

Labeling of oral spirochetes with fluorescent fatty acids

Jin Hong^{1,2,3}, Kyu Joong Kim³ and Si Young Lee^{1,2*}

¹Department of Oral Microbiology, College of Dentistry, ²Research Institute of Oral Science, and ³Department of Biology, Kangnung National University, Kangnung, 210-702, Korea

(Received May 14, 2008 ; Revised June 10, 2008 ; Accepted June 13, 2008)

Oral spirochetes are anaerobes known as one of causative agents for periodontal diseases. In this study, we investigated the possibility of utilizing fluorescent fatty acids for labeling oral spirochetes. Bacterial labeling was standardized with three different lengths of fluorescent fatty acids: 5-octadecanoylamino fluorescein (OAF), 5-dodecanoylamino fluorescein (DAF), and 5-hexadecanoylamino fluorescein (HAF). Among these fatty acids, OAF showed the best labeling activity. *Treponema denticola* ATCC 35405 was totally saturated to the maximum when incubated with OAF 1 µg/ml for 1 hour. *Treponema vincentii* LA-1 also increased in fluorescence in proportion to incubation time length and the concentration. In conclusion, these findings showed the possibility that the fluorescent fatty acid can be used for labeling oral spirochetes.

Key words: treponema, fatty acid, labeling

서 론

Spirochetes는 나선형 형태를 가진 혐기성 세균으로 비뇨기계의 *Treponema pallidum*은 매독을 일으키며 구강 spirochetes는 치주질환의 원인세균 중 하나로 알려져 있다(Page *et al.*, 1978; Sela, 2001). 이들은 배양이 쉽지 않으며, 표현형의 분석과 분류에 있어서도 많은 어려움이 있다(Dewhirst *et al.*, 2000; Paster *et al.*, 2001). 특히 구강 spirochetes는 구강내 치주 병소에서 *Porphyromonas gingivalis*와 *Tannerella forsythensis*와 같은 그람 음성균과

*Corresponding author: Si Young Lee, Department of Oral Microbiology, College of Dentistry, Research Institute of Oral Science, Kangnung National University, Kangnung, 210-702, Korea. Tel.: +82-33-640-2455, Fax: +82-33-642-6410, E-mail: siyoung@kangnung.ac.kr

함께 치주조직의 파괴를 일으켜 심각한 치주질환을 일으킨다(Socransky *et al.*, 1998).

세균부착 실험 등에서 세균 표지를 위하여 일반적으로 방사선동위원소로 세균을 labeling하거나 세균에 대한 항체를 사용하는 방법 등이 이용되어 왔다(Lee *et al.*, 2001). 그러나 방사선동위원소를 취급하는데 많은 불편함이 따르며, 세균에 대한 항체를 생산하는데 시간과 비용이 많이 드는 단점이 있다.

Cox와 Radolf(Cox and Radolf, 2001)는 최근 연구에서 형광 지방산을 이용하여 *T. pallidum*과 *Borrelia burgdorferi*의 외막을 labeling 할 수 있음을 보고하였다. 본 실험에서는 치주 질환 원인 세균중 하나인 구강 spirochetes를 대상으로 탄화수소 사슬의 길이가 서로 다른(C12, C16 그리고 C18; Fig 1) 친 지질성 형광 지방산을 이용해 세균 labeling 가능성 여부를 조사하고 labeling 방법을 표준화하였다.

재료 및 방법

세균배양

본 실험에서는 구강 spirochetes인 *Treponema denticola* ATCC 35405, *Treponema vincentii* LA-1을 사용하였고 대조균으로 *Escherichia coli* 89E14를 사용하였다. 구강 spirochetes는 0.2% thiamine pyrophosphate, 10% sodium bicarbonate, 1% serum 그리고 0.2% fatty acid가 첨가된 NOS (new oral spirochete)배지와 0.5% fatty acid, 0.5% thiamine pyrophosphate 그리고 10%의 serum이 첨가된 TYGVS (tripitcise-yeast-glucose-volatile fatty acids-serum)배지에 접종하였으며 90% N₂, 5% CO₂ 그리고 5%의 H₂가 있는 36°C 혐기성 배양기(Sheldon manufacturing, INC, USA)에서 48시간(log phase) 동안 배양

