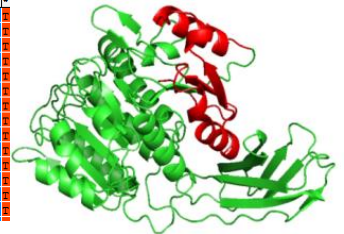
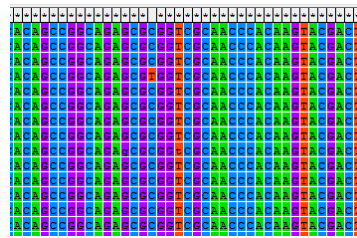
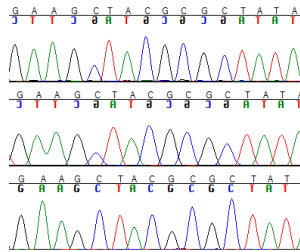
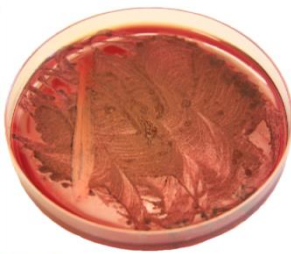


RgpB*-genet; en viktig virulensfaktor hos den periopatogene bakteriearten *Porphyromonas gingivalis

Et molekylærbiologisk studium



Skrevet av
Toan Duy Nguyen og Silje Jeanette Solli
Veiledere: Morten Enersen og Anne Karin Kristoffersen

Masteroppgave i odontologi
Det odontologiske fakultet
Universitetet i Oslo
2014



Forord:

Grunnlaget for oppgaven startet som en sommerstipendiatstilling for 2012. Vi var svært nysgjerrige på hvordan det ville være å forske, samtidig som vi ønsket å få bredere kunnskap innenfor mikrobiologien. Vi tok derfor kontakt med førsteamanuensis Morten Enersen for å finne ut om det var et tilgjengelig prosjekt som kunne være egnet for oss. Det viste seg at man ved Institutt for Oral Biologi hadde begynt på et prosjekt om bakterien *Porphyromonas gingivalis* og genet som koder for proteasen *rgpB*.

Morten Enersen og Anne Karin Kristoffersen hadde tidligere sekvensert *rgpB*-genet (gen som koder for et enzym som bryter ned proteiner) hos 17 *P. gingivalis* stammer. En ønsket å kartlegge forekomsten av genvariasjoner i flere slike bakteriestammer. Vi var derfor heldige som fikk muligheten til å bygge videre på dette arbeidet ved å sekvensere *rgpB*-genet hos 12 nye stammer sommeren 2012. Denne sommeren var spennende og innholdsrik, og vi ønsket derfor å jobbe videre med prosjektet sommeren 2013 for å bruke det vi hadde lært som grunnlag for denne mastergradsoppgaven. Dette ble innvilget, og vi brukte den påfølgende sommeren til å arbeide videre med *rgpB*-genet. Målet denne gangen var å ligere deler av *rgpB*-genet inn i et plasmid, for deretter å transformere det inn i en *Escherichia coli* bakterier. Disse bakteriene skulle uttrykke to forskjellige genfragmenter fra to forskjellige bakteriestammer på proteinnivå. På denne måten kan man studere proteinstrukturen ytterligere.

Vi vil rette en stor takk til våre veiledere Anne Karin Kristoffersen og Morten Enersen ved Institutt for Oral biologi for svært god hjelp, tett oppfølging og gode tilbakemeldinger både under forskningsperioden og under produksjonen av masteroppgaven. Deres kunnskap og faglig engasjement har vært til stor hjelp under hele prosessen som har vært svært spennende og lærerik.

INNHALDSFORTEGNELSE

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUKSJON | 4 |
| 1.1 Periodontale sykdommer | 4 |
| 1.2 Periodontal mikrobiologi og patogenese | 6 |
| 1.3 Periodontal mikroflora og kardiovaskulære sykdommer | 8 |
| 1.4 <i>Porphyromonas gingivalis</i> og virulensfaktorer | 9 |
| 1.5 RgpB | 11 |
| 2. MATERIALE OG METODE | 13 |
| 2.1 Del I av prosjektet: Sekvensere 12 <i>rgpB</i> -gen fra kliniske stammer | 13 |
| 2.1.1 Bakteriestammer og vekstforhold | 13 |
| 2.1.2 DNA-ekstraksjon..... | 14 |
| 2.1.3 Polymerase chain reaction (PCR) | 15 |
| 2.1.4 Sekvensering av <i>rgpB</i> -genet..... | 18 |
| 2.1.5 Sequencer 4.9 og Molecular Evolutionary Genetics Analysis 5 (MEGA 5) | 21 |
| 2.2 Del II av prosjektet: kloner 2 ulike <i>rgpB</i> -gener inn i en ekspresjonsvektor | 22 |
| 2.2.1 Kloningsvektorer | 22 |
| 2.2.2 Ligering av <i>rgpB</i> -genfragment inn i kloningsvektor..... | 22 |
| 2.2.3 Transformasjon..... | 25 |
| 3. RESULTATER | 26 |
| 3.1 Resultater fra del I av prosjektet..... | 26 |
| 3.2 Resultater fra del II av prosjektet | 29 |
| 4. Diskusjon | 31 |
| 5. Ordliste..... | 35 |
| 6. Oppskrifter | 38 |
| 6.1 Agarløsning 1: | 38 |
| 6.2 Anaerobe forhold:..... | 38 |
| 6.3 TE-buffer: | 38 |

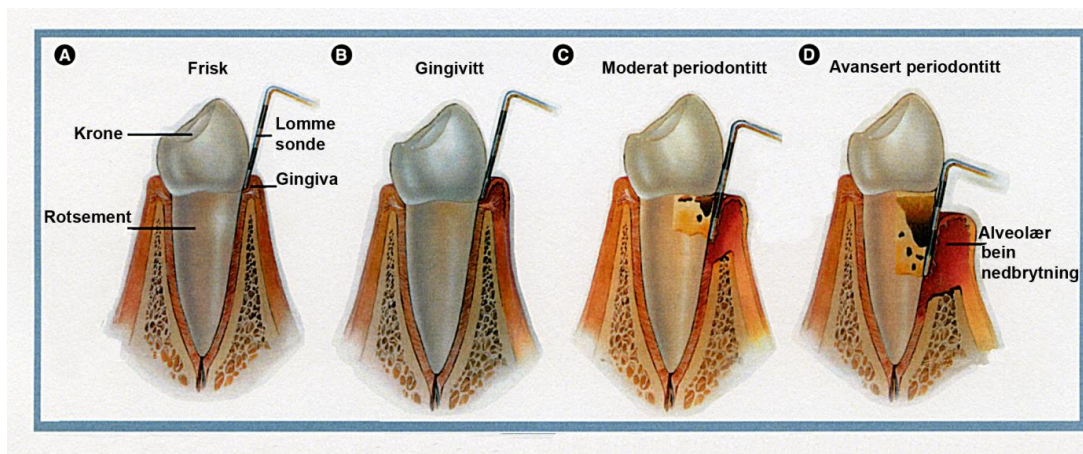
| | | |
|------|---|----|
| 6.4 | PCR-reaksjonsmiks: | 38 |
| 6.5 | Agarosegel: | 38 |
| 6.6 | Spesifikasjoner PCR reaksjon med BigDye sekvenseringsmiks | 38 |
| 6.7 | PCR-reaksjonsmiks 2: | 39 |
| 6.8 | Innstillinger for PCR maskinen for PCR-reaksjonsmiks 2:..... | 39 |
| 6.9 | Agarløsning 2: | 39 |
| 6.10 | Isolering av vektorer | 39 |
| 7. | REFERANSER | 43 |

1. INTRODUKSJON

1.1 Periodontale sykdommer

Periodontale sykdommer er en gruppe sykdommer som angriper tennenes støttevev, og som ubehandlet kan føre til tap av en eller flere tenner (Figur 1.1). Fullstendig tanntap kan også forekomme hos noen pasienter. På grunn av den kroniske tilstanden som periodontale sykdommer representerer, kan man over lengre tid som pasient være uvitende om dette fordi det vanligvis ikke er forbundet med smerter eller ubehag. Selv om enkel diagnostikk ved et tannlegebesøk kan avdekke hvorvidt pasienten har et tannkjøttproblem, ser man ikke så sjelden at disse tilstandene overses.

Det finnes ulike diagnoser innen gruppen av periodontale sykdommer, og på grunn av store variasjoner i progresjonshastighet og alvorlighetsgrad, så vel som i individuell behandlingsrespons, representerer de en ikke-homogen sykdomsgruppe [1, 2]. Et fellestrekk for dem er imidlertid at hovedårsaken skyldes ansamling av bakteriebelegg som fester seg på tannoverflatene, og som forårsaker infeksjon og medfølgende inflammatoriske tilstander i tennenes støttevev. Fordi tannoverflatene er et hardvev som ikke fornyes slik som alle andre vevsoverflater i kroppen, får bakteriene en spesiell mulighet til å organisere seg i form av en såkalt *dental biofilm*, tidligere kalt *dentalt plakk*. Biofilmen kan fjernes mekanisk ved tannpuss og opprensing hos tannlegen eller kjemisk ved hjelp av antibakterielle skyllemidler. Etablering av dental biofilm på tennene medfører i løpet av kort tid en endring av kvalitet i henhold til den økologiske plakkhypotese [2], og biofilmen vil ganske snart domineres av en rekke anaerobe bakteriearter [3, 4]. Så lenge biofilmen er lokalisert til tannkjøttskanten og kun koloniserer den gingivale sulcus, blir inflammasjonen kalt *gingivitt*. Over tid kan bakteriebelegget spre seg ned under tannkjøttskanten, beholde sin dominans av anaerobe arter og resultere i en spredning av inflammasjonen ned i periodontiet med etterfølgende festetap og lommedannelse. Da kalles tilstanden *periodontitt* [3].



Figur 1.1: Illustrasjon av de ulike stadiene i periodontiet, fra frisk tilstand til avansert periodontitt. Modifisert etter [5].

På verdensbasis representerer periodontale sykdommer et alvorlig helseproblem. Prevalensen varierer blant annet med geografiske, etniske, sosioøkonomiske forhold og økende alder. Tilnærmet 47 % av befolkningen i USA er affisert av en mild, moderat eller alvorlig periodontitt. De moderate formene affiserer rundt 30 %, mens ca. 8 % affiseres av alvorlige former. Fra 65 år og eldre angis at omtrent 64 % av befolkningen har en moderat eller alvorlig periodontitt [6, 7]. For Norge finnes lite data, men man antar at det er omtrentlig samsvar med funn fra USA [8].

Kronisk periodontitt er en av de vanligste formene for periodontal sykdom. Som nevnt ovenfor vil alder være av betydning for forekomst i befolkningen i og med at ødeleggelsen av feste rundt tennene ikke gjendannes ved behandling. Med økende alder vil derfor nytt festetap legges til allerede ervervet festetap ettersom sykdommen progredierer [9]. Til tross for den kontinuerlige påvirkningen av bakteriefloraen overfor vertens vev, foregår likevel ikke progresjonen som en kontinuerlig nedbrytningsprosess. Ifølge ”burst” teorien skjer nedbrytningen i korte perioder i enkelte lokalisasjoner for å så gå over i lengre ”roligere” faser [10].

Periodontale sykdommer er for lengst akseptert som en gruppe multifaktorielle sykdommer, der samspillet mellom en rekke bakteriearter i den subgingivale biofilmen og immunforsvaret hos verten spiller en kompleks rolle. Sykdommens forløp påvirkes og av ulike risikofaktorer, som blant annet noen grupper av systemiske sykdommer, i tillegg til faktorer som stress, røyking og genetiske forhold [5, 9].

1.2 Periodontal mikrobiologi og patogenese

Det har blitt estimert at menneskekroppen består av over 10^{14} celler hvor rundt 10 % er menneskeceller. De resterende cellene består av mikroorganismer som bidrar direkte og/eller indirekte til den normale utviklingen av forsvarsmessige, ernæringsmessige og fysiologiske systemer hos verten. I likhet med andre steder i kroppen, er munnhulen et område som er kolonisert med en naturlig mikroflora som under normale forhold lever i likevekt med verten. Dessverre kan balansen mellom bakterier og vert bli forstyrret, og det vil kunne oppstå sykdom. Bakterier med potensiale til å skape sykdom under spesielle forutsetninger er kalt ”opportunistiske patogener”, og en rekke orale mikroorganismer har evnen til å oppføre seg slik. Karies og periodontale sykdommer er de vanligste orale sykdommene som kan oppstå på denne måten [11].

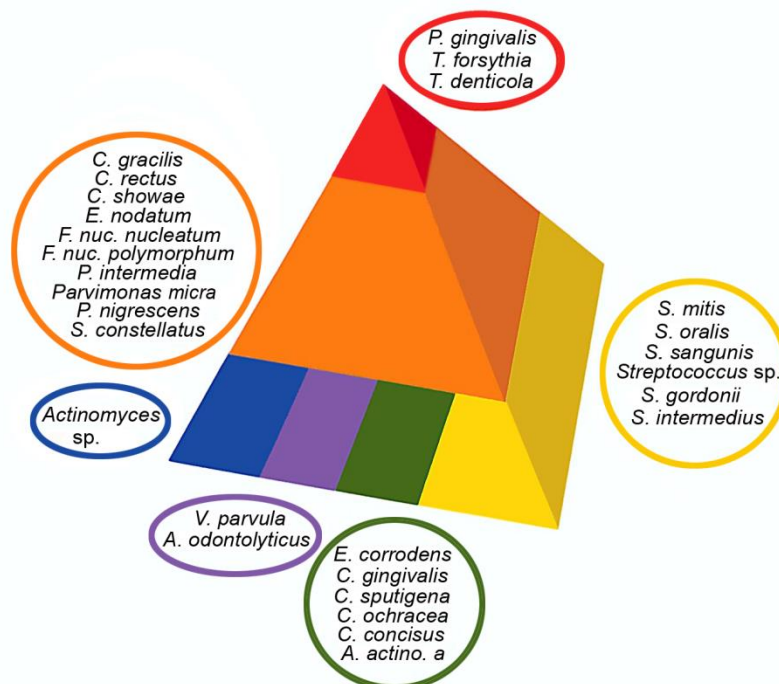
Mange studier har gjennom de siste 25 - 30 år vært utført for å karakterisere bakteriefloraen under tannkjøttet og identifisere spesielle arter av betydning for sykdomsutviklingen ved periodontale sykdommer. Identifikasjon av arter har ikke vært enkelt opp gjennom årene på grunn av tekniske vanskeligheter og manglende forståelse av en kompleks biologi [12].

