, emme tiedä tarkasti sitä, miten sisäänotto tapahtuu. Emme tiedä myöskään sitä, mitä sytokiineille tapahtuu bakteerisolun sisällä ja mikä niiden sisäänoton merkitys bakteereille on. Mahdollisesti niitä käytetään ravintona, kuten sisäänotettua DNA:ta saatetaan käyttää (Veening ja Blokesch 2017) tai isännässä aiheutetun tulehduksen aistimiseen. Sytokiinit toimivat elimistön immuunipuolustuksen säätelijöinä, (Dembic 2015*a, c, d, b*) joten niiden sisäänotolla saatetaan myös häiritä isännän viestintää ja immuunipuolustusta. IL-8 esimerkiksi kutsuu neutrofiilit tulehduspaikalle konsentraatiogradientin avulla (Tonetti ym. 1998), joten IL-8:n sisäänotto saattaa suojella bakteerisolua fagosytoosilta.

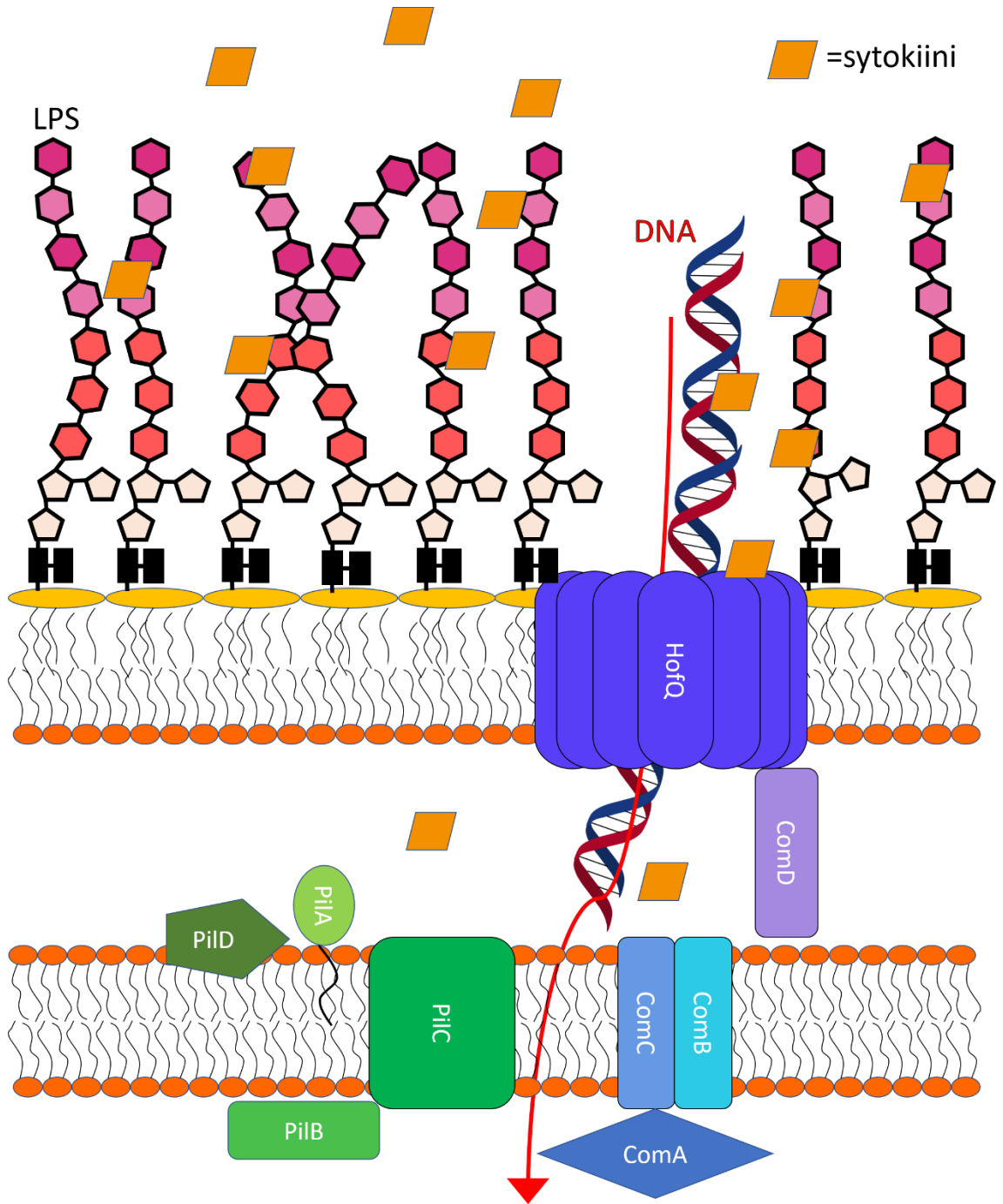
5. PÄÄTELMÄT

Tässä tutkimuksessa osoitettiin, että sytokiineista IL-8 sitoutuu LPS:ään, joka on bakteerisolun ulommalla solukalvolla esiintyvä lipidi ja siihen liittynyt polysakkaridiketju. Osoitettiin myös, että sytokiinit IL-8 ja IL-1 β sitoutuvat membraaniproteiini HofQ:n solunulkoiseen osaan, emHofQ. HofQ on ulomman solukalvon kanavaproteiini, joka kuljettaa DNA:ta bakteerisolun kalvojen väliseen tilaan ja mahdollisesti myös joitain proteiineja solukalvon läpi sisään ja ulos.

Hypoteesina on, että LPS kerää sytokiineja bakteerisolun ulkopuolelta solukalvon läheisyyteen, josta HofQ siirtää ne edelleen periplasmiseen, kalvojen väliseen tilaan, joko yhdessä DNA:n kanssa tai DNA:sta riippumatta (kuva 21).