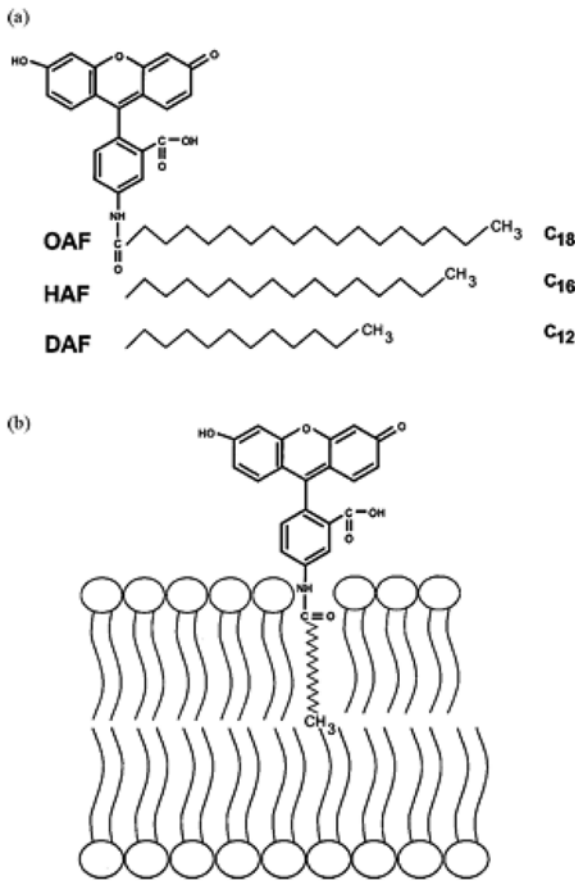


Fig. 1. Structure of fatty acids used in this experiment. (a) Structures of the C₁₈, C₁₆ and C₁₂ FA-5-aminofluorescein conjugates: octadecylaminofluorescein (OAF)-C18, hexadecylaminofluorescein (HAF)-C16 and dodecylaminofluorescein (DAF)-C12. (b) Topology following membrane insertion (adapted from the Molecular Probes website, <http://www.probes.com>) (Cox and Radolf, 2001).

하여 실험에 사용하였다. 대조군으로 사용된 *E. coli* 89E14는 BHI 배지에 접종하여 36°C 일반 배양기에서 18시간 배양하여 사용하였다.

형광 지방산

지방산인 5-octadecanoylamino fluorescein (OAF), 5-dodecanoylamino fluorescein (DAF)와 5-hexadecanoylamino fluorescein (HAF) (Molecular probe, Eugene, Oregon, USA)를 각각 Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo, USA)에 1 µg/ml로 녹인 뒤 4°C에서 빛을 차단한 상태로 보관하였다. 사용시 고체상태인 형광 지방산을 실온에서 서서히 녹여 실험에 사용하였다(Cox and Radolf, 2001).

형광 지방산을 이용한 labeling의 표준화

형광 지방산을 이용하여 구강 spirochetes를 labeling하는 방법을 표준화하기 위하여 NOS 배지에서 배양한 *T.*

denticola ATCC 35405와 TYGVS에서 배양한 *T. vincentii* LA-1을 실험군으로, *E. coli* 89E14는 음성 대조군으로 사용하였다.

1) 형광 지방산의 농도가 세균 labeling에 미치는 영향
 형광 지방산을 상온에서 녹인 뒤 세균의 log-phase 단계에서 세균 배양매지에 0 µg/ml에서 4 µg/ml까지 농도별로 첨가하여 한 시간 동안 36°C 혐기성 배양기에서 배양 후 PBS로 세균을 두 번 세척하였다. 세척 후 PBS로 현탁하여 흡광도를 660 nm에서 0.2(5 × 10⁸/ml)로 모두 동일하게 맞춘 뒤 fluorescent spectrophotometer (F4500, HITACHI, Tokyo Japan)로 형광을 측정하여 labeling 정도를 측정하였다. Fluorescent spectrophotometer F4500의 메뉴에서 Time Scan을 선택하여 30초 지점에서의 형광을 측정하였으며 세 가지 형광 지방산 측정 파장은 아래와 같다.