I en konsensurapport i 1996 oppsummerte man bredt forskjellige typer av mikrobiologiske studier som frem til da gav indikasjoner på hvilke bakterier som var medvirkende til progresjon av periodontitt [9,13] (Tabell 1.1).

Tabell 1.1: Bakteriearter som pr. 1996 ble indikert til å være deltagende i utviklingen av periodontale sykdommer [13].

| Strong evidence | Moderate evidence | Initial evidence |
|--|--|----------------------------|
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | <i>Campylobacter rectus</i> | <i>Eikenella corrodens</i> |
| <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> | <i>Eubacterium nodatum</i> | <i>Enteric rods</i> |
| <i>Tannerella forsythia</i> | <i>Fusobacterium nucleatum</i> | <i>Selenomonas</i> |
| | <i>Prevotella intermedia/nigrescens</i> | <i>Pseudomonas species</i> |
| | <i>Parvimonas micra</i> | <i>Staphylococci</i> |
| | <i>Streptococcus intermedius/Treponema denticola</i> | <i>Yeast</i> |

Senere studier har bekreftet betydningen av flere av disse artene. I 1998 publiserte Socransky et al. funn som indikerer at bakteriene under tannkjøttet ved *kronisk periodontitt* er organisert i den dentale biofilm som et kompleks av bakterieslekter med relevans til progresjon. Det er særlig bakteriene i det røde og oransje kompleks, som indikeres å være assosiert til progresjon av periodontal sykdom (Figur 1.2). I det røde kompleks finner man de anaerobe artene *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* og *Treponema denticola*. Disse bakteriene har blitt påvist ved alvorlige former for periodontal sykdom, hvor det var dype lommer og blødning ved sondering (BOP). Det oransje kompleks, består av en rekke anaerobe arter, blant andre *Fusobacterium* spp., *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Campylobacter* spp., *Eubacterium nodatum* og *Streptococcus constellatus* som også er tilstede og som er relatert til dypere periodontale områder. Ved en økning i antall arter fra det oransje kompleks, viste det seg også mer sannsynlig å påvise arter fra det røde kompleks. I områder med friske forhold og grunnere lommedybde derimot, ble bakteriene i det røde kompleks ikke detektert [9]. De andre bakteriekompleksene som ble identifisert av Socransky-gruppen er arter som oppfattes å være forenlige med friske forhold [14].



Figur 1.2: Pyramide som viser de forskjellige bakteriekompleksene som er beskrevet ved kronisk periodontitt (tilpasset etter Socransky et al., 1998). Det røde og oransje komplekset er assosiert til og indikerer progresjon av kronisk periodontitt [14].

Socranskys funn forsterker funn i konsensusrapporten fra 1996 [9, 13, 14]. I tillegg til at en del arter i det røde og oransje komplekset har et arsenal av sykdomsfremkallende egenskaper (virulensfaktorer) som kan påvirke nærliggende vertsceller, vil de indirekte også påvirke vertens (pasientens) immunforsvar. Det intrikate samspillet mellom bakterier og immunforsvar er essensielt for en dypere forståelse av patogenesen ved periodontitt. Hvorvidt det er tilstedeværelsen av spesielle bakterier eller bakteriestammer i normalfloraen med spesielt sykdomsfremkallende evne, eller om det er immunforsvarets påvirkning som er direkte årsak til ødeleggelsen av tannfeste og støttevev, står helt sentralt i moderne forskning. Fra tidligere er det akseptert at det fortrinnsvis var immunforsvaret som forårsaket den irreversible ødeleggelsen av periodontiet og som førte til tanntap [15]. En ny hypotese, "the keystone-pathogen hypothesis," sier at periodontitt kan skyldes en ubalanse i den subgingivale bakteriefloraen og at et lite antall bakterier kan bidra til å dirigere inflammatorisk sykdom og vevsødeleggelse gjennom remodelering av den normale flora til å bli dysbiotisk [16, 17].

1.3 Periodontal mikroflora og kardiovaskulære sykdommer

I de senere år har forskningen satt nytt søkelys på gammel teori om infeksjon som mulig årsak eller medvirkende årsak til utvikling av hjertekarsykdommer. Ny kunnskap om bakterie-vert relasjoner og orale bakteriers egenskaper og virulensfaktorer har forsterket forskningen på dette feltet [18-21].

I en studie av Koren et al. 2010 [22] ble det foreslått at bakterier fra munnhulen kunne være med på utviklingen av arteriosklerose og andre kardiovaskulære sykdommer. De kom frem til at enkelte bakteriearter i det aterosklerotiske plaket samsvarte med bakterieprøver tatt fra munnhulen og i mage og tarmsystemet hos samme individ [22]. Det samme har blitt påvist i flere studier, blant andre i studiene til Haraszthy et al. 2000 og Kozarov et al. 2005 [19, 20]. Det dukker stadig opp nye og støttende bevis på at periodontitt er en risikofaktor for utviklingen av kardiovaskulære sykdommer, men disse er per i dag ikke gode nok til å trekke endelige konklusjoner [23].

1.4 *Porphyromonas gingivalis* og virulensfaktorer

P. gingivalis er en gram negativ anaerob stav som er assosiert med periodontitt [24-26]. Den er en asakkarolytisk bakterie som er avhengig av nitrogenholdige substrater for energi til overlevelse og vekst [27]. Ved hjelp av en rekke proteaser bryter bakterien ned proteiner i området for å få tilgang til næringstoffer [27, 28].

For overlevelse og vekst av bakteriene, må miljøet rundt bakterien samsvare med dens behov og egenskaper. *P. gingivalis* har flere virulensfaktorer som hjelper den med å beskytte seg selv og som endrer miljøet rundt seg til sin fordel. Blant flere har bakterien en kapsel, lipopolysakkarid (LPS) (i celleveggen til Gram negative bakterier), fimbriae (klebetråder), og ekstracellulære hydrolytiske enzymer som skilles ut via vesikler gjennom celleveggen [17, 25]. Bakteriens overlevelse går på bekostning av omkringliggende celler, og det forekommer vevsødeleggelse, forstyrrelse av vertens immunforsvar og benresorpsjon [5]. *P. gingivalis* kan blant annet øke produksjon av gingivalvæske ved å aktivere kallikrein/kinin-pathway og øke den vaskulære permeabiliteten, som dermed fører til hevelse og rødhet i gingiva. Den kan også aktivere prothrombin og trombin, ved å dele og aktivere initierende koagulasjonsfaktorene IX og X [29, 30]. Aktiveringen av protrombin øker produksjonen av gingivalvæske og fremmer akkumulering av leukocytter. I tillegg til aktivering av protein C, som er en blodplatehemmer, vil *P. gingivalis* også være med på å øke blødningstendensen [31].

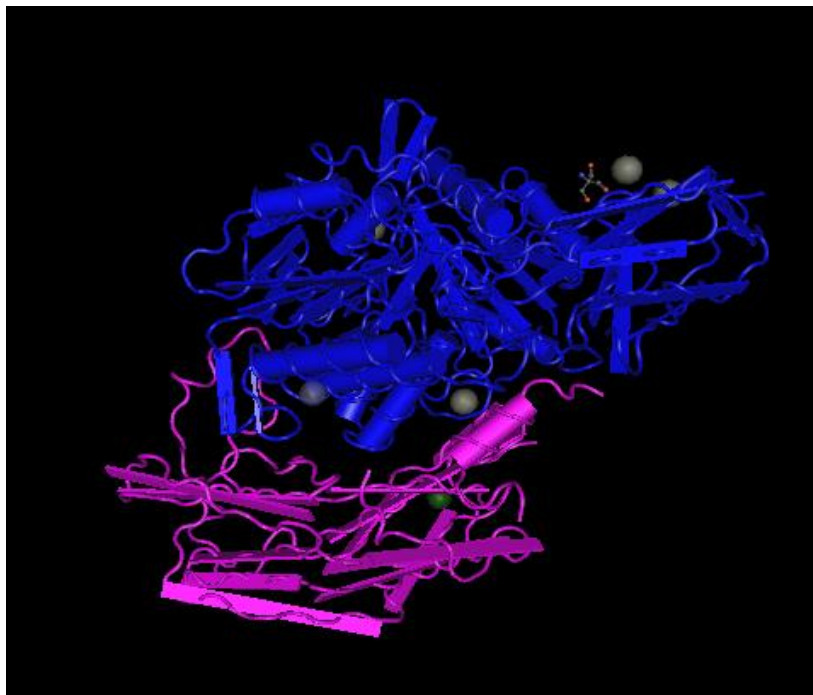
De ekstracellulære hydrolytiske enzymene, proteasene, spiller en stor rolle for bakteriartens sykdomsfremkallende evne. Dette er vist i en rekke studier [5, 25, 32]. Det er spesielt tre nært beslektede såkalte cysteine proteaser (rgpA, rgpB og Kgp) som har vært i forskernes søkelys i mange år. Disse enzymene er også kjent som "gingipainer". "Gingipainene" er henholdsvis Arg-spesifikke (rgpA og rgpB) og Lys-spesifikk gingipain (Kgp), og de bidrar til en stor del av den totale proteolytiske aktiviteten assosiert med *P. gingivalis* [5]. Det er antatt at det er Kgp som har størst betydning for patogenisiteten, etterfulgt av RgpB og deretter RgpA. Dette fant man ut ved å teste den sykdomsfremkallende evnen til tre mutanter av bakterien som hver manglet et av de tre gingipainene [5, 33]. Gingipainene er med på å bryte ned omkringliggende vev, men det er også blitt observert at de har evnen til å spalte immunoglobulin G, immunoglobulin M, cytokiner og cytokinreseptorer [25, 34]. I tillegg har enzymene også viktige "house-keeping"-roller.

P. gingivalis har evnen til å binde seg direkte til og invadere epiteliale celler og fibroblaster i gingiva, og de kan på den måten spre seg fra celle til celle i det periodontale vevet. I tillegg er det demonstrert tilsvarende invasjon i andre celletyper som i endotelceller og glatte muskelceller (i forbindelse med forskning omkring bakterieartens betydning for utvikling av hjertekarsykdom). *P. gingivalis* kan derfor unngå vertens immunforsvar og leve intracellulært i lengre perioder. For at bakterien skal kunne invadere en enkel vertscelle i et vev må den få feste i det aktuelle området [35]. Fimbrier er lange filamenter som sitter på bakterieoverflaten og er sentrale for adhesjon og videre kolonisasjon i det aktuelle vevet. Forøvrig er produksjon av både proteaser og fimbrier viktige for omregulering av immunfunksjonen hos verten. I tillegg til at proteasene bryter ned proteiner for å få næring til vekst, har man oppdaget at genene også deltar i regulering og spiller en viktig rolle for modning av de fimbriale proteinene. Proteasene vil dermed indirekte være med på å påvirke bakteriecellens evne til adhesjon til vertens celler [36].

Grunnet vanskeligheter med å påvise *P. gingivalis* ved friske gingivale forhold, ble bakteriearten tidligere antatt ikke å være en del av munnhulens normal flora. Med bedre teknikker derimot (PCR etc.), har dette bildet endret seg [37-39], og den kan også påvises andre steder i munnhulen, spesielt i kryptene på tungen [40]. På bakgrunn av dette oppfattes *P. gingivalis* som en *opportunistisk patogen* på lik linje med en lang rekke andre bakteriearter som er tilstede både ved friske og syke tilstander. Det er i denne sammenhengen viktig å huske at evnen til å fremkalle sykdom kan variere hos ulike stammer avhengig av genetikk og hvordan de gener som koder for den/de aktuelle virulensfaktorer uttrykkes [35].

1.5 RgpB

RgpB er et gen som koder for et av de Arg-X-spesifikke proteasene som ansees å være av størst betydning for patogenisiteten hos *P. gingivalis* (Figur 1.3). Det er tidligere utført studier av de Arg-X-spesifikke proteasene ved å sammenligne basesekvenser av samme gen hos forskjellige bakteriestammer (genotyping). Ved å gjøre dette kan man lokalisere konserverte områder og områder med variasjon. For *rgpA* fant man liten variasjon i DNA sekvensen hos en rekke ulike kliniske stammer. I det samme materialet fant man for *rgpB*-genet variasjoner i områdene 1527-1529, 1533-1535, 1542-1544 og 1677-1679. Å undersøke om mutasjonene medfører endringer i det korresponderende proteinets primærstruktur og i neste omgang tertiær eller tredimensjonal struktur, vil da være nærliggende. Sammenholdt med andre studier kan slike funn ytterligere indikere uttrykk for virulens fordi en endring i tertiærstruktur kan medføre endringer i det aktuelle enzyms funksjon. Detekterte variasjoner førte til fem forskjellige *rgpB*-genotyper [25], som omgjort til primær proteinstruktur fikk betegnelsene NYPN, NSSN, NSSK, NYPK og DYPN. Aminosyrevariasjonene kan indikere en mulig endring i enzymfunksjonene som for øvrig er bekreftet i en annen undersøkelse med laboratoriestammer av *P. gingivalis* [41].



Figur 1.3: 3D struktur av *rgpB* laget fra primærstruktur ved hjelp av programmet Cn3D, rosa struktur angir Gingipain Prodomene og blå er Peptidase domenet, [5]¹.

¹ Kilde: Se s. 45.

Det er tidligere vist at så mange som åtte forskjellige stammer av *P. gingivalis* kan være tilstede i en og samme periodontale lomme [42]. I studiet til Beikler et al. ble det ikke observert mer enn én genotype av *rgpB* hos hver pasient bortsett fra i ett kasus hvor man detekterte to [25]. Variantene NYPN, NSSN og NSSK ble observert omtrent like hyppig, og hyppigere enn NYPK og DYPN noe som kan indikere at de første kan være mer adaptert til de utfordringene miljøet i verten byr på. Forekomsten av de forskjellige variantene ble og relatert til kliniske periodontale parametere (lommedybder, blødning ved sondering) før og etter periodontal behandling med omtrent lik reduksjon i prevalens for NYPN, NSSN og NSSK etter behandling [25]. For de andre to var prevalensen før behandling betydelige lavere og etter behandling nærmest fraværende [25]. Funnene som ble gjort angis av forfatterne å kunne være et grunnlag for videre forskning i utviklingen av *rgpB*-inhibitorer i og med at *rgpB*-genotyper er detektert og naturlig tilstede i *P. gingivalis* populasjoner ved periodontitt. Hensikten med vårt studium ble derfor å undersøke 12 tilgjengelige kliniske stammer på DNA-nivå (Del I) og videre på proteinnivå (Del II).

