

사람 치은 섬유아세포에서의 *Tannerella forsythia* 전세균, 막단백질, 당지질에 의한 염증성 사이토카인 발현

김정은¹, 이성훈², 최봉규², 구기태¹, 김태일¹, 이용무¹, 구영¹, 정종평¹, 류인철^{1*}

- 1. 서울대학교 치의학대학원 치주과학교실 및 치학연구소
- 2. 서울대학교 치의학대학원 구강악안면 감염-면역학전공 및 치학연구소

Pro-inflammatory cytokine expression in human gingival fibroblasts by *Tannerella forsythia* whole bacteria, membrane proteins, and lipopolysaccharide

Jung-Eun Kim¹, Sung-Hoon Lee², Bong-Kyu Choi², Ki-Tae Koo¹, Tae-Il Kim¹, Yong-Moo Lee¹, Young Ku¹, Chong-Pyoung Chung¹, In-Chul Rhyu^{1*}

- 1. Department of Periodontology, School of Dentistry and Dental Research Institute, Seoul National University
- 2. Oral Infection and Immunity, School of Dentistry, Seoul National University

ABSTRACT

Purpose: The purpose of this study was to investigate induction of cytokine expression in human gingival fibroblasts (HGFs) by whole cell and the components of *T. forsythia*.

Material and Methods: After HGFs were treated with lipopolysaccharide (LPS), membrane protein isolated from *T. forsythia* or culture media of *T. forsythia*, the induction of interleukin (IL)-1, IL-6 and IL-8 was examined with real-time PCR and ELISA. Their induction ability of cytokines was compared with whole bacteria.

Result: The expression of IL-6 and IL-8 was significantly induced in HGFs by whole bacteria and membrane protein. The expression of IL-1 β was induced by membrane protein of *T. forsythia*, not by whole bacteria. LPS and condition media of *T. forsythia* slightly activated HGFs.

Conclusion: The membrane protein of *T. forsythia* could be one of virulence factors.

(*J Korean Acad Periodontol* 2008;38:543-550)

KEY WORDS: *Tannerella forsythia*; virulence factors; human gingival fibroblasts

서론

치주질환은 치주조직의 파괴와 골 흡수에 의한 치아 손실을 야기하는 대표적 구강질환이다. 치주질환에 관련된 요인으로는 유전적 요인, 식이 요인, 면역학적 요인, 미생물에 의한 요인 및 생활 습관 등이 있으며 다양한 요인에 의해서 진행된다고 알려져 있다.^{1,2)}

이러한 다양한 요인 중에 치주질환을 야기하는 미생물 요

인에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있는데 구강 내에 존재하는 수백 종의 세균 중 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* 및 *Tannerella forsythia*가 많이 연구되고 있는 치주병원균이다^{3,4)}. 또한 치주질환 환자와 건강한 성인을 대상으로 역학조사 결과 *P. gingivalis*, *T. denticola* 및 *T. forsythia*가 치주질환을 갖고 있는 환자에서 많이 존재하는 것으로 나타나 이 세균들을 치주질환 중요세균으로 인식하고 "red complex"로 명명하였다⁵⁾. Red complex 세균 중 *P. gingivalis*와 *T. denticola*에 대한 연구는 활발히 이루어져 유전체 정보가 밝혀졌지만 *T. forsythia*에 대한 연구는 아직 많이 이루어지지 않았다^{6,7)}.

Correspondence: In-Chul Rhyu
Department of Periodontology, School of Dentistry and Dental Research Institute, Seoul National University, 28 Yeongon-dong, Chongno-ku, Seoul, 110-744, Korea.
E-mail: icrhyu@snu.ac.kr, Tel: 82-2-2072-2640, Fax: 82-2-744-0051
Received: Sep 5, 2008; Accepted: Sep 12, 2008

*T. forsythia*는 그람 음성의 길쭉한 형태의 혐기성 세균으로 방추(fusiform) 모양이 특징이다⁸⁾. 이 세균은 치주질환 환자의 *P. gingivalis* 집락에서 같이 발견됨으로써 그 중요성이 부각되었는데 이후 치은연하 바이오필름 형성 시 *F. nucleatum*과 함께 숙주조직과 미생물간의 집락을 강화하여 치주질환의 진행에 있어서 중요한 역할을 하는 것이 보고되었다⁸⁻¹⁰⁾. 또한 *T. forsythia*의 leucine-rich repeat protein인 BspA는 *T. denticola*의 LrrA와 부착된다고 보고되었다¹¹⁾. 이런 연구결과로 인해 *T. forsythia*는 바이오필름 형성에 중요한 매개체 역할을 하는 세균으로 간주되고 있다¹¹⁾. 또한 BspA는 단핵세포주에서 CD14와 Toll-like receptor 2를 경유하여 염증성 사이토카인의 발현을 유도하는 것으로 알려졌는데¹²⁾ 최근에는 사람 치은상피세포에서 BspA에 의해 IL-8의 발현이 유도되는 것이 보고 되기도 하였다¹³⁾. 이 세균은 다른 독력인자(virulence factors)로 치주조직 파괴와 관련되어 N-benzoyl-DL arginine-naphthylamide(BANA) test에 양성을 보이는 trypsin-like protease인 prtH를 갖고 있는 것으로 보고 되었으며¹⁴⁾ 치은섬유아세포와 단핵세포주인 THP-1세포에 이 세균의 지질단백질(BfLP)을 처리하였을 경우 IL-6과 TNF- α 의 발현을 유도하는 것이 밝혀져 *T. forsythia*가 치주질환의 염증성 조직변화에 기여할 것이라고 보고되었다¹⁵⁾. Bodet C 등¹⁶⁾은 HeLa 세포와 단핵세포주인 U937 세포를 공동배양시 *T. forsythia*에 의한 염증성 사이토카인, Prostaglandin E2 및 Matrix metalloproteinase 9의 발현이 유도되는 것을 밝혔다¹⁶⁾. 하지만 다른 red complex 세균인 *P. gingivalis*와 *T. denticola*와 비교하였을 때 까다로운 배양조건 등을 이유로 연구가 더디게 진행되고 있으며 치주질환과의 관련성에 대한 연구도 부족한 실정이다.