	여기파장 (nm)	방출파장 (nm)
OAF	497	519
HAF	497	519
DAF	495	518

2) 배양시간에 따른 세균 labeling에의 영향

세균의 형광 labeling을 위한 배양시간을 정하기 위하여 세균의 log-phase 단계에 각각의 형광 지방산을 1 µg/ml로 첨가하여 배양하며 일정시간 간격으로 세균을 얻은 후 PBS로 2회 세척한 다음 흡광도를 0.2로 맞춘 뒤 형광을 측정하였다.

3) 세균 세척횟수에 따른 영향

형광 지방산이 세균의 외막 안으로 안정적으로 삽입되었는지를 확인하기 위하여 *T. denticola* ATCC 35405를 배양 후 log-phase 단계에서 1 µg/ml의 OAF를 첨가하여 한 시간 동안 배양 한 다음 4회까지의 세척 횟수에 따른 형광 변화를 측정하였다.

4) 배양온도의 영향

배양온도에 따른 형광 labeling의 변화를 측정하기 위하여 *T. denticola* ATCC 35405를 배양 후 log-phase 단계에서 1 µg/ml의 OAF를 첨가하여 4°C, 25°C 그리고 36°C 온도에서 한 시간 동안 배양한 후 세균을 PBS로 2회 세척한 다음 흡광도를 0.2로 맞춘 뒤 각각 형광을 측정하였다.

5) Labeling된 세균의 형태관찰

세균의 형광 지방산 labeling 여부를 직접 관찰하기 위하여 형광현미경으로 관찰하였다. OAF로 labeling된 *T. denticola* ATCC 35405와 *E. coli* 89E14를 각각 비교 관찰하였다. *T. denticola* ATCC 35405와 *E. coli* 89E14를 한 시간 동안 36°C에서 OAF 1 µg/ml로 labeling 후 PBS로 두 번 세척하였다. 형광 현미경은 암시야가 장착되지 않은 Nikon Optiphot (Nikon, ECL IPSE E600,

Japan)를 사용하여 497 nm로 관찰하였으며, 형광 현미경에 설치된 Nikon 카메라로 ISO 800, 셔터속도 간격은 3초로 하여 촬영하였다.

결 과

T. denticola ATCC 35405를 대상으로 형광 지방산인 5-octadecanoylamino fluorescein (OAF), 5-dodecanoylamino fluorescein (DAF)와 5-hexadecanoylamino fluorescein (HAF)

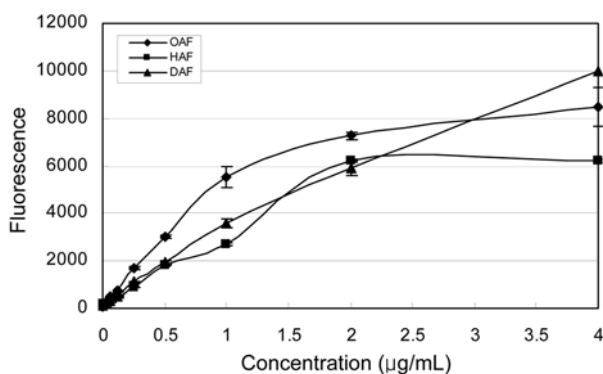


Fig. 2. Labeling of *T. denticola* ATCC 35405 with fluorescent fatty acids. Fluorescent fatty acid of various concentration from 0 µg/ml to 4 µg/ml was added into log-phase *T. denticola* ATCC 35405, which was further cultivated in an anaerobic incubator at 36°C for 1 hour. Bacteria were washed twice with PBS and adjusted to 0.2 in absorbance at 660 nm. The fluorescence intensity of each specimen was measured with a fluorescent spectrophotometer. Values indicate means of duplicate determinations; standard errors of the mean are indicated by vertical lines. The unit of Y axis is relative fluorescence unit (RFU).