2. MATERIALE OG METODE

2.1 Del I av prosjektet: Sekvensere 12 *rgpB*-gen fra kliniske stammer

2.1.1 Bakteriestammer og vekstforhold

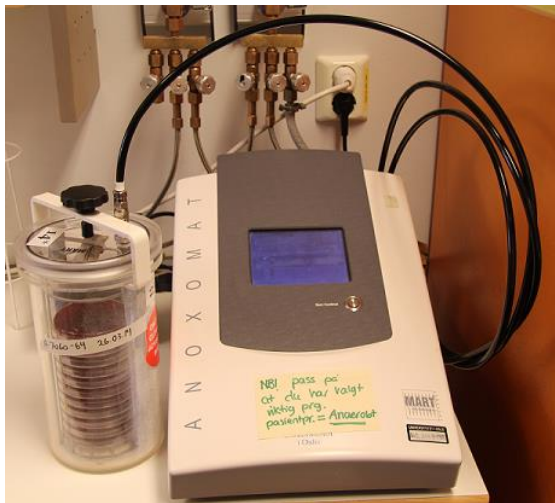
Ved Institutt for oral biologi oppbevares en samling *kliniske bakteriestammer* av arten *P. gingivalis*. Samlingen består av stammer som er karakterisert ved hjelp av ”multilocus sequence typing” (MLST) og med hensyn på *fimA*-genet [43]. Tolv bakteriestammer ble tatt ut for videre arbeid i dette studiet med hensyn på *rgpB*-genet. (Tabell 2.1).

Tabell 2.1 Oversikt over bakteriestammene som ble valgt ut for sekvensering.

| Bakterieart | Stamme | Vert |
|---------------------------------|-----------------|----------|
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 213PG1 | Menneske |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | Be-C | Menneske |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | W12 | Menneske |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | OMZ 479 | Menneske |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | OMZ 482 | Menneske |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 102 | Menneske |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 102822 | Menneske |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | OMG 56268 | Menneske |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 248 | Menneske |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 6JKG5 | Menneske |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 16V2K-10 | Ape |
| <i>Porphyromonas gulae</i> | 31gml_hund_p.gu | Hund |

De opptinte bakteriestammene ble sådd ut på skåler med agarløsning 1 (Se avsnitt 6.1). Agarskålene med bakteriene ble deretter plassert i kolber og tilkoblet maskinen Anoxomat (Figur 2.1) for å oppnå anaerobe forhold (se avsnitt 6.2). De anaerobe kolbene med bakteriene ble plassert i et varmerom som holdt 37 °C i 7-14 dager for at bakteriekoloniene skulle kunne vokse opp. Etter inkubasjonstiden, ble agarskålene med bakteriene tatt ut og inspisert under lysmikroskop for å påvise eventuelle kontaminasjoner. I områder uten kontaminasjoner ble

bakteriekolonier tatt ut, overført til nye agarskåler og inkubert på samme måte som ved første utsåing. Dette ble gjort for å få helt rene kolonier av de ulike stammene.



Figur 2.1: Bilde av maskinen Anoxomat.

2.1.2 DNA-ekstraksjon

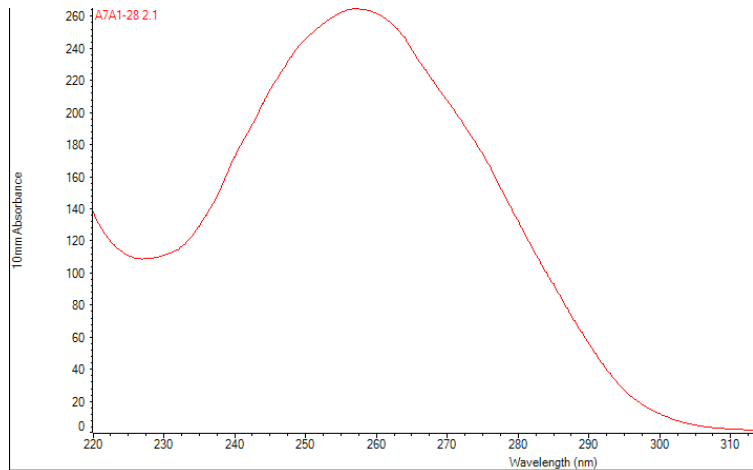
1 øse fra hver av de utvalgte rene bakteriestammene ble løst opp i hvert sitt rør med 200 μ l TE-buffer (se avsnitt 6.3) for å stabilisere bakteriene. 100 μ l av dette ble overført til en DNA-ekstraksjonsmaskin (Magnatrix-1200, Magnetic Biosolutions Stockholm, Sweden) (Figur 2.2), og bufferløsninger fra MagAttract DNA Mini M48Kit (Qiagen, CA) ble tilsatt etter produsentens protokoller. DNA-prøvene som ble ekstrahert, ble analysert ved hjelp av et spektrofotometer (NanoDrop 2000c spectrophotometer) (Figur 2.3). Maskinen drar nytte av at forskjellige molekyler absorberer forskjellige lysbølger. Nukleotider (RNA, ssDNA og dsDNA) absorberer bølgelengder på 260nm, proteinene absorberer 280nm, mens fenoler absorberer 230nm. Maskinen registrerer hvor mye lys med lysbølgene 260nm og 280nm som blir absorbert og regner deretter ut forholdet mellom disse. Ved gode DNA-prøver ligger forholdstallet mellom 1,8-2,2 (Figur 2.4). Avvik fra dette kan skyldes kontaminasjon av for mye proteiner, fenoler eller andre stoffer.



Figur 2.2: DNA-ekstraksjonsmaskin



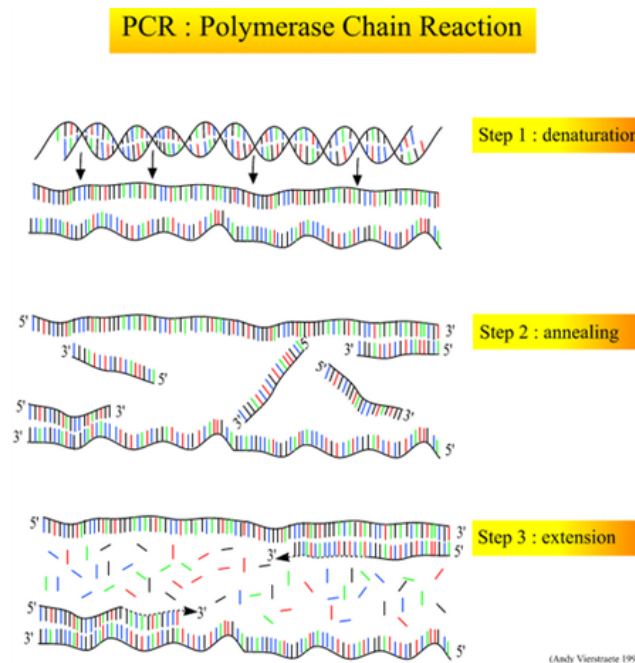
Figur 2.3: Nanodrop maskin



Figur 2.4: Nanodrop graf av en DNA analyse.

2.1.3 Polymerase chain reaction (PCR)

PCR er en metode som benyttes for å isolere og amplifisere spesifikke deler av DNA genomet. Metoden har tre faser som repeteres i sykler (Figur 2.5). Hver av fasene har gitte temperaturer som avgjør hva som skjer og hvilke molekyler i løsningen som er aktive. For å få til sykliske temperaturendringer, blir prøvene plassert i en PCR maskin. Maskinen er en rask regulerbar varmeblokk med integrert programvare som regulerer tiden for hvert temperaturnivå og for antall sykler.



Figur 2.5: Illustrasjon av de ulike stegene under PCR-reaksjonen².

²Kilde: Se s. 45.

I den første fasen, *denatureringsfasen*, blir DNA templatet varmet opp til 96 °C slik at hydrogenbindingene mellom DNA-dobbel-heliksene brytes opp. I den andre fasen, *annealingsfasen*, kjøles PCR-løsningen ned, men bare til en temperatur hvor primerne kan binde seg til de single DNA-trådene uten at det blir uspesifikk binding. I den siste fasen, *elongeringsfasen*, økes temperaturen til 72 °C, som er enzymaktivitets temperatur for DNA-polymerasen. På denne måten blir det dannet nye trådfragmenter. Prosessen repeterer deretter de ulike fasene. Man vil få en fordobling av det ønskede DNA området for hver syklus, og dermed en eksponentiell økning ved gjentatte sykler. Ved PCR er det behov for to primere, en forward primer som binder seg til *sense* DNA tråden og en reverse primer som binder seg til den reverse komplementære DNA tråden som også kalles *antisense*.

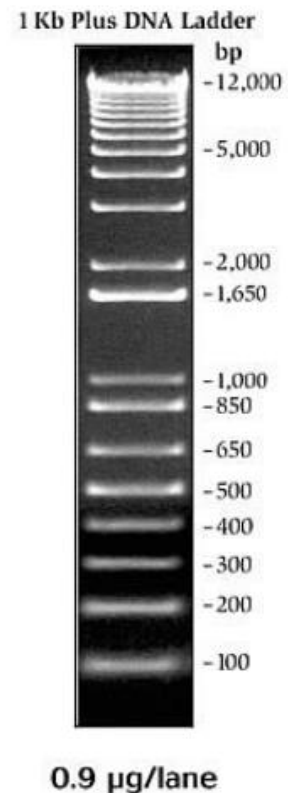
For å få med hele *rgpB*-genet, ble en sense primer som fester seg til et område oppstrøms for genet (forward primer) og en antisense primer som fester seg til nedstrøms for genet (reverse komplementær primer) valgt (Tabell 2.2). Ved å sammenligne *rgpB*-gensekvenser fra to referansestammer hvor hele bakteriegenomet er totalskvensert, kunne primere bli designet ut ifra konserverte sekvensområder.

Tabell 2.2: *rgpB*-gen primere for PCR.

| Primertype | Posisjon | Baser fra 5' til 3' | Smeltepunkt |
|-----------------------|-------------|---------------------------|-------------|
| <i>RgpB</i> forward 1 | -82 → -59 | AGCAGCTCTTCAATGAGATTTTCGG | 63.8 °C |
| <i>RgpB</i> reverse 1 | 2310 ← 2331 | CCAAGTGTCAACTTTTTTCAGTA | 63.1 °C |

Valg av primere ble kvalitetssikret med tanke på primerdimere, selvhybridisering (oligocalc) og smeltetemperatur. Ved hjelp av internettsiden <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, ble primerne satt opp med resten av genomet til bakterien for å kontrollere at de ikke festet seg til andre steder enn det ønskede området. 2 µl DNA og 18.5µl PCR-reaksjonsmiks (se avsnitt 6.4) ble ført over i MicroAmp tuber (Applied Biosystems) og plassert i en PCR-maskin (GeneAMP PCR system 2007). PCR-maskinen ble stilt inn på 30 sykler med 96 °C i 0:30 minutter for denaturering, 55 °C i 0:30 minutter for annealing og 72 °C i 1:30 minutter for elongering. For at primerne skal ha mulighet til å feste seg til ssDNA, er det viktig at annealingstemperaturen ikke er høyere enn primernes smeltepunkt, men er satt 3-5 grader under. Ulike primere vil ha ulike smeltepunkter, og det er derfor viktig å ta hensyn til dette ved bestemmelse av temperatur.

Elektroforese er en teknikk hvor DNA-fragmenter med forskjellige størrelser skilles fra hverandre ved hjelp av elektrisitet. PCR-produktene blir tilsatt hver sin brønn i en agarosegel (se avsnitt 6.5) som det ledes strøm gjennom. Elektronene vil gå fra katoden (negativ pol) mot anoden (positiv pol). Det er størrelsen på DNA-fragmentet som avgjør hvor langt de vil vandre ved en viss tid. De små DNA-fragmentene vil kunne vandre lengre enn de større molekylene, og man vil på den måten kunne skille de ulike fragmentene fra hverandre. For å angi størrelsen på de ukjente fragmentene blir de sammenlignet med vandringsmønsteret til kjente fragmenter i en standard kontrollprøve (Figur 2.6).



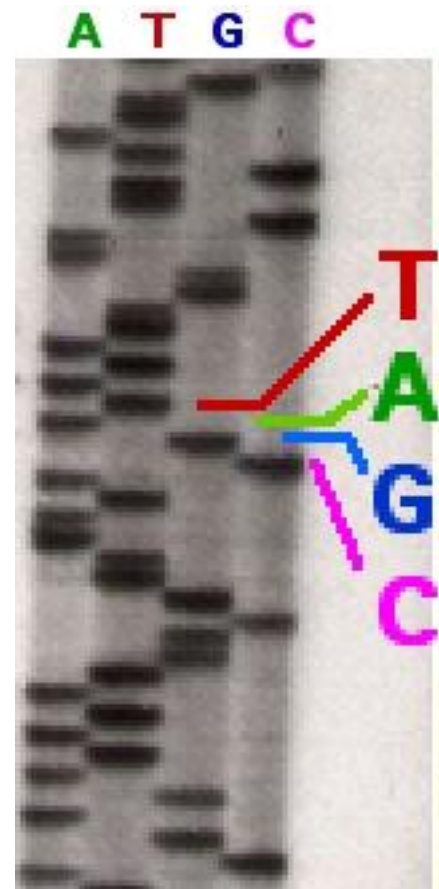
Figur 2.6: Invitrogen 1 Kb + stige med fragmenter av kjent lengde³.

³ Kilde: Se s. 45.