Tulevaisuudessa voisi olla hyvä tutkia, mitä muita sytokiineja tai muita molekyyliä HofQ mahdollisesti siirtää bakteerisolun ulkopuolelta sisään periplasmiseen tilaan ja mikä merkitys LPS:llä prosessissa on. Lisäksi voitaisiin tutkia, mitkä proteiinikoneistot siirtävät sytokiinit edelleen periplasmisesta tilasta sisemmän solukalvon läpi sisälle bakteerisoluuun. Olisi myös mielenkiintoista tietää mitä sytokiineille tapahtuu solun sisällä ja mikä niiden merkitys bakteerisoluille on.

Aihe olisi tarkempien tutkimuksien arvoinen, sillä sen ymmärtäminen, miten sytokiinit vuorovaikuttavat bakteerisolujen kanssa, voi auttaa ymmärtämään kuinka bakteerit onnistuvat suojautumaan isännän puolustusreaktioilta. Ymmärrys voi auttaa meitä jonain päivänä löytämään tehokkaat hoitokeinot vaikeasti hoidettavissa oleviin iensairauksiin.



Kuva 21 Sytokiinien sisäänotto gram-negatiivisen bakteerisolun sisään. LPS konsentroi sytokiineja, josta HofQ siirtää ne kalvojen väliseen tilaan. HofQ siirtää sytokiineja joko yksin tai yhdessä DNA:n kanssa. Kalvojen välisestä tilasta sytokiinit siirretään solun sisään käyttäen muita koneistoja, mahdollisesti Pil- ja Com-komplekseja. Kuvassa LPS on yksinkertaisuuden vuoksi kuvattu lyhyempänä kuin se todellisuudessa esiintyy. Hypoteettinen malli.