본 연구에서는 치은 섬유아세포에서 치주질환과 관련성이 높은 *T. forsythia*의 당지질(Lipopolysaccharide, LPS), 막 단백질 및 세균 분비물질의 IL-1, IL-6 및 IL-8 발현유도능을 평가하여 염증 유도 사이토카인 발현과 관련된 독력인자를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세균 배양

T. forsythia ATCC 43037은 5% 열처리한 우태아 혈청

과 0.001% N-acetylmuramic acid를 포함한 NOS배지를 이용하여 혐기성 환경(10% CO₂, 5% H₂, 85% N₂)으로 37°C에서 배양하였다.

2. 외막 당지질 분리

배양된 세균의 침전물을 얻고 LPS extraction kit (iNtRON, Kyunggi Korea)를 이용하여 외막당지질을 분리하였다. 세균 50 ml 배양액에서 1 ml를 1.5 ml 튜브로 옮겨서 세균 수를 측정하고 나머지를 6,000×g, 4°C에서 10분간 원심 분리하여 세균 침전물을 얻었다. 이 침전물에 10 ml의 lysis buffer를 넣고 침전물이 부유될 때까지 vortex하고 2 ml의 chloroform을 넣고 다시 15초간 vortex하였다. 12,000×g에서 15분간 원심 분리하고 상층액을 깨끗한 튜브에 옮긴 후 상층액에 다시 4 ml의 lysis buffer를 넣고 vortex하고 800 μ l의 chloroform을 넣고 15초간 vortex, 12,000×g에서 15분간 원심 분리하였다. 상층액을 깨끗한 튜브로 다시 옮기고, 두 배의 purification buffer를 넣고 -20°C에 20분간 방치한 후 12,000×g에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 75% 에틸알코올을 5 ml 넣고 다시 상층액 제거 후 당지질을 공기 중에 건조하였다. 완전히 건조된 당지질을 내독소 오염이 없는 증류수로 녹이고 동결건조시켜 분리된 당지질은 SDS-PAGE 수행 후에 질산은 염색을 이용하여 확인하였고 단백질과 핵산 오염은 coomassie blue 염색과 agarose gel 전기영동을 이용하여 확인하였다.

3. 막단백질 분리

세균의 막단백질 분리는 세포막을 먼저 파괴하여 세균 내에 있는 물질을 해리되게 하고 다시 막에 있는 단백질을 분리하는 원리로 ProteoExtract™ partial bacterial proteome Extraction kit(Calbiochem, CA, USA)를 이용하였다. 세균 침전물을 Wash buffer로 세척하고 Extraction Reagent 1을 넣고 완전히 부유시키고 유리구슬을 넣고 1분간 vortex한 후 Benzonase[®]를 넣고 흔들어 준 후 13,200×g, 4°C에서 10분간 원심 분리, 상층액을 제거하고 Extraction reagent 2와 Benzonase[®]를 넣고 실온에서 15분간 교반시켰다. 이 튜브를 다시 13,200×g, 4°C에서 10분간 원심 분리 후 상층액(막단백질 추출액)을 깨끗한 튜브로 옮기고 침전물은 Extraction reagent 3을 넣고 실온에서 15분간 교반시킨 후 마지막으로

13,200×g, 4°C에서 10분간 원심 분리 후 상층액을 막단백질 추출액 1이 담긴 튜브에 넣고 단백질의 양을 BCA assay (Pierce, IL, USA)를 이용하여 정량하였다.

4. 세균 수 측정

세균 부유액을 6,000×g에서 10분간 원심 분리하고 다시 생리식염수로 세척한 후 다시 1ml의 생리식염수로 부유시킨 후 10, 100 및 1000배 희석하여 safranin O와 동량 혼합 후 실온에서 5분간 방치하였다. Petroff-Hausser counter chamber(Hausser Scientific Co., PA, USA)를 이용하여 세균 수를 측정하였다.

