

Mikrobiologiske, proteomiske og immunologiske studier af aggressiv parodontitis

Et skridt nærmere forståelsen af JP2-klon-associeret aggressiv parodontitis.

Mette Rylev



Både tværsnits- og longitudinale studier har vist en stærk association mellem en enkelt klon (JP2 klonen) af *Aggregatibacter* (tidligere *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa)) og aggressiv parodontitis (AgP) hos unge af nordvestafrikansk oprindelse. Kliniske tegn på sygdom uden JP2-klonens tilstedeværelse rejser dog flere vigtige spørgsmål: 1) kan yderligere vævsnedbrydning induceret ved en kun forbigående infektion fortsætte; 2) findes der en alternativ ætiologi til AgP i denne population; eller 3) kan nedbrydningen af parodontiet standses som et resultat af immunologisk eliminering af JP2-klonen; ydermere 4) indeholder JP2-klonen andre immunogene proteiner end leukotoksinet?

En omfattende kortlægning af den subgingivale mikroflora blev foretaget hos otte unge marokkanere (fire med AgP). Kortlægningen blev foretaget vha. sekventering og fylogenetisk analyse af 2.833 klonede PCR amplicons af fylogenetisk informative 16S rRNA-gener i plakprøverne. Resultaterne afslørede JP2-klonens økologiske sammensætning hos unge marokkanere med AgP og viste, at JP2-klonen, selvom den formodentlig er årsag til sygdommen, udgør en meget lille del af den komplekse subgingivale mikroflora. Ingen øvrige patientspecifikke sekvenser blev fundet. Samlet blev 173 bakterielle taxa identificeret i de otte plakprøver, hvoraf 47 % tilhørte endnu ikke kendte og dyrkbare arter og repræsenterer muligvis nye arter. De fundne taxa tilhørte otte bakterielle phyla: TM7 (disse bakterier har aldrig været dyrket), *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Deferribacteres*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes*, *Bacteroidetes*, og *Fusobacteria*.

Kvantitative analyser af serum IgG-antistoffer mod virulensfaktoren leukotoksin blev udført vha. et "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA). Sera fra yderligere 14 individer blev brugt som reference. Bemærkelsesværdigt høje antistofkoncentrationer blev målt mod leukotoksinet, især hos JP2-positive individer (Fig. 1). Resultaterne peger på, at sygdomsaktiviteten standses hos nogle patienter som et resultat af elimineringen af JP2-klonen. En hovedårsag til dette kan være dannelsen af antistoffer mod leukotoksinet fra denne patogen. Dette er muligvis det første indirekte bevis for, at det adaptive immunforsvar mod JP2-klonen af Aa ved AgP kan føre til eliminering af denne patogene bakterie.

Som en platform for yderligere identifikation af immunogener fra Aa blev proteomet af en JP2-klon (HK1651) undersøgt ved todimensional (2D) gel-elektroforese kombineret med 2D-immunoblotning. I alt blev 167 prikker identificeret fra proteomkortet, repræsenterende 113 forskellige proteiner, hvoraf de 19 var ydre membranproteiner. Analyserne, vha. immunoblotning af de 2D-gel-separerede proteiner fremkaldt med sera fra fem individer med Aa-infektioner og en rask kontrol, afslørede 32 immunreaktive proteiner. Antistoffer mod to ikke tidligere beskrevne immunogene ydre membranproteiner, YaeT (85kDa) og Omp39 (39 kDa), blev fundet udelukkende hos individer med nuværende eller tidligere JP2-infektion. Opdagelsen af sådanne antigener kan være første skridt på vejen til udviklingen af diagnostiske redskaber for JP2-associerede AgP og måske bruges til udvikling af vaccine mod sygdommen.

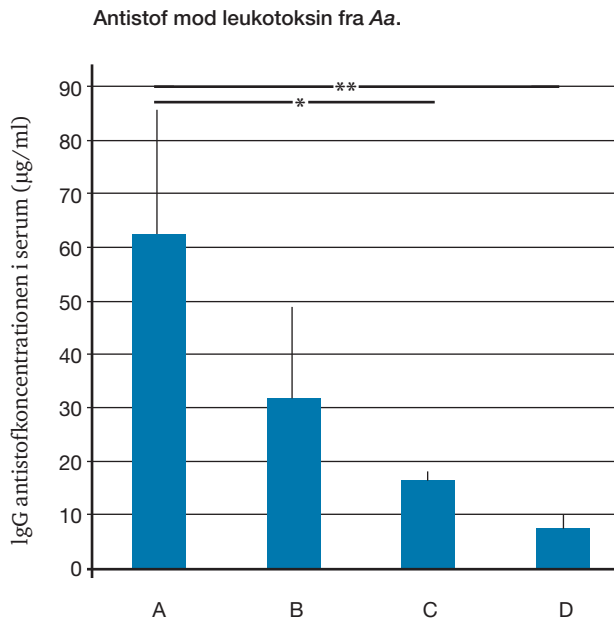


Fig. 1. Koncentrationen (µg/ml) af antistof mod leukotoksin fra Aa hos 22 individer af dansk og marokkansk afstamning fordelt i følgende grupper: A: Nuværende Aa JP2-infektion, (n = 3), B: Kendt tidligere Aa JP2-infektion (n = 4), C: Nuværende non-JP2 Aa infektion (n = 5), og D: Raske og nuværende ingen Aa-infektion. Bjælkerne indikerer standard error of the mean.

Ph.d.-afhandlingens delarbejder

- I. Rylev M, Kilian M. Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. *J Clin Periodontol* 2008; 35 (Suppl. 8): 346-61.
- II. Rylev M, Bek-Thomsen M, Reinholdt J, Ennibi O-K, Kilian M. Microbiological and immunological characteristics of Moroccan adolescent aggressive periodontitis patients with and without detectable *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JP2 Infection. Submitted.
- III. Rylev M, Abduljabar AB, Ennibi O-K, Haubek D, Christensen G, Kilian M, Birkelund S. Proteomic and immunoproteomic analysis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JP2 clone strain HK1651. Submitted.

Afsluttende forelæsning

Den afsluttende forelæsning med titlen "Microbiological, proteomic, and immunological studies of aggressive periodontitis" fandt sted den 6. november 2009 i Søauditorierne, Aarhus Universitet. Medlemmer af bedømmelsesudvalget var: professor, dr.odont. Palle Holmstrup (formand), Aarhus og Københavns Universitet; professor, ph.d. Ingar Olsen, Oslo Universitet, Norge, og professor, ph.d. Michael A. Curtis, Queen Mary's School of Medicine and Dentistry, London, U.K.

Hovedvejleder var professor, dr.odont. Mogens Kilian, Institut for Medicinsk Mikrobiologi og Immunologi, Aarhus Universitet, og vejledere var professor, dr.med. Svend Birkelund, Institut for Medicinsk Mikrobiologi og Immunologi, Aarhus Universitet, og lektor, ph.d. Dorte Haubek, Tandlægeskolen, Aarhus Universitet.