2.1.4 Sekvensering av *rgpB*-genet

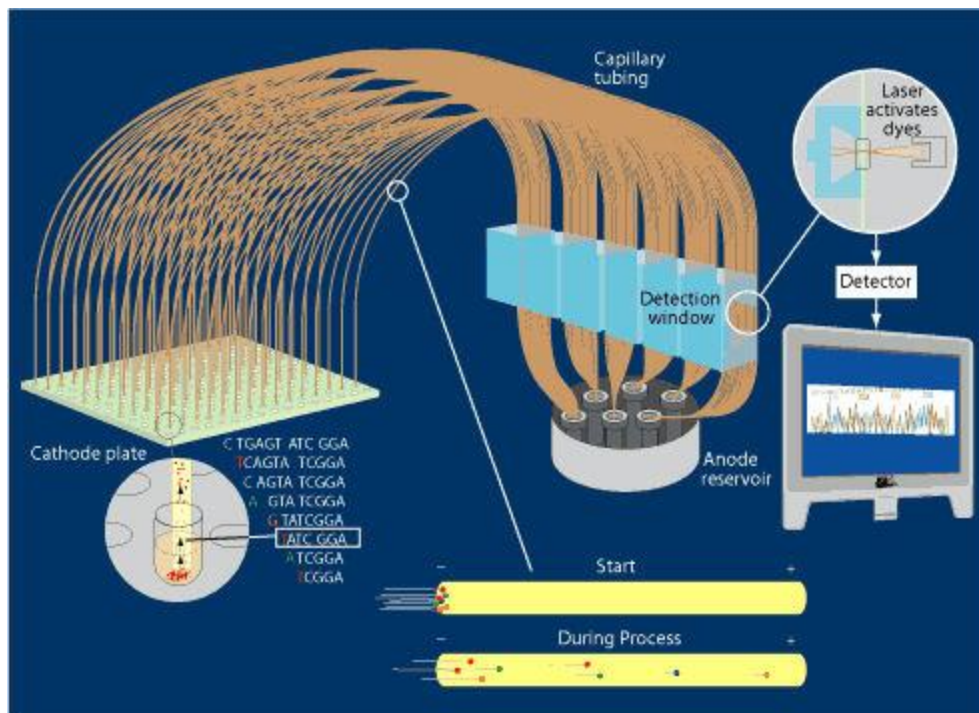
Sangers sekvenseringsteknikk er en velkjent sekvenseringsteknikk som var den vanligste metoden for å sekvensere DNA på, fram til for ca. 10 år siden. Metoden er fortsatt mye brukt og passer bra for sekvensering i små prosjekter. Før i tiden baserte Sangers sekvenseringsteknikk seg på radioaktive baser for å lese av baserekkefølgene, mens det nå brukes fluoriserende baser. Etter å ha amplifisert et område på DNA tråden (PCR produkt), ble det tilsatt DNA polymerase, deoxynukleotider (dNTP), samt dideoxynukleotider (ddNTP) som enten var radioaktivt eller fluoriserende. De sistnevnte basene manglet hydroksylgruppe på 3' plassen og ville dermed ikke ha mulighet til å binde nye baser. Ved bare å tilsette en type ddNTP i fire forskjellige rør for de fire forskjellige basene, ville man etter å ha kjørt sekvenseringsPCR kunne vite at alle DNA-

fragmentene i det samme røret ender på den samme basen. Den første Sanger sekvenseringsteknikken på 1980-tallet (frem til ca. 2005) ble utført på manuelle sekvenseringsgeler. Ved å kjøre de fire prøvene ved siden av hverandre på en sekvenseringsgel (polyakrylamidgel), kunne man lese av baserekkefølgen (Figur 2.7). Teknikken ble videreutviklet og fra ca. 2005 og fremover har kapillærsekvensering blitt benyttet. Ved å tilknytte hver type base et bestemt fluoriserende signal, kan man nå kjøre alle ddNTP i samme rør istedenfor fire forskjellige. Elektroforeseprosessen ble også forbedret ved å kjøre prøvene i små lange rør med en detektor i enden istedenfor på store geler som måtte leses av manuelt. Størrelsen på fragmentene er avgjørende for hvor raskt de når detektoren, og kan på denne måten lese av baserekkefølgen (Figur 2.8). Da kapillærsekvensering først ble tatt i bruk, ble det omtalt som *high-throughput* sekvensering, men nå har det kommet enda raskere metoder som har tatt over navnet. Disse metodene er chip basert med plass til mange prøver som analyseres samtidig.



Figur 2.7: Elektroforesegel med radioaktive baser⁴.

⁴ Kilde: Se s. 45.



Figur 2.8: Illustrasjon av kapillærsekvensering⁵.

I dette forsøket ble sekvenseringsmaskinen 3730 og kapillærsekvenseringsmiksen BigDye (BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit fra Life Technologies) brukt. BigDye miksen består av DNA polymerase, dNTP og fluoriserende ddNTP.

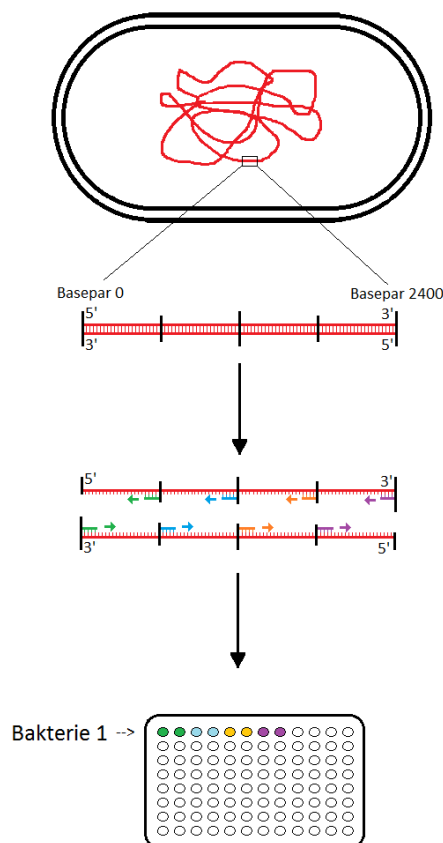
Med Sangers sekvenseringsteknikk er det mulig å sekvensere ca. 700 basepar av gangen med en primer. Fordi *rgpB*-genet er 2200 baser langt, måtte genet sekvenseres i flere fragmenter som overlappet hverandre. Det ble derfor designet fire primerpar (Tabell 2.3) for å sekvensere hele *rgpB*-genet både på sense og antisense. Ved å sekvensere begge får man to avlesninger for hver base og dermed en *kvalitetssikring* av DNA sekvensene.

PCR-produkttemplatet av *rgpB*-genet ble sekvensert med en primer i BigDye sekvenseringsmiksen i hvert sitt PCR rør ifølge spesifikasjoner i avsnitt 6.6 (Figur 2.9) Prøvene ble deretter rensed ved å bruke sephadexgel og Nalge Nunc 2555980 Silent Screen Plate 96 Well *NIB*, og løst i 10 µl deionisert formamid, før de ble satt inn i sekvenseringsmaskinen.

⁵ Kilde: Se s. 45.

Tabell 2.3: *rgpB*-gen, primere til sekvensering.

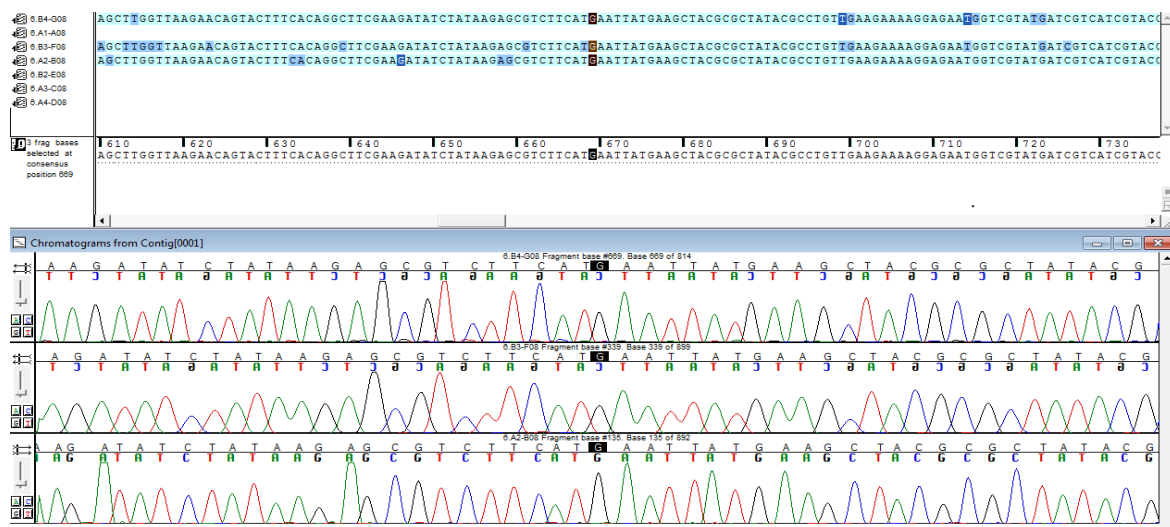
| Primertype | Posisjon | Baser fra 5' til 3' | Smeltepunkt (v/50 mM saltkons) |
|-----------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------------|
| <i>RgpB</i> forward 1 | -82 → -59 | AGCAGCTCTTCAATGAGATTTCGG | 63.8 °C |
| <i>RgpB</i> forward 2 | 505 → 523 | ACTTTGCTCCGCTCCAGTA | 57.0 °C |
| <i>RgpB</i> forward 3 | 1119 → 1138 | GCTCTTTGTATTGCTTCGGC | 58.5 °C |
| <i>RgpB</i> forward 4 | 1764 → 1785 | GCAAATATCTCTGCCTCTGCAC | 59.8 °C |
| <i>RgpB</i> reverse 4 | 823 ← 842 | AGCTGTAACGGGAGAAGCAA | 58.5 °C |
| <i>RgpB</i> reverse 3 | 1235 ← 1258 | GTTACTCCCGGATCATAACATTTG | 59.5 °C |
| <i>RgpB</i> reverse 2 | 1907 ← 1926 | TCAAGTTCGTTTCATCAGCG | 59.3 °C |
| <i>RgpB</i> reverse 1 | 2310 ← 2331 | GCTGTGCCGAATGGATTCT | 63.1 °C |



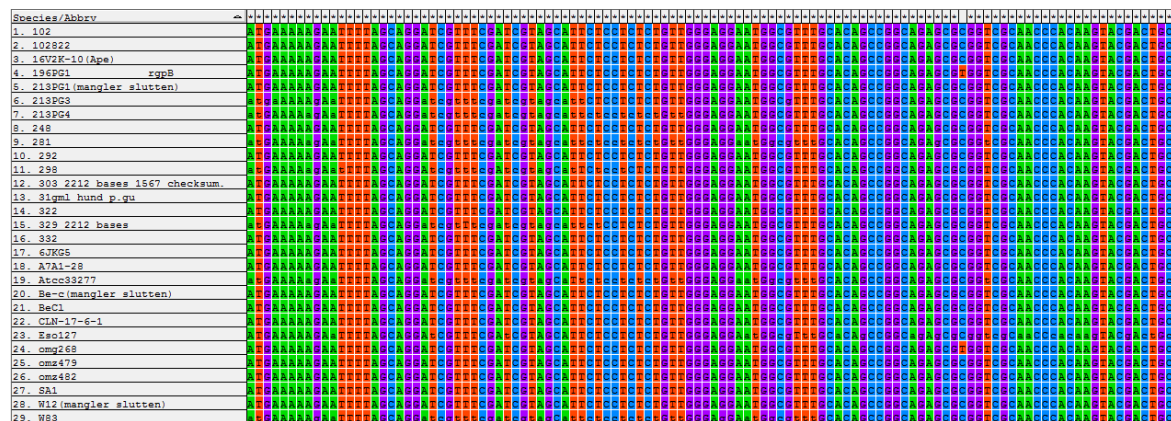
Figur 2.9: Prinsippet for bruk av primere for å sekvensere store fragmenter er forenklet i figuren over. Hvert PCR-produkt med BigDye-miks er tilsatt en type primer.

2.1.5 Sequencer 4.9 og Molecular Evolutionary Genetics Analysis 5 (MEGA 5)

Sekvenseringsmaskinen lagret sekvenseringsresultatene som kromatogramfiler og tekstfiler med sekvensene. Filene ble videre bearbejdet med redigeringsprogrammet Sequencer 4.9. Dette programmet viste kromatogrammene relatert til basene som sekvenseringsmaskinen hadde angitt (Figur 2.10). Sekvenseringsmaskinen la automatisk inn basene den mente var riktig på de forskjellige plassene, men en manuell gjennomgang var nødvendig for å rette på de stedene sekvenseringsmaskinen ikke klarte å ta en god avgjørelse. Etter å ha korrekturet sekvensene i Sequencer 4.9, ble alle sekvensene lagt inn i MEGA 5. MEGA 5 er et program hvor man kan legge inn DNA sekvenser som videre kan translateres over til aminosyresekvenser (protein primærstruktur). Ved hjelp av dette programmet kunne man sammenligne aminosyrevariasjonene mellom stammene og dermed kartlegge variasjoner (Figur 2.11).



Figur 2.10: Bildet viser korrekturlesning av *rgpB* sekvenser opp mot kromatogrammene i redigeringsprogrammet Sequencer 4.9.



Figur 2.11: Bildet viser alignment av *rgpB* sekvenser i MEGA 5 programmet.

2.2 Del II av prosjektet: kloner 2 ulike *rgpB*-gener inn i en ekspresjonsvektor

2.2.1 Kloningsvektorer

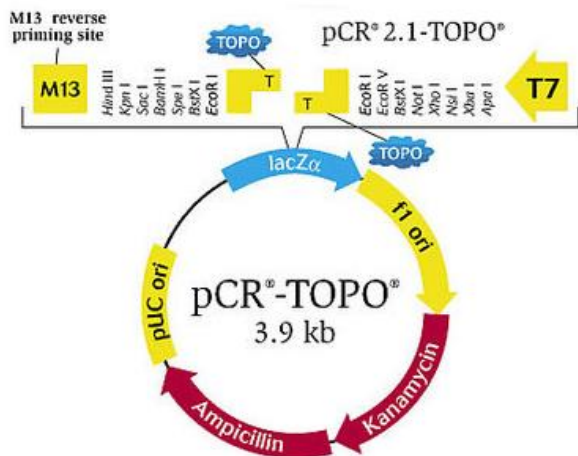
En vektor er et minikromosom. Naturlig forekommende kalles det plasmid og finnes oftest i cytoplasma hos prokaryote organismer. Plasmidet inneholder ekstragener for organismen som koder for proteiner med potensiell innvirkning på virulens, resistens og overlevelse. De replikeres naturlig i bakterier og videreføres ved celledeling eller konjugasjon. Plasmid som benyttes i bioteknologiske metoder kalles en kloningsvektor fordi de er modifisert fra opprinnelige plasmid-typer. Kloningsvektorer inneholder et multikloningssete og resistensgener for å selektere rekombinante kloner fra en kloningsprosess.

Ved å integrere et ønsket gen/genfragment i et plasmid, som deretter settes inn i en bakterie, vil bakterien produsere store mengder av det aktuelle genet eller genproduktet. For å få til dette er det viktig å velge riktig bakterie til det plasmidet man har valgt, slik at bakterien har evne til å ta opp plasmidet.