5. 세포 배양 및 처리

치은섬유아세포는 열처리한 10% 우태아 혈청이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; Gibco, MD, USA) 배지에서 5% CO₂ 혐기성 조건에서 배양하였다. 세포를 단층으로 배양하여 60 mm-diameter dish에 옮긴 후 세포양의 10, 100 및 200배에 해당하는 세균과 세균 물질을 12시간 처리하였다. 또한 치은섬유아세포에 10 μl와 100 μl의 세균 배양액을 12시간 처리하였다. 세포 배양액은 -80°C에 보관하였고 세포는 RNA를 추출하는데 사용하였다.

6. 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응

세균 및 세균 구성 물질과 반응시킨 세포를 TRIzol

(Invitrogen, CA, USA)을 이용하여 RNA를 추출하고, ND-1000(Nanodrop; DE, USA)을 이용하여 RNA 농도를 측정 후, 1μg total RNA를 Maxime™ RT-premix kit(iNtRon Biotechnology, Kyunggi, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA(2 μl)를 Premix Ex Taq, ROX reference Dye(Takara Bio, Otsu, Japan) 및 0.2 μM의 특정 primer와 혼합 후 증폭하였다(Primer sequence는 Table 1과 같다). Real-time PCR의 조건은 ABI PRISM 7500 Sequence Detection System(Applied Biosystems, Darmstadt, Germany)을 이용하여 94°C에서 15초, 60°C에서 15초 및 72°C에서 33초 40 cycle을 수행하였다. 증폭산물의 특이적 반응은 녹는점을 확인하였으며, housekeeping gene으로는 glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)를 이용하였으며 이 유전자를 기준으로 대조군과 대비하여 특정 유전자의 발현 정도를 산출하였다.

7. 효소결합 면역흡수 분석

세균 및 세균 구성물질을 처리한 세포에서 얻은 배양액을 얼음에서 녹이고 vortex 후 4°C, 5,000×g에서 원심 분리하고 상층액을 이용하여 IL-6 및 IL-8 ELISA kit(BD Bioscience, CA, USA)를 이용하여 제조사 용법으로 사이토카인을 측정하였다.

8. 통계분석

모든 실험은 적어도 4번 이상을 독립적으로 반복하였으

Table 1. Primer sequences for real-time PCR

Gene Name		Primer sequences
IL-1β	Forward	5'-AGC TGT ACC CAG AGA GTC C-3'
	Reverse	5'-ACC AAA TGT GGC CGT GGT TT-3'
IL-6	Forward	5'-AAC CTG TCC ACT GGG CAC A-3'
	Reverse	5'-TCT GGC TCT GAA ACA AAG GAT-3'
IL-8	Forward	5'-GTG AAG GTG CAG TTT TGC CA-3'
	Reverse	5'-TCT CCA CAA CCC TCT GCA C-3'
GAPDH	Forward	5'-GTG GTG GAC CTG ACC TGC-3'
	Reverse	5'-TGA GCT TGA CAA AGT GGT C-3'

며, 통계학적 유의성은 SPSS(Ver 12.0, SPSS, USA)를 이용하여 ANOVA와 T-test로 검사하였다. 통계학적 유의성과 p value는 0.05 미만일 때로 하였다.

결과

1. 세균의 영향

T. forsythia 를 치은 섬유아세포에 세포 당 여러 배율의 세균 수(multiplicity of infection; MOI)로 처리하였을 경우 IL-1 β , IL-6 및 IL-8의 발현이 유도되었다(Fig. 1). 세균을 처리하였을 경우 MOI 10에서는 염증성 사이토카인의 발현이 약하게 유도되었으며($p > 0.05$) MOI 100부터 유의성 있게 발현을 많이 유도시켰다($p < 0.05$). 특이하게 IL-1 β 의 경우는 모두 대조군보다 낮게 나타났다. mRNA의 경우 MOI

100에서 가장 높게 나타났으며 MOI 200에서 약간 감소하는 것으로 나타났다. 효소결합 면역흡수 분석의 경우 IL-6에서는 RNA에 비슷한 양상을 보였지만 IL-8의 경우는 MOI 100과 200이 비슷하게 생산되었다.

2. 당지질의 영향

당지질은 세균이 갖고 있는 고유 산물(pathogen associated molecular pattern; PAMP)로 가장 높은 독력을 나타내는 것으로 보고되고 있으며, *T. forsythia* 의 당지질이 치은 섬유아세포에 미치는 영향을 관찰한 결과, 전 세균을 처리한 경우보다 낮은 염증성 사이토카인 발현을 유도하였다(Fig. 2). 통계학적 유의성도 MOI 200에서 나타났으며, 전체적으로 당지질에 의한 치은 섬유아세포의 면역반응은 낮게 나타났다.