KIRJALLISUUS

- Ahlstrand, T., Torittu, A., Elovaara, H., Välimaa, H., Pöllänen, M. T., Kasvandik, S., Högbom, M. & Ihalin, R. (2018) Interactions between the *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* secretin HofQ and host cytokines indicate a link between natural competence and interleukin-8 uptake. *Virulence* **9**:1205–1223.
- Akdis, M., Aab, A., Altunbulakli, C., Azkur, K., Costa, R. A., Cramer, R., Duan, S., Eiwegger, T., Eljaszewicz, A., Ferstl, R., Frei, R., Garbani, M., Globinska, A., Hess, L., Huitema, C., Kubo, T., Komlosi, Z., Konieczna, P., Kovacs, N., Kucuksezer, U. C., Meyer, N., Morita, H., Olzhausen, J., O'Mahony, L., Pezer, M., Prati, M., Rebane, A., Rhyner, C., Rinaldi, A., Sokolowska, M., Stanic, B., Sugita, K., Treis, A., van de Veen, W., Wanke, K., Wawrzyniak, M., Wawrzyniak, P., Wirz, O. F., Zakzuk, J. S. & Akdis, C. A. (2016) Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* **138**:984–1010.
- Alvarez, C., Benítez, A., Rojas, L., Pujol, M., Carvajal, P., Díaz-Zúñiga, J. & Vernal, R. (2015) Differential expression of CC chemokines (CCLs) and receptors (CCRs) by human T lymphocytes in response to different *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes. *J. Appl. Oral Sci.* **23**:536–546.
- Asikainen, S., Chen, C. & Slots, J. (1995) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* genotypes in relation to serotypes and periodontal status. *Oral Microbiol. Immunol.* **10**:65–68.
- Ataie-Kachoie, P., Pourgholami, M. H., Richardson, D. R. & Morris, D. L. (2014) Gene of the month: Interleukin 6 (IL-6). *J. Clin. Pathol.* **67**:932–937.
- Baggiolini, M. & Clark-Lewis, I. (1992) Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* **307**:97–101.
- Benso, B. (2017) Virulence factors associated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and their role in promoting periodontal diseases. *Virulence* **8**:111–114.
- Bertani, B. & Ruiz, N. (2018) Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. *EcoSal Plus* **8**:1–19.
- Bleicher, F. (2014) Odontoblast physiology. *Exp. Cell Res.* **325**:65–71.
- Chen, C., Wang, T. & Chen, W. (2010a) Occurrence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes in subgingival plaque from United States subjects. *Mol. Oral Microbiol.* **25**:207–214.
- Chen, C., Kittichotirat, W., Chen, W., Downey, J. S., Si, Y. & Bumgarner, R. (2010b) Genome sequence of naturally competent *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotype a strain D7S-1. *J. Bacteriol.* **192**:2643–4.
- Claesson, R., Höglund-Åberg, C., Haubek, D. & Johansson, A. (2017) Age-related prevalence and characteristics of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in periodontitis patients living in Sweden. *J. Oral Microbiol.* **9**:1334504.
- Cochran, D. L. (2008) Inflammation and Bone Loss in Periodontal Disease. *J. Periodontol.* **79**:1569–1576.

Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999) Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*. **284**:1318–1322.

Darveau, R. P. (2010) Periodontitis: A polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**:481–490.

Dembic, Z. (2015a) Chapter 5 – Cytokines of the Immune System: Interferons. *The Cytokines of the Immune System* ss. 123–142. Academic Press, Amsterdam.

Dembic, Z. (2015b) Chapter 8 – Cytokines Important for Growth and/or Development of Cells of the Immune System. *The Cytokines of the Immune System* ss. 263–281. Academic Press, Amsterdam.

Dembic, Z. (2015c) Chapter 6 – Cytokines of the Immune System: Interleukins. *The Cytokines of the Immune System* ss. 143–239. Academic Press, Amsterdam.

Dembic, Z. (2015d) Chapter 7 – Cytokines of the Immune System: Chemokines. *The Cytokines of the Immune System* ss. 241–262. Academic Press, Amsterdam.