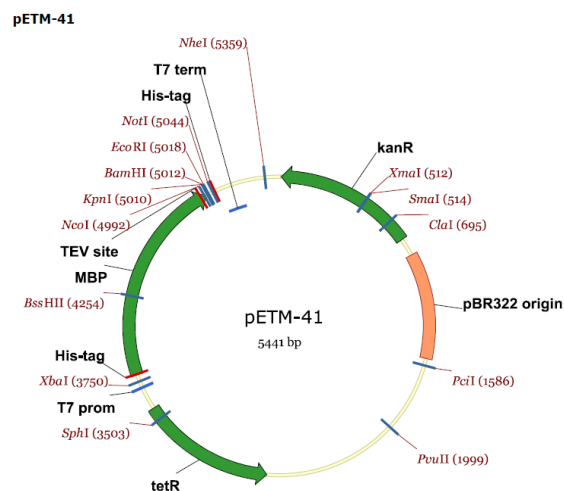
Det er to hovedgrupper av kloningsvektorer. Den ene gruppen er *replikasjonsvektorer* som har høy replikasjonsrate i bakterien. TOPO-vektoren (TOPO® TA Cloning® Kits for Subcloning) (Figur 2.12) fra Life technologies er en typisk replikasjonsvektor. TOPO-kloning er enkel og rask å bruke, som vi benyttet for å oppformere *rgpB*-genfragmentet. Den andre gruppen av kloningsvektorer er *ekspresjonsvektorer*, som kan uttrykke insert-genfragmentet som et proteinuttrykk i spesielle *E. coli* stammer. Vektoren pETM-41 (Figur 2.13) er et eksempel på dette, og denne vektoren ble brukt som ekspresjonsvektor i forskningen vår.

2.2.2 Ligering av *rgpB*-genfragment inn i kloningsvektor

Ligering av *rgpB*-genet inn i replikasjonsvektoren TOPO og ekspresjonsvektoren pETM-41 er forskjellige. TOPO-vektorer er bearbeidet slik at man kan tilsette et genfragment i form av et PCR produkt og raskt få det ligert inn i vektoren. PCR produkt der vi har benyttet DNA polymerase (Taq-polymerase), har et templat-uavhengig transferaseaktivitet som tilfører single deoxyadenosin (A) til 3'-ende av PCR produktet. TOPO-vektoren inneholder en topoisomerase som aktivt ligerer poly-A vedhenget inn i vektoren ved å feste det til poly-T lenken i den åpne vektoren. PCR produktet er ligert inn i vektoren i løpet av 5-20 min. Dermed er vektoren med PCR-insert klar til å settes inn i en kompetent *E. coli* stamme.



Figur 2.12: Illustrasjon av replikasjonsvektoren TOPO⁶.



Figur 2.13 Illustrasjon av ekspresjonsvektoren pETM-41⁷.

Ligering av *rgpB* PCR produkt inn i ekspresjonsvektoren pETM-41 er mer komplisert enn for TOPO-vektoren. Grunnen til dette er at genet som liggeres inn senere skal uttrykkes. Det forutsettes derfor at leserammen er riktig, og at geninsertet liggeres inn riktig i vektoren. Dette gjøres best ved å ligere inn insertet ved restriksjonsenzym ligering. Det betyr at insert og vektor kuttes med samme restriksjonsenzym og liggeres sammen. Leseretningen vil bli riktig ved å benytte 2 restriksjonsenzym som kutter på hver sin side av genfragmentet. Det er likevel en mulighet for at leserammen ikke blir helt korrekt da insertet kan liggeres med et nukleotidvedheng som tilsetter en ekstra nukleotid. I forskingen vår ble restriksjonsenzymene BamHI og NcoI brukt. For å få ønsket genfragment med restriksjonssteder tilsvarende BamHI og NcoI, ble det bestilt inn primere med slike områder, som i tillegg hadde områder som festet seg til *rgpB*-genet (Tabell 2.4). Det ble kjørt PCR med 2 µl DNA blandet med PCR-reaksjonsmix 2 (se avsnitt 6.7) i samsvar med spesifikasjoner i avsnitt 6.8.

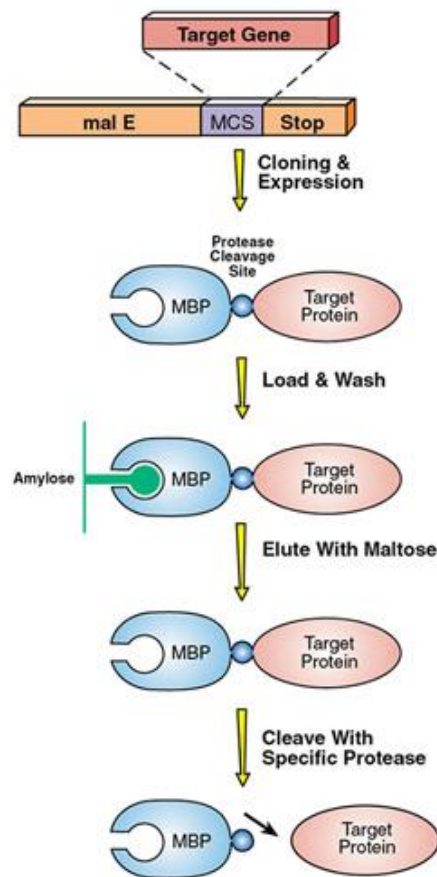
Tabell 2.4: Tabellen viser primere med ligeringssteder. De basene som er skrevet med svart skrift liggerer til *rgpB*-genet, mens basene med grønn skrift, liggerer til plasmidet pETM-41. Posisjonen er derfor definert ut ifra de svarte basene.

| Primertype | Posisjon | Baser fra 5' til 3' | Smeltepunkt |
|-------------------------------------|-------------|---|-------------|
| <i>RgpB</i> forward ligeringsprimer | 903 → 882 | AAGGGAAGGTAATGATTTGA CCTATG | 66.4 °C |
| <i>RgpB</i> reverse ligeringsprimer | 2188 ← 2212 | AACCATGGAAATTACTTCACTATA ACCTTTTCTG | 64.8 °C |

⁶ Kilde: Se s. 45.

⁷ Kilde: Se s. 45.

Kloningsvektoren pETM-41 inneholder et transkripsjonssete (T7) som gjør det mulig å uttrykke insert-genfragmentet. pETM-41 inneholder også en tag, det vil si et gen som gjør det mulig å fiske ut et rekombinant protein som et fusionsprotein (sammen med tag). En tag er et proteinfragment med maltosebindende protein (MBP) som har affinitet til maltose. Ved å inkubere bakterielysate som har produsert fusionsprotein med amylose-sephadex, vil fusionsproteinet binde seg til amylosen som igjen er koblet til sephadexen. Sephadex er et kolonnemateriale som vi kan kjøre buffer igjennom for å vaske ut bakterieproteiner/membranfragmenter samtidig som fusionsproteinet holder seg fast i amylosen. På den måten kan man eluere ut fusionsproteinet spesifikt ved hjelp av maltose. Maltose konkurrerer med amylosen om å binde fusionsproteinet. Deretter kan insert-proteinfragmentet adskilles fra MBP ved hjelp av en protease siden linken mellom MBP og insert-proteinet inneholder sete for en spesifikk protease (TEV) (Figur 2.14).



Figur 2.14: Illustrasjon av prinsippet for hvordan man fra et genfragment, får tak i det uttrykte proteinet ved hjelp av MBP⁸.

⁸ Kilde: Se s. 45.

Begge vektorene inneholder et seleksjonsgen som gjør det mulig for bakterier med denne vektoren å vokse i medium med Kanamycin (antibiotika). Ved å tilsette Kanamycin til mediet, vil man kun få vekst av bakterier som har disse vektorene i seg.

2.2.3 Transformasjon

Fra leverandøren Life technologies er det mulig å kjøpe en bakteriestamme av *E. coli*, som er kompetent, det vil si som har evne til å ta opp et plasmid/vektor. Man kan også lage slike kompetente bakterieceller selv ved å løsne den ytre celleveggen til en gitt *E. coli* stamme ved hjelp av CaCl_2 . De kompetente bakteriene som blir kjøpt har ofte høyere effektivitet, og foretrekkes derfor fremfor å lage dem selv. TOP10 *E. coli* bakterier ble brukt som vert for TOPO kloningsvektor. Bakteriene ble tint opp fra $-76\text{ }^\circ\text{C}$ på is for å forhindre skade ved høy temperatur. 4 μl TOPO kloningsvektor med *rgpB*-gen insert med restriksjonssteder ble tilsatt optinte celler. Dette lå på is i 60 minutter før det ble satt inn i maskinen Eppendorf Thermomixer comfort som holdt $42\text{ }^\circ\text{C}$ i 20 sekunder. Oppvarmingen øker effektiviteten av transformasjonen. 230 μl SOC ble tilsatt for å danne den ytre membranen og dermed stabilisere cellene. De kompetente cellene som var blandet med TOPO kloningsvektor og SOC ble deretter inkubert på $37\text{ }^\circ\text{C}$ i 60 minutter. 150 μl av løsningen med SOC og kompetente celler transformert med TOPO kloningsvektor med *rgpB*-insert, ble overført til skåler med agarløsning 2 (Se avsnitt 6.9). Skålene ble inkubert i $37\text{ }^\circ\text{C}$ over natten for å fremme vekst av bakteriekolonier.

3. RESULTATER

3.1 Resultater fra del I av prosjektet

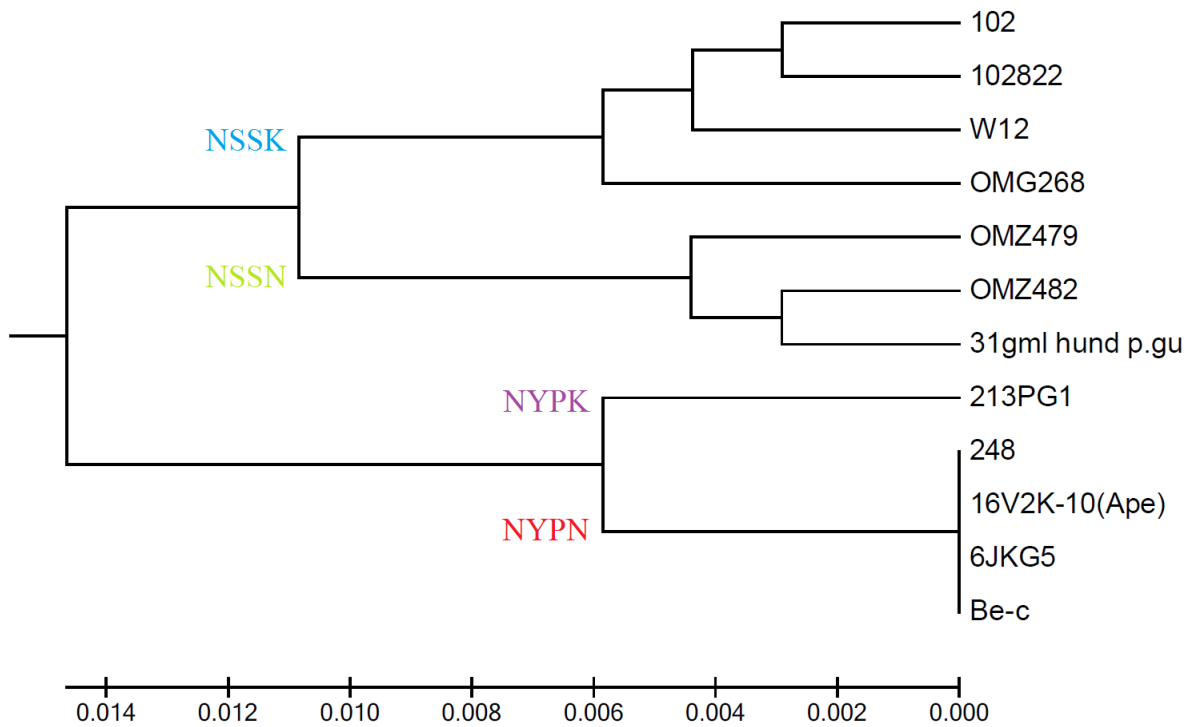
Det var tidligere sekvensert 17 *rgpB*-gen fra ulike *P. gingivalis* stammer. For videre kartlegging av variasjonene ble *rgpB*-genet sekvensert hos 12 nye bakterestammer. Sekvenseringsresultatene til disse stammene ble analysert og satt opp i Tabell 3.1. I tabellen er også *rgpB* satt opp mot *fimA* som tidligere har blitt sekvensert [44]. *FimA* er et annet virulensgen hos *P. gingivalis* som koder for fimbrier, og som dermed er med på å fasilitere adhesjon til vertens celler [44]. Bakteriestammene som ble sekvensert falt inn under fire av de fem *rgpB* variantene som tidligere var registrert. DYPN ble ikke detektert hos de bakteriestammene vi undersøkte. Se avsnitt 1.5 for mer informasjon om genotypene. Forekomsten av de ulike genotypene NYPN, NSSN og NSSK ble omtrent observert like hyppig, men hyppigere enn NYPK. Dette samsvarer med funn fra Beikler og medarbeidere [25].

Tabell 3.1: Tabellen viser en oversikt over de ulike stammene karakterisert ved *RgpB* [25]: **NYPN**, **NSSN**, **NSSK**, **DYPN**, **NYPK**.

| <i>P. gingivalis</i> | ST* | <i>fimA</i> ** | RgpB aminosyrer | Type infeksjon | Isoleringssted | Geografisk område |
|----------------------|-----|----------------|-----------------|----------------------------|----------------|---------------------|
| 213PG1 | 22 | II+III | NYPK | Periodontitis | Subgingival | Indonesia |
| Be-c | 25 | IV | NYPN | Root canal infection | Root canal | Umeå, Sweden |
| W12 | 25 | IV | NSSK | Periodontitis | Subgingival | Birmingham, AL |
| 16V2K-10 (ape) | 33 | - | NYPN | Experimental periodontitis | Subgingival | Buffalo, NY |
| OMZ479 | 40 | IV | NSSN | Periodontitis | Subgingival | Zurich, Switzerland |
| OMZ482 | 41 | Ib | NSSN | Periodontitis | Subgingival | Zurich, Switzerland |
| 102 | 42 | IV | NSSK | Root canal infection | Root canal | Umeå, Sweden |
| 102822 | 43 | I+Ib+II | NSSK | Periodontitis | Subgingival | Unknown |
| OMG268 | 46 | III | NSSK | Periodontitis | Subgingival | Gothenburg, Sweden |
| 31gml_hund_p.gu | - | - | NSSN | Unknown | - | - |
| 6JG5 | - | - | NYPN | Periodontitis | Subgingival | Unknown |
| 248 | - | - | NYPN | Periodontitis | Subgingival | Unknown |

* ST = Sequence type. ST er basert på multilocus sequence typing (MLST) som er en teknikk for å karakterisere ulike bakteriearter på stammenivå. Dette utføres ved å sammenligne bestemte DNA-områder (housekeeping gene) hos bakterien. Hvert housekeeping gene hos en art blir tildelt en allele type. Vanligvis blir sju housekeeping genes kontrollert, som sammen utgjør en alleleprofil. Hver alleleprofil blir oppført som en ST (<http://pubmlst.org/general.shtml>). Stamme isolert fra ape (*Macaca fascicularis*) benyttet som forsøksdyr ved eksperimentell periodontitt. ** *fimA* angir resultat av genotyping med hensyn på *fimA* – genet.