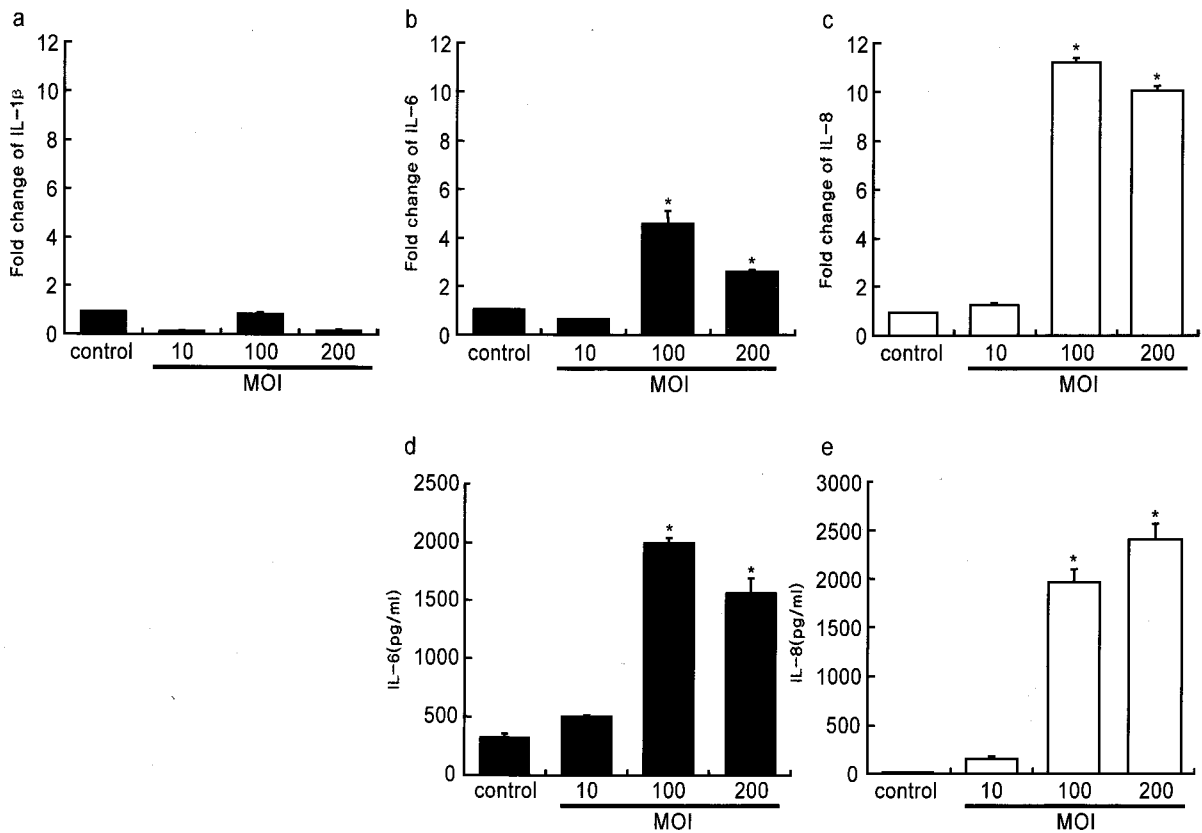


Figure 1. The effect of *T. forsythia* whole bacteria on expression of cytokine HGFs were treated with *T. forsythia* whole cells at various MOI for 12h. RNA was isolated from the HGFs, and the induction of IL-1 β , IL-6, and IL-8 expression was analyzed with real-time PCR (a-c). The production of cytokines in conditioned medium was measured by ELISA (d-e).