Dembic, Z. (2015e) Chapter 4 – The Role and Regulation of the Immune Responses. *The Cytokines of the Immune System* ss. 99–122. Academic Press, Amsterdam.

Dembic, Z. (2015f) Chapter 3 – Activation of Cells of the Immune System. *The Cytokines of the Immune System* ss. 57–98. Academic Press, Amsterdam.

Deng, Y., Wang, Z., Chang, C., Lu, L., Lau, C. S. & Lu, Q. (2017) Th9 cells and IL-9 in autoimmune disorders: Pathogenesis and therapeutic potentials. *Hum. Immunol.* **78**:120–128.

Díaz-Zúñiga, J., Yáñez, J. P., Alvarez, C., Melgar-Rodríguez, S., Hernández, M., Sanz, M. & Vernal, R. (2014) Serotype-dependent response of human dendritic cells stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J. Clin. Periodontol.* **41**:242–251.

Díaz-Zúñiga, J., Melgar-Rodríguez, S., Alvarez, C., Monasterio, G., Benítez, A., Ciuchi, P., Díaz, C., Mardones, J., Escobar, A., Sanz, M. & Vernal, R. (2015) T-lymphocyte phenotype and function triggered by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is serotype-dependent. *J. Periodontal Res.* **50**:824–835.

Díaz-Zúñiga, J., Melgar-Rodríguez, S., Monasterio, G., Pujol, M., Rojas, L., Alvarez, C., Carvajal, P. & Vernal, R. (2017) Differential human Th22-lymphocyte response triggered by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes. *Arch. Oral Biol.* **78**:26–33.

Dinarello, C. A. (2000) Proinflammatory cytokines. *Chest* **118**:503–508.

Ferguson-Smith, A. C., Chen, Y. F., Newman, M. S., May, L. T., Sehgal, P. B. & Ruddle, F. H. (1988) Regional localization of the interferon- β 2 B-cell stimulatory factor 2/hepatocyte stimulating factor gene to human chromosome 7p15-p21. *Genomics* **2**:203–208.

Fernando, H., Chin, C., Rösger, J. & Rajarathnam, K. (2004) Dimer dissociation is essential for interleukin-8 (IL-8) binding to CXCR1 receptor. *J. Biol. Chem.* **279**:36175–36178.

Flemming, H.-C. & Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**:623–633.

- Fujise, O., Lakio, L., Wang, Y., Asikainen, S. & Chen, C. (2004) Clonal distribution of natural competence in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol. Immunol.* **19**:340–342.
- Garlet, G. P. (2010) Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: A re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *J. Dent. Res.* **89**:1349–1363.
- Graves, D. (2008) Cytokines That Promote Periodontal Tissue Destruction. *J. Periodontol.* **79**:1585–1591.
- Graziani, F., Karapetsa, D., Alonso, B. & Herrera, D. (2017) Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? *Periodontol. 2000* **75**:152–188.
- Groeger, S. & Meyle, J. (2019) Oral mucosal epithelial cells. *Front. Immunol.* **10**:1–22.
- Hailey, K. L., Li, S., Andersen, M. D., Roy, M., Woods, V. L. & Jennings, P. A. (2009) Pro-interleukin (IL)-1 β shares a core region of stability as compared with mature IL-1 β while maintaining a distinctly different configurational landscape: a comparative hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry study. *J. Biol. Chem.* **284**:26137–48.
- Hajishengallis, G. (2014) Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: Keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol.* **35**:3–11.
- Hall, C. W. & Mah, T. F. (2017) Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**:276–301.
- Heinrichs, D. E., Yethon, J. A. & Whitfield, C. (1998) Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* **30**:221–232.
- Henderson, B., Wilson, M., Sharp, L. & Ward, J. M. (2002) *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Med. Microbiol* **51**:1013–1020.
- Henderson, B., Ward, J. M. & Ready, D. (2010) *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans*: A triple A* periodontopathogen? *Periodontol. 2000* **54**:78–105.
- Höglund Åberg, C., Antonoglou, G., Haubek, D., Kwamin, F., Claesson, R. & Johansson, A. (2013) Cytotoxic distending toxin in isolates of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* from Ghanaian adolescents and association with serotype and disease progression. *PLoS One* **8**:e65781.
- Holdsworth, S. R. & Can, P. Y. (2015) Cytokines: Names and numbers you should care about. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **10**:2243–2254.
- Hovav, A. H. (2014) Dendritic cells of the oral mucosa. *Mucosal Immunol.* **7**:27–37.
- Huang, G. T. J., Potente, A. P., Kim, J.-W., Chugal, N. & Zhang, X. (1999) Increased interleukin-8 expression in inflamed human dental pulps. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **88**:214–220.
- Huang, Y., Kittichotirat, W., Mayer, M. P. A., Hall, R., Bumgarner, R. & Chen, C. (2013) Comparative genomic hybridization and transcriptome analysis with a pan-genome microarray