Resultatene fra sekvenseringen ble lagt inn i MEGA 5 hvor det ble laget et UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) fylogenetisk tre. Ut ifra et slikt tre kan man se slektskapet mellom de ulike stammene med hensyn på *rgpB*-genotypene som er satt inn i figuren (Figur 3.1).



Figur 3.1: UPGMA-tre av sekvenserte *P. gingivalis* stammer med hensyn på *rgpB*.

3.2 Resultater fra del II av prosjektet

Hensikten med prosjekt II var å studere de funksjonelle sidene ved *rgpB*. Vi ønsket spesielt å undersøke genområdet med aminosyrevariasjonene NYP/NSSN/NSSK/NYPK/DYPN siden Beikler et al. [25] og Eichinger et al. [45] hadde vist hvor viktig dette området var for funksjonen av *rgpB*. Derfor ble *rgpB* genområdet nukleotid 900-2200, som inkluderte det katalytiske domene og C-terminal ende, benyttet til kloningsforsøk. To *P. gingivalis* stammer ble inkludert i del II, en referansestamme (ATCC 33277) med *rgpB* genotype DYPN og en klinisk stamme (A7A1-28) med *rgpB* genotype NYPN.

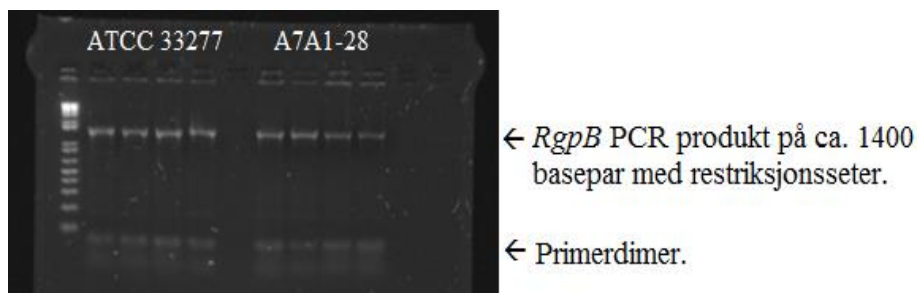
Vi kjørte PCR med primerne *RgpB* forward ligeringsprimer og *RgpB* reverse ligeringsprimer (tabell 2.4). Forward primer hadde restriksjonssete for BamHI i 5'-terminal ende og revers primer hadde restriksjonssete for NcoI i sin 5'-ende.

Vi klonet først *rgpB* PCR produktet fra hver av de to stammene inn i en replikasjonsvektor, TOPO-vektor. Vi plukket ut fire kolonier fra hver stamme, ATCC 33277 og A7A1-28, og sjekket ved hjelp av ny PCR med ligerings-*rgpB* primere at vi hadde fått insert av *rgpB* i klonene. Figur 3.2 viser et gelbilde med PCR produkt etter PCR på kloner av *E. coli* med TOPO-vektor ligert med *rgpB*-genfragment. Etter positiv kontroll av ligeringen og transformasjonen med TOPO vektor, ble det forsøkt å ligere *rgpB*-genet inn i pETM-41.

Klonene med TOPO-vektor med *rgpB*-insert ble dyrket i 10 ml LB medium (37 °C) over natt. Vi dyrket også frem *E. coli* som inneholdt pETM-41 vektoren. Etter inkubering ble bakteriene lysert. Deretter ble TOPO-vektor med *rgpB*-insert (2 med ATCC 33277 type *rgpB* og 2 med A7A1-28 type *rgpB*) og pETM-41-vektor isolert ved hjelp av en alkalisk plasmid isoleringsmetode (oppskrift avsnitt 6.10).

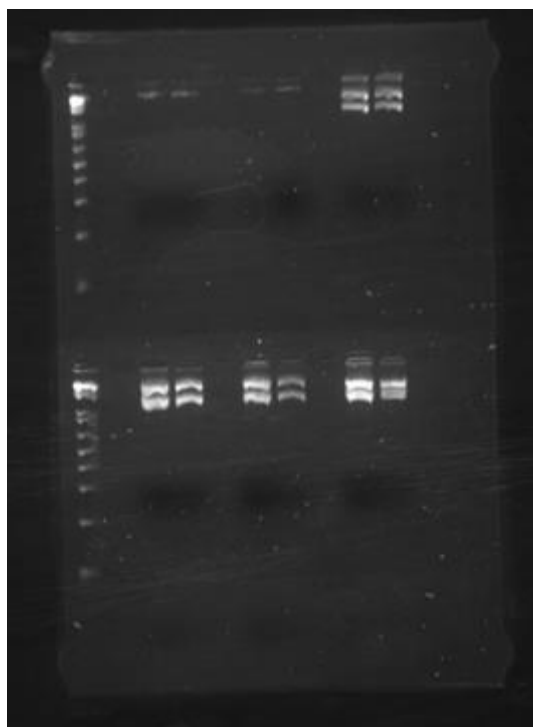
TOPO-vektorene med *rgpB*-insert ble kuttet med restriksjonsenzymene BamHI + NcoI i buffer 3.1 for å hente ut *rgpB*-insertet. Etter gelelektroforese kunne vi se at plasmidvektoren med insert var delt i bånd, ett for *rgpB* fragmentet og ett for vektoren.

pETM-41 har en polylinkersekvens med restriksjonsseter, blant annet for BamHI og NcoI. Vi kuttet pETM-41 med BamHI + NcoI i buffer 3.1 slik som for *rgpB* TOPO-klonene for å gjøre klar vektoren for ligering. Dette ble kjørt ut på en gel. Vi fikk også to bånd i gelen, men de lå mye lengre opp i gelen enn de fra *rgpB* TOPO-klonene.



Figur 3.2: Bilde av elektroforesegel av PCR-produkt av TOPO-vektor med *rgpB*-insert.

Etter at TOPO-vektorer med *rgpB* insert og pETM-41 ble kuttet, ble disse kjørt i en low-melting gel for å isolere *rgpB*-genfragmentet og lineære. Vektorer som er klare til ligering vil forekomme i lineær form og ikke sirkulær form. De lineære vektorene vil vandre kortere under en elektroforeseprosess enn de sirkulære, og man kan på denne måten skille dem fra hverandre (Figur 3.3).

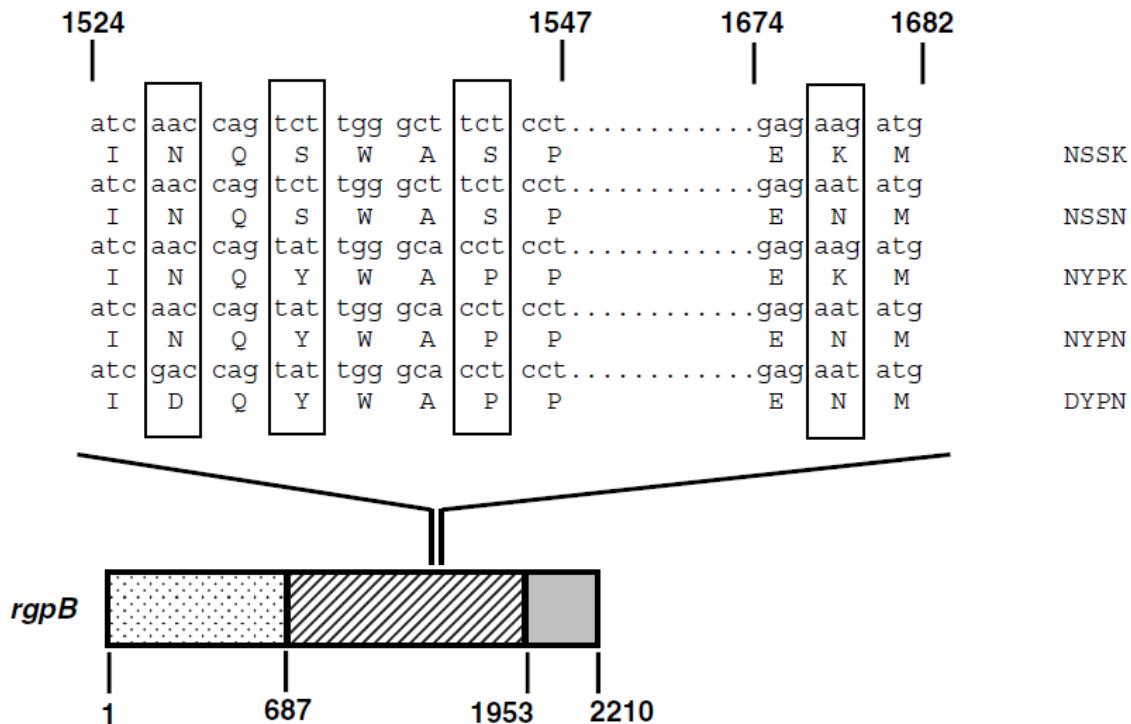


Figur 3.3: Bilde av elektroforese som har både sirkulære og lineære vektorer.

Det ble forsøkt å ligere *rgpB*-genet, som ble tatt ut av TOPO vektorer, inn i kuttete pETM-41 vektorer. Dette produktet ble transformert inn i kompetente bakterier som deretter ble dyrket. Resultatene fra dyrkingen var negativ og etter gjentatte forsøk med små modifikasjoner i kuttingen og liggeringen, måtte det avsluttes på grunn av endt forskningsperiode.

4. Diskusjon

I en studie utført av Beikler et al. [25] ble *rgpB*-genet hos forskjellige kliniske stammer av *P. gingivalis* sekvensert og analysert med tanke på variasjoner i det aktive setet. Det ble registrert fem ulike genotyper basert på fire områder i proteinet. Genotypene ble kalt NYPN, NSSN, NSSK, NYPK og DYPN. Hver bokstav hos de ulike genotypene representerer én aminosyre, hvor N= Asparagin, D= Asparaginsyre, S= Serin, Y= Tyrosin, P= Prolin og K= Lysin. Figur 4.1 viser i hvilket område av *rgpB*-genet det er sekvensvariasjon og korresponderende aminosyrevariasjon mellom forskjellige *P. gingivalis* stammer i det nevnte studiet [25]. Vår mastergradsstudie baserte seg i stor grad på arbeidet til Beikler et al. [25], men vi benyttet kliniske *P. gingivalis* stammer som tidligere var genotypet med hensyn til virulensgenet *FimA*.

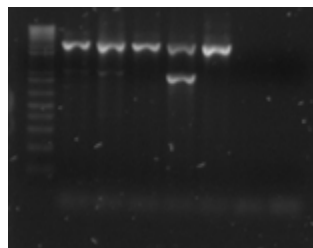


Figur 4.1: Illustrasjon som viser genområdene med aminosyrevariasjoner ved *rgpB* som er med på å definere genotypene [25].

FimA, som koder for bakteriens fimbrier, viser også ulike typer genvariasjoner og deles inn i fem genotyper, vist i tabell 3.1. Det er tidligere vist at *fimA* genotypene Ib, II og IV er mer virulente enn de andre genotypene [46]. Ved å sammenligne resultatene fra forskningen vår med forskning utført av Enersen et al. [46], kunne vi ikke se at det var samsvar med bestemte *rgpB*-genotyper og *fimA*-genotyper. Det er per dags dato for lite data til å kunne trekke noen

konklusjoner på dette området, men det vil være spennende å se hva forskning i fremtiden finner ut om forskjellige kombinasjoner av *fimA* og *rgpB* utgjør en endring av virulens, siden man allerede vet at det er et samspill mellom fimbriale proteiner og *rgpB* [36].

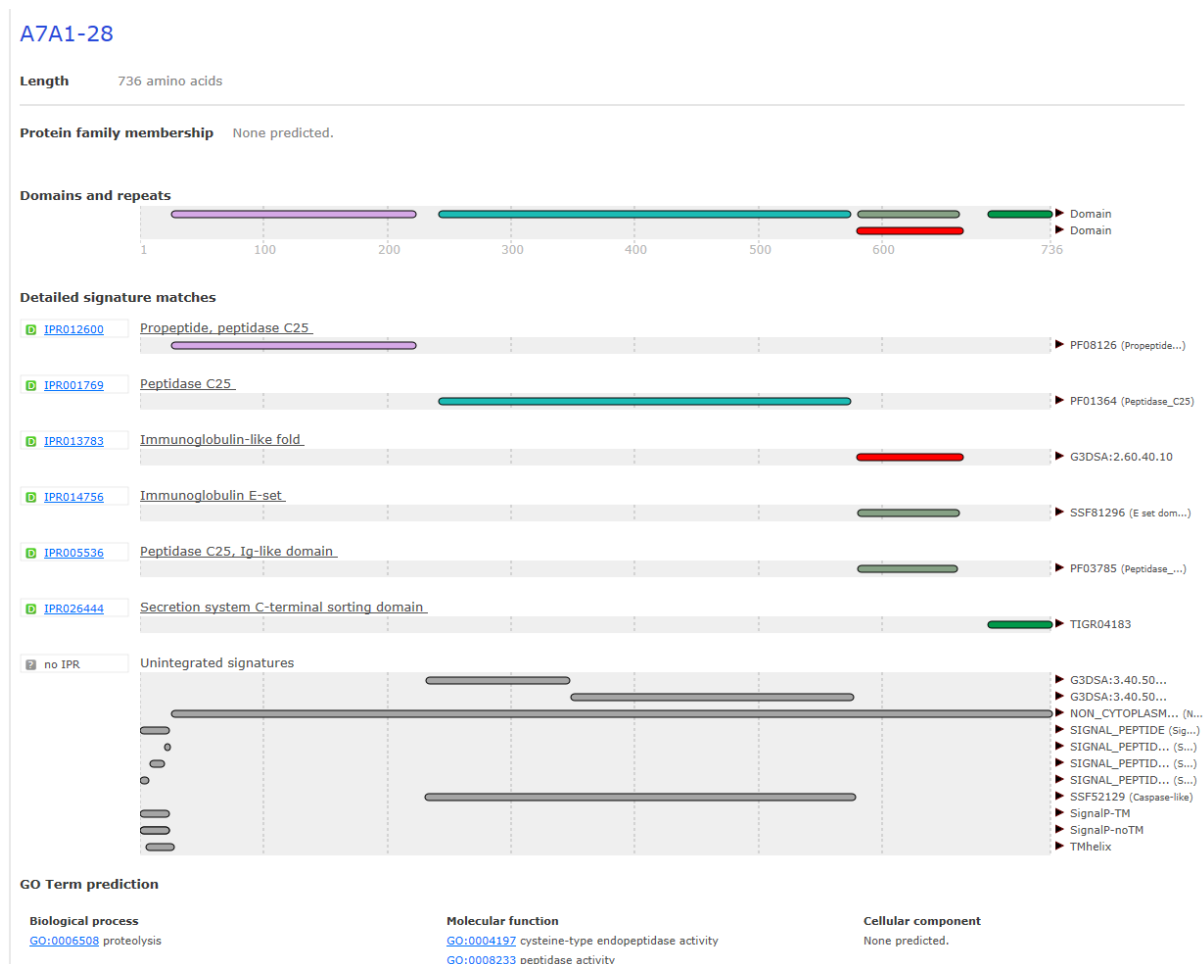
Primerne som ble brukt i prosjektet vårt ble designet ut ifra *rgpB*-genet hos de tidligere totalsekvenserte *P. gingivalis* laboriestammene ATCC 33277 og W83. Disse referansestammene er derfor mye brukt i forskningssammenheng. Det fungerte relativt godt å bruke primere designet ut ifra referansestammene, men det oppstod enkelte problemer. Blant annet fikk vi problemer med at en av primerne festet seg på et ekstra område enn der vi ønsket. Dette førte til flere PCR produkt hos noen stammer (Figur 4.2). Et annet problem som oppstod var at den ene sekvenseringsprimeren (*rgpB* reverse primer 1) ikke bandt seg til tre av stammene. At *rgpB* reverse primer 1 ikke kunne benyttes hos alle de kliniske stammene uttrykker ytterligere at det er basesekvensvariasjon hos ulike *P. gingivalis* stammer.