* ; $P < 0.05$

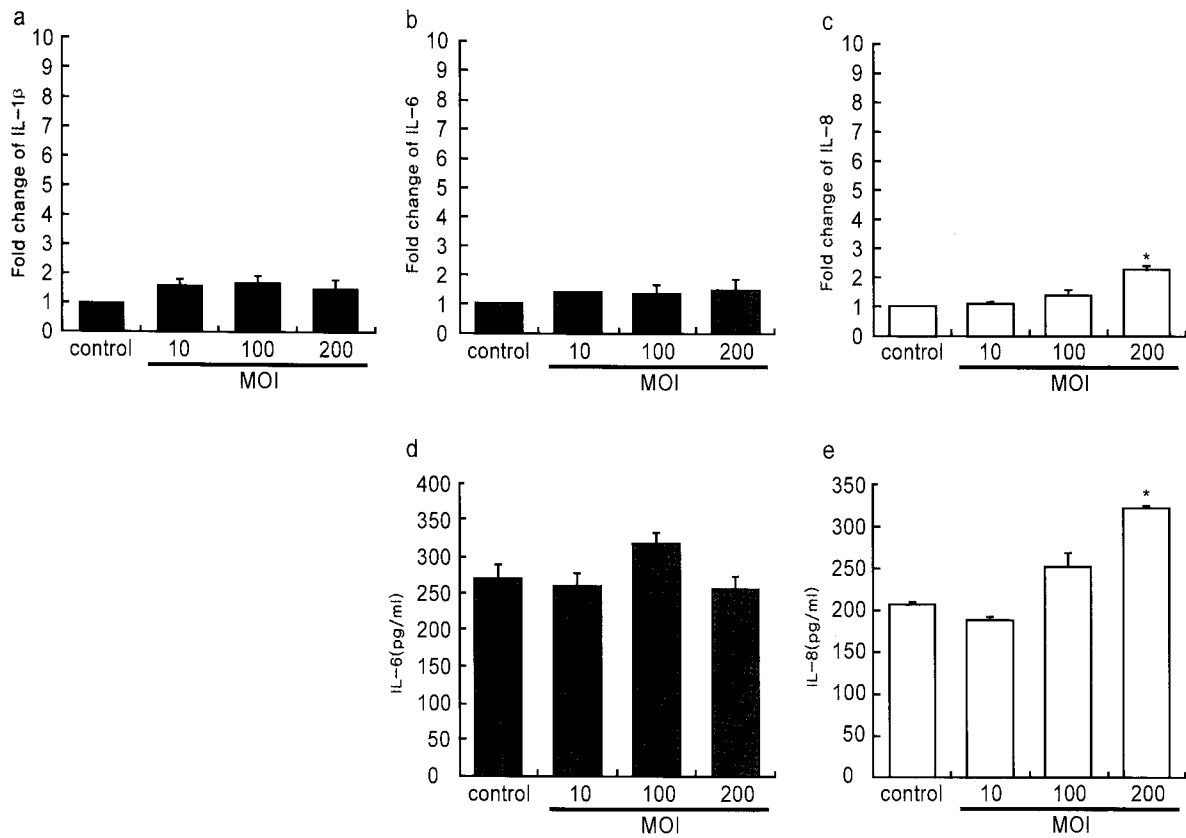


Figure 2. The effect of *T. forsythia* LPS on expression of cytokines HGFs were treated with LPS extracted from *T. forsythia* equivalent to MOI 10, 100 and 200 for 12 h, RNA was isolated from the HGFs, and the induction of IL-1β, IL-6, and IL-8 expression was analyzed with real-time PCR (a-c). The production of cytokines in conditioned medium was measured by ELISA (d-e).

* ; P<0,05

3. 세균 막단백질의 영향

세균과 숙주와의 반응에 있어서 외막에 존재하는 당지질 뿐만 아니라 외막에 존재하는 단백질에 대한 연구도 많이 이루어지고 있다. *T. forsythia*의 막단백질에 대한 치은 섬유아세포의 면역반응을 염증성 사이토카인의 발현 유도로 관찰한 결과 전 세균을 처리하였을 경우와 비슷한 경향을 나타내었다(Fig. 3).

또한 막단백질의 경우 IL-1β를 제외하고 MOI 10에서부터 IL-6과 IL-8의 발현을 유도하였으며, 처리한 양과 비례하여 mRNA 또는 단백질 수준에서 모두 관찰되었다(p <0.05).

4. 세균 배양액의 영향

*T. forsythia*의 경우 BANA 테스트에서 양성을 보여 trypsin-like protease를 분비하는 것으로 보고되었다¹⁴⁾. 따라서 본 연구에서 세균배양 배지를 치은 섬유아세포에 직접 처리하여 면역반응을 관찰하였는데 10 μl 및 100 μl 처리하였을 경우, RT-PCR에서는 대조군에 비하여 유의성 있는 차이를 보이지 않았지만 효소결합 면역흡수 분석 결과에서는 100 μl로 처리하였을 때 IL-6과 IL-8의 발현을 유도하는 것이 관찰되었다(Fig. 4).