reveal distinctions between JP2 and non-JP2 genotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Mol. Oral Microbiol.* **28**:1–17.

Ip, A. C. F., Tsai, T. H., Khimji, I., Huang, P. J. J. & Liu, J. (2014) Degradable starch nanoparticle assisted ethanol precipitation of DNA. *Carbohydr. Polym.* **110**:354–359.

Ito, H. O., Shuto, T., Takada, H., Koga, T., Aida, Y., Hirata, M. & Koga, T. (1996) Lipopolysaccharides from *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* promote osteoclastic differentiation in vitro. *Arch. Oral Biol.* **41**:439–444.

Kanasi, E., Doğan, B., Karched, M., Thay, B., Oscarsson, J. & Asikainen, S. (2010) Lack of Serotype Antigen in *A. actinomycetemcomitans*. *J. Dent. Res.* **89**:292–296.

Kaplan, J. B., Perry, M. B., MacLean, L. L., Furgang, D., Wilson, M. E. & Fine, D. H. (2001) Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. *Infect. Immun.* **69**:5375–5384.

Kim, T.-S., Frank, P., Eickholz, P., Eick, S. & Kim, C. K. (2009) Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Patients With Different Ethnic Backgrounds . *J. Periodontol.* **80**:2020–2027.

Kittichotirat, W., Bumgarner, R. E., Asikainen, S. & Chen, C. (2011) Identification of the pangenome and its components in 14 distinct *aggregatibacter actinomycetemcomitans* strains by comparative genomic analysis. *PLoS One* **6**:e22420.

Kittichotirat, W., Bumgarner, R. E. & Chen, C. (2016) Evolutionary Divergence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J. Dent. Res.* **95**:94–101.

Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Periasamy, S. & Jakubovics, N. S. (2010) Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**:471–80.

Komazaki, R., Katagiri, S., Takahashi, H., Maekawa, S., Shiba, T., Takeuchi, Y., Kitajima, Y., Ohtsu, A., Udagawa, S., Sasaki, N., Watanabe, K., Sato, N., Miyasaka, N., Eguchi, Y., Anzai, K. & Izumi, Y. (2017) Periodontal pathogenic bacteria, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* affect non-alcoholic fatty liver disease by altering gut microbiota and glucose metabolism. *Sci. Rep.* **7**:1–14.

Levin, L. G., Rudd, A., Bletsa, A. & Reisner, H. (1999) Expression of IL-8 by cells of the odontoblast layer in vitro. *Eur. J. Oral Sci.* **107**:131–137.

Lewis, K. (2008) Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **322**:107–131.

Llama-Palacios, A., Potupa, O., Sánchez, M. C., Figuero, E., Herrera, D. & Sanz, M. (2017) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Growth in Biofilm versus Planktonic State: Differential Expression of Proteins. *J. Proteome Res.* **16**:3158–3167.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265–275.