Figur 4.2: Bilde av elektroforese der primere har festet seg til mer enn et sted og dermed ført til flere typer genfragmenter.

RgpB er et multidomeneprotein som består av et signalpeptid, prodomene, katalytisk domene, immunoglobulin superfamiliedomene og C-terminal domene [47]. Det er publisert proteinstruktur av *rgpB* peptid der det katalytiske domenet sammen med immunoglobulin superfamiliedomenet er blitt analysert [45]. Men det er vist at C-terminal enden er med på å folde proteinet og at den er viktig for transport av *rgpB* over cellemembranen [36]. Vi ønsket derfor å klonere et sekvensområde av genet som lå innenfor det katalytiske området, inkludert aminosyrevariasjonene nevnt av Beikler et al.[25], og som strakte seg helt ut til den C-terminale enden. For å finne ut om genet via transformasjon, kunne uttrykkes til et peptid som var stabilt for krystallisering, kontrollerte vi stabiliteten av *rgpB* proteinet ved hjelp av *XtalPred* (bioinformatisk program) og sammenlignet det med proteinstrukturen av *rgpB* som er publisert fra *P. gingivalis* stammen, W83 [45]. På grunn av at signalpeptidområdet og prodomenet lå i et ustabilisert sekvensområde, ble det derfor ikke tatt med i kloningen (Figur 4.3). *RgpB*-genfragmentet (nt 900-2200) ble forsøkt ligert inn i vektoren en rekke ganger uten å

lykkes, til tross for gjentatt justering av ligeringsbetingelsene. Dette var et svært tidkrevende arbeid fordi man ikke kunne vite om ligeringen var vellykket før vektoren var transformert inn i en kompetent celle og dyrket frem. Dette førte til mange runder med restriksjonskutting av TOPO-kloningsvektor med insert av *rgpB*-genfragment, ligering av *rgpB*-genfragment sammen med pETM-41, transformering og dyrkning av *E. coli*. Det kan ha vært flere årsaker til mislykket ligering, som for eksempel temperatur, tidsbruk, vektoren, genet eller selve kuttingen av genet. Selv etter dyrkning, måtte det kjøres PCR for å kontrollere at man hadde fått vektorer med riktig insert. Ved flere anledninger fikk vi vekst av *E. coli* på LB-skålene med kanamycin, men det viste seg hver gang å være kolonier med pETM-41 uten *rgpB*-insert. Selv om det ble utført tiltak for å unngå slike transformasjoner med tomme vektorer, fikk vi det ikke til.



Figur 4.3 Illustrasjon av de ulike domeneene hos *rgpB* proteinet hentet fra nettsøk med den kliniske stammen A7A1-28 i InterScanPro (www.ebi.ac.uk/interpro). *InterProScan* analyserer proteinsekvenser og viser hvilke familier proteinet tilhører og hvilke funksjonelle domener som finnes i proteinet. *RgpB* proteinet har et signal peptid aa 1-24, et propeptid (prodomene) lik den i peptidase C25 aa 25-222, peptidasedomene lik peptidase C25 (caspase liknende) i aa 241-573, immunoglobulin liknende folding i området aa 579-658 og et sekresjonssystem C-terminalt med sorteringssignal i området aa 679-736.

Etter endt forskningsperiode ble prosjektet videreført. Ved å benytte pETM-41 vektoren modifisert fra andre kloningsforsøk ble det utført en vellykket ligering og transformering av *rgpB*-gengfragmentet (nt 900-2200) fra A7A1-28 og fra laboristammen ATCC 33277. Dette kan brukes til videre forskning hvor det er behov for å få uttrykt store mengder av *rgpB* proteinet, blant annet til krystallisering og for videre kartlegging av proteinets tredimensjonale struktur.

Det er tidligere vist at spesifikke inhibitorer har gitt effektiv reduksjon av virulensen til *P. gingivalis*. I tillegg har det blitt registrert redusert alveolært bentap ved immunisering mot *RgpB* [25]. Dette kan være et interessant grunnlag for videre studier rundt *rgpB* og dens struktur og egenskaper, og i fremtiden kan dette gi mulighet for utvikling av alternative terapeutiske strategier rettet direkte mot *rgpB* proteinet.

5. Ordliste

| | | |
|-----------------------|---|--|
| Akrylamidgel | - | Gelform av akrylamid med den kjemiske formelen C ₃ H ₅ NO. |
| Anaerob | - | Uten oksygen. Organismer som lever og vokser uten oksygen. |
| Annealing | - | Prosess der komplementær DNA-fragment binder seg til ssDNA tråd og former dsDNA. |
| Annealingsfase | - | En fase under PCR-reaksjonen hvor primere kan binde seg til single DNA-tråder/templater. |
| Antisense | - | Komplementært til sense tråden hvor genet er uttrykt. |
| Asakkarolytisk | - | Mikroorganismer som ikke kan metabolisere karbohydrater, og som derfor er avhengig av andre kilder for å få energi. |
| Bioteknologisk metode | - | Metoder hvor mikroorganismer eller andre biologiske substanser blir brukt til produksjon og ved industrielle prosesser. |
| BOP | - | «Bleeding on probing»; blødning ved sondering i tannkjøtt; diagnostisk kriterium ved diagnostikk av periodontale sykdommer. Tegn på infeksjon i tannkjøttet. |
| ddNTP | - | 2',3'-dideoksynukleotid trifosfat. Molekylet er annerledes fra deoxynukleotider ved at den har et hydrogenatom festet til 3' karbon istedenfor en OH gruppe og kan dermed ikke binde seg til nye dNTPer. |
| Denaturering | - | dsDNA løsner til ssDNA |
| Dental biofilm | - | Plakk. Kolonisering av ulike typer bakterier på tannoverflaten. |
| DNA-polymerase | - | Enzym som katalyserer dannelsen/syntesen av en ny DNA-tråd fra deoksyribonukleotid trifosfater. |
| dNTP | - | Deoksyribonukleotid trifosfat. Et molekyl bestående av deoksyribose, fosfat og en base, enten Adenin, Tymin, Guanin og Cytosin. |
| Domene | - | Område på et protein med bestemt tertiærstruktur (f.eks. globulær eller stavlignende) og som har en karakteristisk aktivitet. |
| dsDNA | - | Dobbeltrådig DNA. |
| Dysbiose | - | Mikrobiell ubalanse. |

| | | |
|----------------------|---|--|
| Ekspresjonsvektor | - | En vektor som uttrykker det genet den inneholder når den er i en vert. |
| Fermentering | - | Ufullstendig nedbrytning av karbohydrater og andre forbindelser hos bakterier og sopp som benyttes til å skaffe seg energi til livsprosesser og vekst. |
| Forward primer | - | En primer som binder seg til sense-DNA-tråden hvor genet blir uttrykt. |
| Gen | - | Arveanlegg. Et spesifikt område på kromosomet. |
| Genom | - | En celles totale mengde av genetisk materiale. |
| Hemin | - | Oksidert hem fra hemoglobin. Hem er den aktive gruppen i hemoglobin som transporterer oksygen. |
| House-keeping gene | - | Gener som koder for grunnleggende funksjon og opprettholdelse hos en organisme og som derfor har lite variasjon i genene. |
| House-keeping roller | - | Grunnleggende funksjoner for opprettholdelse hos en organisme. |
| Konjugasjon | - | En form for genoverføring hvor cellene legger seg ved siden av hverandre og skaper en direkte forbindelse hvor genmateriale utveksles. |
| Konserverte områder | - | Områder som er bevarte og hvor det ikke forekommer gen variasjoner. |
| Kovalent binding | - | Type kjemisk binding hvor det er likeverdig deling av elektroner mellom atomer med lik elektronegativitet. |
| Kromatogram | - | En grafisk fremstilling av resultater basert på separasjons- og analysemetoder. |
| Ligase | - | Enzymer som katalyserer sammenkoblingen av to molekyler. |
| Nukleinsyre | - | Biokjemiske forbindelser. To hovedgrupper: deoksyribonukleinsyre (DNA) og ribonukleinsyre (RNA). |
| Primer | - | Syntetisk oligonukleotid med en bestemt DNA-sekvens som brukes til genetisk analyse, for eksempel i PCR. |
| Primer dimer | - | Et biprodukt som dannes ved PCR, hvor to primere har blitt bundet sammen pga. at de inneholder baser som er komplementære med hverandre. |

| | | |
|--------------------|---|--|
| Primerpar | - | To primere, en sense og en antisense, som sekvenserer samme området DNA-tråd, men på hver sin enkelttrådig DNA-tråd. |
| Prokaryot | - | Organismer som ikke har cellekjerne. |
| Restriksjonsenzym | - | Et enzym som har evnen til å spalte DNA-molekyler på eller rundt sekvenser med spesifikke baser. |
| Reverse primer | - | Primer som binder seg til antisense-DNA-tråden. |
| RNA | - | Ribonukleinsyre. |
| Selvhybridisering | - | Hybridisering mellom nukleinsyrer som er komplementære på samme primer. |
| Sense | - | Tråden i DNA som ikke koder for RNA-molekylene som dannes ved transkripsjon av DNA, og som ikke translateres til et protein. |
| Spektrofotometer | - | Instrument som måler absorpsjon av elektromagnetisk stråling med en bestemt frekvens når den går gjennom en stoffprøve. |
| ssDNA | - | Singel DNA-tråd. |
| Sulcus | - | Området mellom tannoverflaten og det gingivale vevet. |
| Symbiose | - | Forholdet mellom to eller flere arter, hvor begge arter har gjensidige fordeler av hverandre. |
| Topoisomeraseenzym | - | Enzymer som foretar oppkveiling av dobbeltrådet DNA. |
| Translokasjon | - | Utveksling av kromosomfragmenter mellom kromosomene. |
| Virulensfaktor | - | Samlebegrep på faktorer som er av betydning for sykdomsfremkallende evne. |

Kilder:

Det store medisinske leksikon <http://sml.snl.no/>
<http://chemistry.about.com/>
<http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/>
<http://www.thefreedictionary.com/>
<http://www.biology-online.org/dictionary/>
<http://www.medterms.com/>
<https://medtekipedia.wikispaces.com/>
<http://www.bio.davidson.edu/Bio111/seq.html>
<http://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/>

6. Oppskrifter

6.1 Agarløsning 1:

Colombia (42,5 g Colombia agar base, 10 g bakteriologisk agar type E/A, 930 ml H₂O, 10 ml av 0,5 mg/ml hemin, 50 ml fullblod og 10 ml vitamin K₃).

6.2 Anaerobe forhold:

Oksygenet i kolbene ble fjernet av maskinen Anoxomat og tilført ønskede konsentrasjoner av ulike gasser (90 % N₂, 5 % H₂, 5 % CO₂).

6.3 TE-buffer:

10 mM Tris + 1 mM EDTA.

6.4 PCR-reaksjonsmiks:

Stockløsning: 50 µl Hot star master-mix (Qiagen), 115.5 µl dH₂O, 4.5 µl 50 mM MgCl₂, 7.5 µl *RgpB* forward 1 og 7.5 µl *RgpB* reverse 1.

6.5 Agarosegel:

Det ble laget en 1,5 % agarosegel ved å blande 0,75 g agarose, 50 ml 1x TBE (Tris-borat-EDTA, 89 mM Tris-borat, 2 mM EDTA) og 3,5 µl GelRed som binder seg til DNA og er fluoriserende under UV-lys. Agarose med TBE-buffer ble varmet opp i en mikrobølgeovn og blandet til det var homogent. Dette fikk stå og kjøle seg ned til det var mulig å ta på kolben. Avkjølt, men flytende agarose ble overført til en støpeform med en brønnkam. Dette fikk stå å stivne før gelen ble overført til et elektroforeskammer som var fylt med TBE-buffer. 2 µl PCR-prøve ble deretter blandet med 1 µl loadingbuffer (6x), (6x loadingbuffer: 30 % glycerol, 0.25 % bromophenol blue, 0.25 % xylene cyanol FF). Glycerol binder seg til DNA og forhindrer at det flyter opp av brønnene. Bromophenol blue og xylene cyanol FF er fargemarkører som viser vandrethastighet under elektroforesen.

6.6 Spesifikasjoner PCR reaksjon med BigDye sekvenseringsmiks

12 µl BigDye sekvenseringsmiks ble blandet med 7 µl prøve og 1 µl primer.

Forvarming: 90 °C i 1 minutt. Deretter 27 syklers med 96 °C i 10 sekunder for denaturering, 55 °C i 7 sekunder for annealing og 60 °C i 4 minutter for elongering.

6.7 PCR-reaksjonsmiks 2:

20 µl OneTaq, 17 µl dH₂O, 0,5 µl primer *RgpB* forward ligeringsprimer og 0,5 µl primer *RgpB* reverse ligeringsprimer.