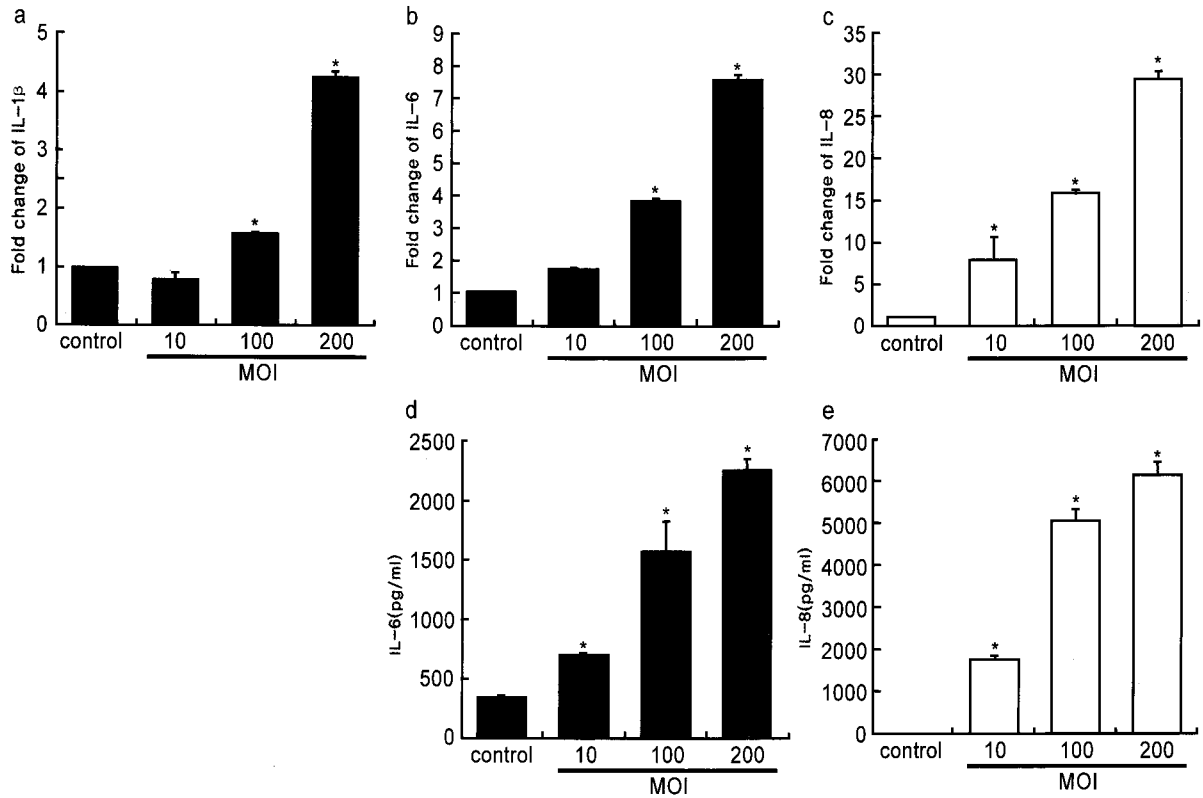


Figure 3. The effect of *T. forsythia* membrane proteins on expression of cytokines HGFs were treated with membrane fraction extracted from *T. forsythia* equivalented to MOI 10, 100 and 200 for 12h. RNA was isolated from HGFs, and the induction of IL-1 β , IL-6, and IL-8 expression was analyzed with real-time PCR (a-c). The production of cytokines in conditioned medium was measured by ELISA (d-e). * ; $P < 0.05$

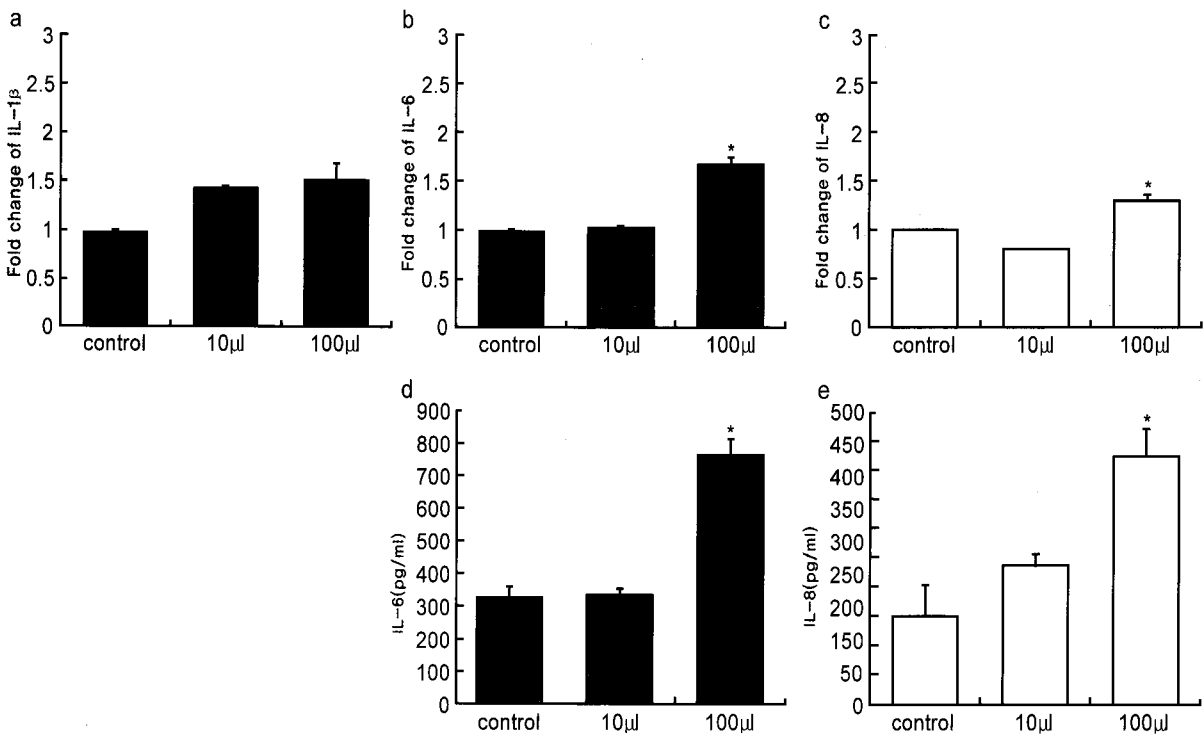


Figure 4. The effect of *T. forsythia* culture medium on expression of cytokines HGFs were treated with culture medium of *T. forsythia* at concentration of 10 and 100 μ l for 12 h. RNA was isolated from HGFs, and the induction of IL-1 β , IL-6, and IL-8 expression was analyzed with real-time PCR (a-c). The production of cytokines in conditioned medium was measured by ELISA (d-e). * ; $P < 0.05$