Masoud, H., Weintraub, S. T., Wang, R., Cotter, R. & Holt, S. C. (1991) Investigation of the

structure of lipid A from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain Y4 and human clinical isolate PO 1021-7. *Eur. J. Biochem.* **200**:775–781.

Melgar-Rodríguez, S., Díaz-Zúñiga, J., Alvarez, C., Rojas, L., Monasterio, G., Carvajal, P., Escobar, A., Sanz, M. & Vernal, R. (2016) Serotype b of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* increases osteoclast and memory T-lymphocyte activation. *Mol. Oral Microbiol.* **31**:162–174.

Müller-Loennies, S., Lindner, B. & Brade, H. (2003) Structural Analysis of Oligosaccharides from Lipopolysaccharide (LPS) of *Escherichia coli* K12 Strain W3100 Reveals a Link between Inner and Outer Core LPS Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **278**:34090–34101.

Munita, J. M. & Arias, C. A. (2016) Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr* **4**:1–37.

Paju, S., Saarela, M., Chen, C., Jousimies-Somer, H., Uitto, V. J. & Asikainen, S. (2000) Altered antigenicity is seen in the lipopolysaccharide profile of non-serotypeable *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **27**:171–177.

Palchevskiy, V. & Finkel, S. E. (2006) *Escherichia coli* competence gene homologs are essential for competitive fitness and the use of DNA as a nutrient. *J. Bacteriol.* **188**:3902–3910.

Paturel, L., Casalta, J. P., Habib, G., Nezri, M. & Raoult, D. (2004) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* endocarditis. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**:98–118.

Perry, M. B., Maclean, L. L., Gmür, R. & Wilson, M. E. (1996a) Characterization of the O-polysaccharide structure of lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b. *Infect. Immun.* **64**:1215–1219.

Perry, M. B., Maclean, L. M., Brisson, J. R. & Wilson, M. E. (1996b) Structures of the antigenic O-polysaccharides of lipopolysaccharides produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, c, d and e. *Eur. J. Biochem.* **242**:682–688.

Péterfi, Z. & Kocsis, B. (2000) Comparison of blocking agents for an ELISA for LPS. *J. Immunoassay* **21**:341–354.

Pietiäinen, M., Kopra, K. A. E., Vuorenkoski, J., Salminen, A., Paju, S., Mäntylä, P., Buhlin, K., Liljestrang, J. M., Nieminen, M. S., Sinisalo, J., Hyvärinen, K. & Pussinen, P. J. (2018) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes associate with periodontal and coronary artery disease status. *J. Clin. Periodontol.* **45**:413–421.

Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S. & Johnson, N. W. (2005) Periodontal diseases. *Lancet* **366**:1809–1820.

Poulsen, K., Theilade, E., Lally, E. T., Demuth, D. R. & Kilian, M. (1994) Population structure of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: A framework for studies of disease-associated properties. *Microbiology* **140**:2049–2060.

Raetz, C. R. H. & Whitfield, C. (2002) Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**:635–700.

Rajagopal, M. & Walker, S. (2017) Envelope Structures of Gram-Positive Bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol.* **404**:1–44.