6.8 Innstillinger for PCR maskinen for PCR-reaksjonsmiks 2:

Forvarming: 96 °C i 2 minutter. Deretter 30 syklar med 96 °C i 30 sekunder for denaturering, 62 °C i 25 sekunder for annealing og 72 °C i 30 sekunder for elongering.

6.9 Agarløsning 2:

10 g LB broth ble blandet med 500 ml dH₂O. Miksen ble deretter rørt i 20 minutter med maskinen RCT basic IKA Werke, før det ble tilsatt 7,5 g agar, blandet og varmet opp til 50 °C. Løsningen ble autoklavert på 125 °C i 15 minutter. 500 µl kanamycin ble tilsatt når mediet har temperatur under 55 °C og fordelt i skåler.

6.10 Isolering av vektorer

Prinsippet for å få ut vektorene går ut på å lysere celleveggen til bakteriene ved hjelp av tre alkaliske lyseringsløsninger. Dette ble blandet med TE-bufferløsningen som inneholdt *E. coli* bakteriene. Etter lyseringen ble det sentrifugert slik at restene av bakteriene ble samlet i en pellet som kunne kastes. Supernatanten med plasmidene ble deretter tilsatt isopropanol slik at plasmidene ble utfelt. Siden RNA utfelles med plasmidene, ble ribonuklease (RNase) tilsatt for å fjerne dette. Løsningen ble deretter sentrifugert slik at plasmidene samlet seg i en pellet. Supernatanten ble fjernet og pelleten med plasmidene ble rensset ved å bruke løsninger med forskjellige konsentrasjoner av etanol.

Det ble laget tre alkaliske lyserings-løsninger:

1. 50 mM glucose
25 mM Tris-Cl (pH 8.0)
10 mM EDTA (pH 8.0)
2. 0,2 N NaOH
1% SDS
3. 5 M potassium acetate 60,0 ml
Glacial acetic acid 11,5 ml
H₂O 28,5 ml

Molecular cloning. A laboratory manual third edition. By Sambrook and Russel. 2001.

100 µl av løsning 1 ble tilsatt *E. coli* pelleten. Det ble blandet godt med pipetten før løsningen fikk hvile på is i 5 min. Deretter ble det tilsatt 200 µl av løsning 2 før det ble blandet forsiktig ved å bikke på røret. Det er viktig å blande forsiktig slik at genomisk DNA ikke skal knekke og blande seg med plasmid DNA. Dette fikk stå i 2 minutter på is. Til slutt ble det tilsatt 150 µl av løsning 3. Også her ble det blandet forsiktig ved å bikke på røret, av samme grunn som nevnt tidligere. Dette fikk stå på is i 5 minutter før det ble sentrifugert på 12 500 rpm, 4 °C i 10 minutter. Ved å gjøre dette ble celleveggen til *E. coli* bakteriene lysert. Supernatanten, som inneholdt plasmidene, ble overført til egne rør før det ble tilsatt 450 µl isopropanol. Supernatant med isopropanol ble sentrifugert på 12 500 rpm, 4 °C i 15 minutter. Supernatanten ble fjernet med en pipette før det ble tilsatt 500 µl 70 % etanol og sentrifugert på 12 500 rpm, 4 °C i 5 minutter. Den nye supernatanten ble fjernet og pelleten ble vakuomtørket på 30 °C i 10 minutter (Eppendorf Concentrator 5301). 25 µl TE-buffer og 1,5 µl RNase ble tilsatt den vakuomtørkede pelleten, som ble inkubert på 37 °C i 30 minutter. Deretter ble det tilsatt 75 µl H₂O, 11 µl Na-Acetat pH 5,2 og 277 µl 96 % etanol, som ble satt i fryseren på -20 °C i 1 time. Dette ble så tint opp og sentrifugert på 12 500 rpm, 4 °C i 20 minutter. Supernatanten ble fjernet, og det ble tilsatt 500 µl av 70 % etanol og sentrifugert på 12 500 rpm, 4 °C i 5 minutter. Supernatanten ble igjen fjernet og pelleten ble vakuomtørket. Det ble til slutt tilsatt 20 µl TE-buffer.

7. REFERANSER

1. Armitage, G.C., Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, 1999. **4**(1): p. 1-6.
2. Marsh, P.D., Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*, 1994. **8**(2): p. 263-71.
3. Cugini, C., V. Klepac-Ceraj, E. Rackaityte, J.E. Riggs, og M.E. Davey, *Porphyromonas gingivalis*: keeping the pathos out of the biont. *J Oral Microbiol*, 2013. **5**.
4. Abiko, Y., T. Sato, G. Mayanagi, og N. Takahashi, Profiling of subgingival plaque biofilm microflora from periodontally healthy subjects and from subjects with periodontitis using quantitative real-time PCR. *J Periodontal Res*, 2010. **45**(3): p. 389-95.
5. Fitzpatrick, R.E., L.C. Wijeyewickrema, og R.N. Pike, The gingipains: scissors and glue of the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. *Future Microbiol*, 2009. **4**(4): p. 471-87.
6. Eke, P.I., B.A. Dye, L. Wei, G.O. Thornton-Evans, og R.J. Genko, Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res*, 2012. **91**(10): p. 914-20.
7. Papapanou, P.N., The prevalence of periodontitis in the US: forget what you were told. *J Dent Res*, 2012. **91**(10): p. 907-8.
8. Skudutyte-Rysstad, R., H.M. Eriksen, og B.F. Hansen, Trends in periodontal health among 35-year-olds in Oslo, 1973-2003. *J Clin Periodontol*, 2007. **34**(10): p. 867-72.
9. Position paper: epidemiology of periodontal diseases. American Academy of Periodontology. *J Periodontol*, 1996. **67**(9): p. 935-45.
10. Socransky, S.S., A.D. Haffajee, J.M. Goodson, og J. Lindhe, New concepts of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 1984. **11**(1): p. 21-32.
11. Marsh, P.D., og M.V. Martin, *Oral microbiology*. 2009.
12. Socransky, S.S., og A.D. Haffajee, The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol*, 1992. **63**(4 Suppl): p. 322-31.
13. Zambon, J.J., Periodontal diseases: microbial factors. *Ann Periodontol*, 1996. **1**(1): p. 879-925.
14. Socransky, S.S., A.D. Haffajee, M.A. Cugini, C. Smith, og R.L.Jr. Kent, Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, 1998. **25**(2): p. 134-44.
15. Ramseier, C.A., J.S. Kinney, A.E. Herr, T. Braun, J.V. Sugai, C.A. Shelburne, L.A. Rayburn, H.M. Tran, A.H. Singh, og W.V. Giannobile, Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease. *J Periodontol*, 2009. **80**(3): p. 436-46.
16. Hajishengallis, G., R.P. Darveau, og M.A. Curtis, The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*, 2012. **10**(10): p. 717-25.
17. Darveau, R.P., G. Hajishengallis, og M.A. Curtis, *Porphyromonas gingivalis* as a potential community activist for disease. *J Dent Res*, 2012. **91**(9): p. 816-20.

18. Haynes, W.G. og C. Stanford, Periodontal disease and atherosclerosis: from dental to arterial plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(8): p. 1309-11.
19. Haraszthy, V.I., J.J. Zambon, M. Trevisan, M. Zeid, og R.J. Genco, Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol*, 2000. **71**(10): p. 1554-60.
20. Kozarov, E.V., B.R. Dorn, C.E. Shelburne, W.A.Jr. Dunn, og A. Progulsk-Fox, Human atherosclerotic plaque contains viable invasive *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(3): p. e17-8.
21. Haheim, L.L., I. Olsen, og K.S. Ronningen, Association between tooth extraction due to infection and myocardial infarction. *Community Dent Oral Epidemiol*, 2011. **39**(5): p. 393-7.
22. Koren, O., A. Spor, J. Felin, F. Fak, J. Stombaugh, V. Tremaroli, C.J. Behre, R. Knight, B. Fagerberg, R.E. Ley, og F. Backhed, Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108 Suppl 1**: p. 4592-8.
23. Tonetti, M.S., og T.E. Van Dyke, Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Clin Periodontol*, 2013. **40 Suppl 14**: p. S24-9.
24. Friedewald, V.E., K.S. Kornman, J.D. Beck, R. Genco, A. Goldfine, P. Libby, S. Offenbacher, P.M. Ridker, T.E. Van Dyke, og W.C. Roberts, The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology editors' consensus: periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease. *J Periodontol*, 2009. **80**(7): p. 1021-32.
25. Beikler, T., U. Peters, K. Prior, B. Ehmke, og T.F. Flemmig, Sequence variations in *rgpA* and *rgpB* of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis. *J Periodontol Res*, 2005. **40**(3): p. 193-8.
26. Hajishengallis, G., *Porphyromonas gingivalis*-host interactions: open war or intelligent guerilla tactics? *Microbes Infect*, 2009. **11**(6-7): p. 637-45.
27. Lamont, R.J., og H.F. Jenkinson, Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998. **62**(4): p. 1244-63.
28. Genco, C.A., Regulation of hemin and iron transport in *Porphyromonas gingivalis*. *Adv Dent Res*, 1995. **9**(1): p. 41-7.
29. Imamura, T., J. Potempa, S. Tanase, og J. Travis, Activation of blood coagulation factor X by arginine-specific cysteine proteinases (gingipain-Rs) from *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(25): p. 16062-7.
30. Imamura, T., A. Banbula, P.J. Pereira, J. Travis, og J. Potempa, Activation of human prothrombin by arginine-specific cysteine proteinases (Gingipains R) from *porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(22): p. 18984-91.
31. Hosotaki, K., T. Imamura, J. Potempa, N. Kitamura, og J. Travis, Activation of protein C by arginine-specific cysteine proteinases (gingipains-R) from *Porphyromonas gingivalis*. *Biol Chem*, 1999. **380**(1): p. 75-80.
32. Potempa, J., A. Banbula, og J. Travis, Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontol 2000*, 2000. **24**: p. 153-92.

33. O'Brien-Simpson, N.M., R.A. Paolini, B. Hoffman, N. Slakeski, S.G. Dashper, and E.C. Reynolds, Role of RgpA, RgpB, and Kgp proteinases in virulence of *Porphyromonas gingivalis* W50 in a murine lesion model. *Infect Immun*, 2001. **69**(12): p. 7527-34.
34. Haruyama, K., A. Yoshimura, M. Naito, M. Kishimoto, M. Shoji, Y. Abiko, Y. Hara, and K. Nakayama, Identification of a gingipain-sensitive surface ligand of *Porphyromonas gingivalis* that induces Toll-like receptor 2- and 4-independent NF-kappaB activation in CHO cells. *Infect Immun*, 2009. **77**(10): p. 4414-20.
35. Kerr, J.E., J.R. Abramian, D.H. Dao, T.W. Rigney, J. Fritz, T. Pham, I. Gay, K. Parthasarathy, B.Y. Wang, W. Zhang, og G.D. Tribble, Genetic Exchange of Fimbrial Alleles Exemplifies the Adaptive Virulence Strategy of *Porphyromonas gingivalis*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e91696.
36. Nguyen, K.A., J. Travis, og J. Potempa, Does the importance of the C-terminal residues in the maturation of RgpB from *Porphyromonas gingivalis* reveal a novel mechanism for protein export in a subgroup of Gram-Negative bacteria? *J Bacteriol*, 2007. **189**(3): p. 833-43.
37. Feng, Z. og A. Weinberg, Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontol 2000*, 2006. **40**: p. 50-76.
38. Dzink, J.L., S.S. Socransky, og A.D. Haffajee, The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol*, 1988. **15**(5): p. 316-23.
39. Haffajee, A.D., M.A. Cugini, A. Tanner, R.P. Pollack, C. Smith, R.L.Jr. Kent, og S.S. Socransky, Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol*, 1998. **25**(5): p. 346-53.
40. Dewhirst, F.E., T. Chen, J. Izard, B.J. Paster, A.C. Tanner, W.H. Yu, A. Lakshmanan, og W.G. Wade, The human oral microbiome. *J Bacteriol*, 2010. **192**(19): p. 5002-17.
41. Ally, N., J.C. Whisstock, M. Sieprawska-Lupa, J. Potempa, B.F. Le Bonniec, J. Travis, og R.N. Pike, Characterization of the specificity of arginine-specific gingipains from *Porphyromonas gingivalis* reveals active site differences between different forms of the enzymes. *Biochemistry*, 2003. **42**(40): p. 11693-700.
42. Enersen, M., I. Olsen, og D.A. Caugant, Genetic diversity of *Porphyromonas gingivalis* isolates recovered from single "refractory" periodontitis sites. *Appl Environ Microbiol*, 2008. **74**(18): p. 5817-21.
43. Enersen, M., Population Structure of the Periodontal Pathogen *Porphyromonas gingivalis*: Diversity in Housekeeping Genes and the Major Fimbriae Gene, in Institute of Oral Biology, Faculty of dentistry. 2008, University of Oslo, Norway.
44. Enersen, M., I. Olsen, O. Kvalheim, og D.A. Caugant, *fimA* genotypes and multilocus sequence types of *Porphyromonas gingivalis* from patients with periodontitis. *J Clin Microbiol*, 2008. **46**(1): p. 31-42.
45. Eichinger, A., H.G. Beisel, U. Jacob, R. Huber, F.J. Medrano, A. Banbula, J. Potempa, J. Travis, og W. Bode, Crystal structure of gingipain R: an Arg-specific bacterial cysteine proteinase with a caspase-like fold. *Embo j*, 1999. **18**(20): p. 5453-62.
46. Enersen, M., K. Nakano, og A. Amano, *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *J Oral Microbiol*, 2013. **5**.

47. de Diego, I., F.T. Veillard, T. Guevara, B. Potempa, M. Sztukowska, J. Potempa, og F.X. Gomis-Rüth, *Porphyromonas gingivalis* virulence factor gingipain RgpB shows a unique zymogenic mechanism for cysteine peptidases. *J Biol Chem*, 2013. **288**(20): p. 14287-96.

Kilde til figurer:

Figur 1.3: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D>

Figur 2.5: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>

Figur 2.6: <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/10787018>

Figur 2.7: http://en.wikipedia.org/wiki/Sanger_sequencing

Figur 2.8: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Capillary_electrophoresis_sequencing.gif

Figur 2.12: <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/450641>

Figur 2.13: http://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/cloning/pdf/pETM-41_map.pdf

Figur 2.14 : <https://www.neb.com/applications/protein-expression-and-purification/coupled-protein-expression-and-purification/maltose-binding-protein-expression>