고찰

치주질환은 치주조직의 파괴와 골 흡수에 의한 치아 손실을 야기하는 주된 구강질환으로 복합 세균 감염에 의하여 발생한다. 이러한 복합 세균 감염의 원인을 밝히기 위해 많은 연구가 시행되었으며, 최근에는 구강 내 바이오필름 형성에 관여하는 세균종간의 상호작용과 부착에 대한 연구가 중점적으로 이루어지고 있다¹⁷⁾. 구강 바이오필름이 형성될 때, 법랑질에 부착이 가능하며 산소가 있어도 성장이 가능한 streptococci 종이 먼저 치은연상에 부착하고, 이렇게 부착된 streptococci 종에 다른 세균들이 순차적으로 붙어 바이오필름이 점차 치은연하 부위로 확대되어 *F. nucleatum* 과 *T. forsythia* 를 매개로 *P. gingivalis*, *T. denticola* 등이 부착하게 된다¹⁸⁻²⁰⁾. Tanner 등⁸⁾은 1975년에 남성 치주 환자에서 Fusobacteria 같은 방추형태의 세균을 동정하였는데 이후 치주질환과 관련성이 높은 *T. forsythia* 로 밝혀졌다⁹⁾. 뒤이은 역학 조사에서 이 세균이 치주질환 환자에게서 *P. gingivalis* 와 함께 종종 동정되었으며, 고령의 환자에서 두 종의 집락이 증가하는 것이 관찰되었다^{9,21,22)}. 또한 Socransky 등은 이 두 세균뿐만 아니라 *T. denticola* 가 역시 치주질환과 관련이 높은 세균 그룹으로 정하고 이를 “Red complex”로 명명하였다⁵⁾. 이 세균 중 배양이 상대적으로 용이한 *P. gingivalis* 에 대해서 많은 연구가 이루어지고 있으며, 이 세균의 독력인자를 나타내는 여러 물질에 대한 연구도 많이 이루어지고 있다⁹⁻¹²⁾.

T. forsythia 에 대한 연구는 아직 초기 단계이며 세균의 당단백질(lipoprotein)에 대한 몇몇 연구만 보고되고 있는 실정이며, 이 당단백질에 의해서 섬유아세포와 단핵세포주에서 IL-6과 TNF- α 의 발현이 유도되는 것이 관찰되었다¹⁵⁾. 당단백질은 숙주에서 toll-like receptor-2를 통해서 인지되며 nuclear factor kappaB를 통해서 염증성 사이토카인을 발현시키는 것으로 보고되었다²³⁾. 하지만 아직까지 *T. forsythia* 를 숙주세포에 처리하여 면역반응을 관찰한 연구는 없었으며, 또한 *T. forsythia* 와 외막의 구성성분에 대한 면역반응을 비교한 연구도 없었다. 본 연구에서는 *T. forsythia* 에 대한 치은 섬유아세포의 염증 관련요소를 관찰한 후, 이 세균의 외막 성분 중 당지질(LPS)과 단백질을 추출하고 세균을 배양했던 배지를 치은 섬유아세포에 처리하여 전 세균(whole bacteria)과 비슷한 경향을 나타내는 구성성

분을 찾음으로써 *T. forsythia* 의 독력인자를 밝히고자 하였다.

본 연구에서 치은 섬유아세포 대비 세균 수(MOI)를 10, 100 및 200배로 처리하였는데, 세균막 구성성분을 추출하는 경우에도 세균 수를 측정하고 추출물의 양을 세균 수에 해당하는 양으로 환산하여 처리하였다. 세균 수의 산출과정에서 오차가 발생할 가능성은 존재하나 그 값이 크지 않을 것이다. 또한 현재까지 대부분의 연구에서는 세균으로부터의 추출물을 질량단위로 처리하여 숙주세포의 반응을 관찰하였지만 본 연구에서는 추출물의 질량을 구강에 실제로 존재 가능한 세균 수에 해당하는 단위로 환산하여 숙주세포의 반응을 관찰하여 독력인자를 조사하였다는 것이 차별화된 점이다. 세균을 치은 섬유아세포에 직접 처리한 경우 MOI 10에서는 염증성 사이토카인의 발현이 나타나지 않았으며, MOI 100부터 염증성 사이토카인의 발현이 유도된 것을 관찰하였다. 특이한 점은 IL-6과 IL-8의 발현은 유도되었지만 IL-1 β 의 발현은 유도되지 않았다는 것이다. 그 이유에 대해서는 향후 심화된 연구가 필요할 것이다. 이러한 반응은 세균의 당지질에 의해서는 유도되지 않았으며, 기존에 당지질의 수용체로 알려진 toll-like receptor(TLR) 2, 4에 대해서도 CHO/CD14/TLR4 및 CHO/CD14/TLR2를 이용하여 확인한 결과 생물학적 활성이 나타나지 않았다(결과값 밝히지 않음). 세균 막단백질의 경우 전 세균의 경우와 유사하게 그 양이 증가할수록 IL-6과 IL-8의 발현유도 또한 증가하는 것이 관찰되었고 IL-1 β 의 경우는 전 세균에서는 발현 유도가 되지 않았지만 세균 막단백질에서는 발현이 유도되는 것이 관찰되었다. 이는 세균막에서 표출되어 있는 epitope 부분이 치은 섬유아세포에 영향을 미치는 것이 아니라 세균막에 싸여져 있는 부분에 의해서 반응이 유도되거나 막단백질 추출과정에서 단백질의 삼차구조가 변하여 반응의 차이가 나타난 것으로 생각된다. 마지막으로 세균 배양액을 치은 섬유아세포에 처리하여 세포활성 반응을 보았는데 세균배양액의 경우는 10 μ l에서는 반응을 나타내지 않았으며 100 μ l에서 mRNA 수준에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았지만 단백질 수준에서는 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다. 그러나 전 세균을 처리한 경우와 양적인 차이를 비교하였을 때 더 적은 양으로 유도되는 것을 알 수 있었다.