- Rojas, L., Melgar-Rodríguez, S., Díaz-Zúñiga, J., Alvarez, C., Monasterio, G., Rojas, C., Carvajal, P. & Vernal, R. (2018) Serotype a of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* down-regulates the increased serotype b-induced cytokine and chemokine production in dendritic cells. *Arch. Oral Biol.* **93**:155–162.
- Saarela, M., Asikainen, S., Alaluusua, S., Pyhälä, L., Lai, C.-H. & Jousimies-Somer, H. (1992) Frequency and stability of mono-or poly-infection by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, b, c, d or e. *Oral Microbiol. Immunol.* **7**:277–279.
- Scanu, A., Giraudo, C., Galuppini, F., Lazzarin, V., Pennelli, G., Sivoilella, S., Stellini, E., Oliviero, F., Galozzi, P., Rugge, M., Stramare, R., Luisetto, R. & Punzi, L. (2019) Periodontal Injection of Lipopolysaccharide Promotes Arthritis Development in Mice. *Inflammation* **42**:1117–1128.
- Seitz, P. & Blokesch, M. (2013) Cues and regulatory pathways involved in natural competence and transformation in pathogenic and environmental Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**:336–363.
- Slots, J. (2017) Periodontitis: facts, fallacies and the future. *Periodontol.* **2000** **75**:7–23.
- Smith, K. P., Fields, J. G., Voogt, R. D., Deng, B., Lam, Y.-W. & Mintz, K. P. (2015) The cell envelope proteome of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Mol. Oral Microbiol.* **30**:97–110.
- Smith, R. A. & Baglioni, C. (1987) The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J. Biol. Chem.* **262**:6951–6954.
- Takada, K., Saito, M., Tsuzukibashi, O., Kawashima, Y., Ishida, S. & Hirasawa, M. (2010) Characterization of a new serotype g isolate of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Mol. Oral Microbiol.* **25**:200–206.
- Tang, G., Kawai, T., Komatsuzawa, H. & Mintz, K. P. (2012) Lipopolysaccharides mediate leukotoxin secretion in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Mol. Oral Microbiol.* **27**:70–82.
- Tarry, M., Jääskeläinen, M., Paino, A., Tuominen, H., Ihalin, R. & Högbom, M. (2011) The extra-membranous domains of the competence protein HofQ show DNA binding, flexibility and a shared fold with type I KH domains. *J. Mol. Biol.* **409**:642–653.
- Tonetti, M. S., Imboden, M. A., Gerber, L., Lang, N. P., Laissue, J. & Mueller, C. (1994) Localized expression of mRNA for phagocyte-specific chemotactic cytokines in human periodontal infections. *Infect. Immun.* **62**:4005–4014.
- Tonetti, M. S., Imboden, M. A. & Lang, N. P. (1998) Neutrophil Migration Into the Gingival Sulcus Is Associated With Transepithelial Gradients of Interleukin-8 and ICAM-1. *J. Periodontol.* **69**:1139–1147.
- Trivella, D. B. B., Ferreira-Júnior, J. R., Dumoutier, L., Renauld, J. C. & Polikarpov, I. (2010) Structure and function of interleukin-22 and other members of the interleukin-10 family. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**:2909–2935.
- Veening, J. W. & Blokesch, M. (2017) Interbacterial predation as a strategy for DNA acquisition

in naturally competent bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**:621–629.

Walter, M. R. (2014) The Molecular Basis of IL-10 Function: From Receptor Structure to the Onset of Signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* **380**:191–212.

Wang, Y. & Chen, C. (2005) Mutation analysis of the flp operon in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Gene* **351**:61–71.

Wilensky, A., Segev, H., Mizraji, G., Shaul, Y., Capucha, T., Shacham, M. & Hovav, A.-H. (2014) Dendritic cells and their role in periodontal disease. *Oral Dis.* **20**:119–126.

Yang, G., Ju, Y., Liu, S. & Zhao, S. (2019) Lipopolysaccharide upregulates the proliferation, migration, and odontoblastic differentiation of NG2+ cells from human dental pulp in vitro. *Cell Biol. Int.* **43**:1276–1285.

Yoshida, Y., Suzuki, N., Nakano, Y., Shibuya, K., Ogawa, Y. & Koga, T. (2003) Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes and *Porphyromonas gingivalis* in Japanese adults. *Oral Microbiol. Immunol.* **18**:135–139.

Zijngel, V., Kieselbach, T. & Oscarsson, J. (2012) Proteomics of protein secretion by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *PLoS One* **7**:e41662.