여러 가지 세균 추출물과 세균 배양액의 독력을 비교한 실험에서 *T. forsythia* 의 독력인자는 세균막에 존재하는 단백질인 것으로 보인다. 또한 *T. forsythia* 는 치주질환을 유

발하는 구강 내 바이오필름 형성과정 중 타 세균과의 부착에 의해 질병의 진행에 관여하므로 독립인자에 대한 보다 많은 연구가 필요할 것이다.

참고문헌

- Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet* 2005;366:1809-1820.
- Loomer PM. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Periodontol 2000* 2004;34:49-56.
- Timmerman MF, van der Weijden GA. Risk factors for periodontitis. *Int J Dent Hyg* 2006;4:2-7.
- Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000* 2005;38:135-187.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25:134-144.
- Nelson KE, Fleischmann RD, DeBoy RT, et al. Complete genome sequence of the oral pathogenic Bacterium *Porphyromonas gingivalis* strain W83. *J Bacteriol* 2003;185:5591-5601.
- Seshadri R, Myers GS, Tettelin H, et al. Comparison of the genome of the oral pathogen *Treponema denticola* with other spirochete genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:5646-5651.
- Tanner AC, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA, Socransky SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J Clin Periodontol* 1979;6:278-307.
- Yang HW, Huang YF, Chou MY. Occurrence of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontally diseased and healthy subjects. *J Periodontol* 2004;75:1077-1083.
- Kapatral V, Anderson I, Ivanova N, et al. Genome sequence and analysis of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* strain ATCC 25586. *J Bacteriol* 2002;184:2005-2018.
- Ikegami A, Honma K, Sharma A, Kuramitsu HK. Multiple functions of the leucine-rich repeat protein LrrA of *Treponema denticola*. *Infect Immun* 2004;72:4619-4627.
- Hajishengallis G, Martin M, Sojar HT, et al. Dependence of bacterial protein adhesins on toll-like receptors for proinflammatory cytokine induction. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:403-411.
- Onishi S, Honma K, Liang S, et al. Toll-like receptor 2-mediated interleukin-8 expression in gingival epithelial cells by the *Tannerella forsythia* leucine-rich repeat protein BspA. *Infect Immun* 2008;76:198-205.
- Takaishi Y, Morii H, Miki T. The benzoyl-DL arginine-naphthylamide (BANA) test and polymerase chain reaction measurement of pathogenic bacteria can assess the severity of periodontal disease. *Int J Tissue React* 2003;25:19-24.
- Hasebe A, Yoshimura A, Into T, et al. Biological activities of *Bacteroides forsythus* lipoproteins and their possible pathological roles in periodontal disease. *Infect Immun* 2004;72:1318-1325.
- Bodet C, Chandad F, Grenier D. Inflammatory responses of a macrophage/epithelial cell co-culture model to mono and mixed infections with *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*. *Microbes Infect* 2006;8:27-35.
- Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000* 2002;28:12-55.
- Welin J, Wilkins JC, Beighton D, Svensater G. Protein expression by *Streptococcus mutans* during initial stage of biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:3736-3741.
- Nishihara T, Koseki T. Microbial etiology of periodontitis. *Periodontol 2000* 2004;36:14-26.
- Sharma A, Inagaki S, Sigurdson W, Kuramitsu HK. Synergy between *Tannerella forsythia* and *Fusobacterium nucleatum* in biofilm formation. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:39-42.
- Tanner AC, Socransky SS, Goodson JM. Microbiota of periodontal pockets losing crestal alveolar bone. *J Periodontol Res* 1984;19:279-291.
- Tanner A, Maiden MF, Macuch PJ, Murray LL, Kent RL, Jr. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol* 1998;25:85-98.
- Into T, Nodasaka Y, Hasebe A, et al. Mycoplasmal lipoproteins induce toll-like receptor 2- and caspases-mediated cell death in lymphocytes and monocytes. *Microbiol Immunol* 2002;46:265-276.