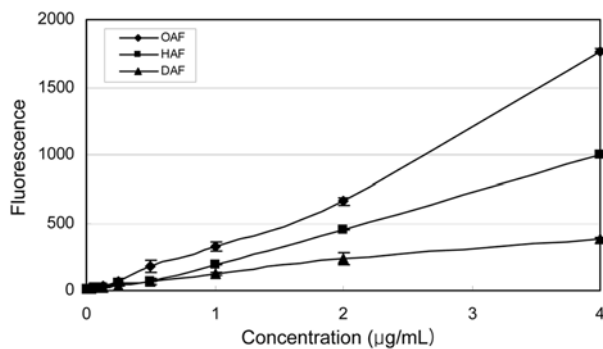


Fig. 3. Labeling of *T. vincentii* LA-1 with fluorescent fatty acids. Fluorescent fatty acid of various concentration from 0 µg/ml to 4 µg/ml was added into log-phase *T. vincentii* LA-1, which was further cultivated in an anaerobic incubator at 36°C for 1 hour. Bacteria were washed twice with PBS and adjusted to 0.2 in absorbance at 660 nm. The fluorescence intensity of each specimen was measured with a fluorescent spectrophotometer. Values indicate means of duplicate determinations; standard errors of the mean are indicated by vertical lines. The unit of Y axis is relative fluorescence unit (RFU).

의 labeling에 필요한 적정농도를 찾기 위하여 다양한 농도로 labeling하여 비교 실험하였다. 세 가지의 형광 지방산 모두 *T. denticola* ATCC 35405에 labeling이 되었으며, DAF를 제외한 OAF와 HAF는 농도가 증가됨에 따라 최대치에 도달하여 완전히 포화되었음을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 반면 DAF의 경우 형광 수치가 4 µg/ml의 농도까지 형광 지방산의 농도 증가에 비례하여 세균의 labeling 정도도 계속 증가하였다(Fig. 2).

T. vincentii LA-1의 경우 세 가지 형광 지방산 모두 labeling의 정도가 *T. denticola* ATCC 35405에 비해 현저히 낮음을 관찰할 수 있었으며, 세 가지 형광 지방산 중 OAF가 가장 잘 labeling이 되는 것으로 조사되었다. 세 가지 형광 지방산 모두 농도 증가에 따라 *T. vincentii* LA-1에 labeling된 형광 수치도 계속 증가하였다(Fig. 3).

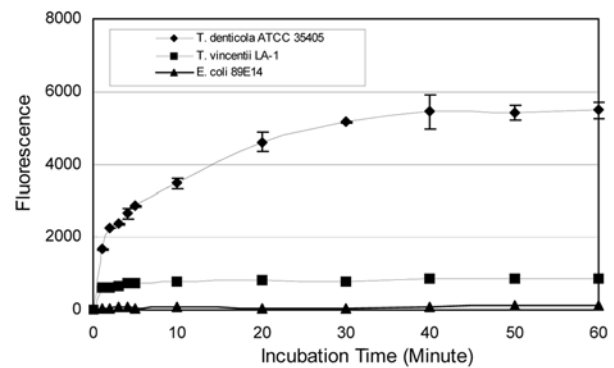


Fig. 4. Labeling of *T. denticola* ATCC 35405, *T. vincentii* LA-1, and *E. coli* 89E14 with OAF. While incubated with OAF, the bacteria samples were obtained at given intervals. Bacteria were washed twice with PBS and adjusted to 0.2 in absorbance at 660 nm. The fluorescence intensity of each specimen was measured with a fluorescent spectrophotometer. Values indicate means of duplicate determinations; standard errors of the mean are indicated by vertical lines. The unit of Y axis is relative fluorescence unit (RFU).

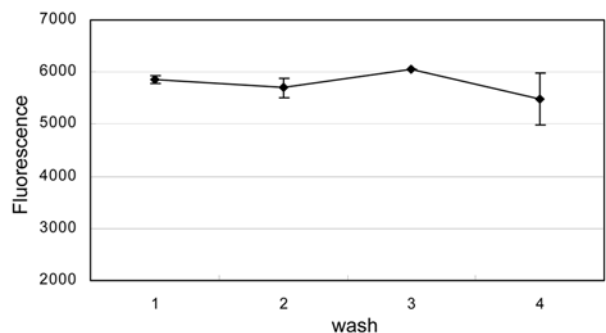


Fig 5. Effect of washing times on the fluorescence of OAF-labeled *T. denticola* ATCC 35405. Labeled bacteria were washed with PBS upto 4 times, and at each wash, The fluorescence intensity was measured to investigate the changes in fluorescence by washing time. Values indicate means of duplicate determinations; standard errors of the mean are indicated by vertical lines. The unit of Y axis is relative fluorescence unit (RFU).

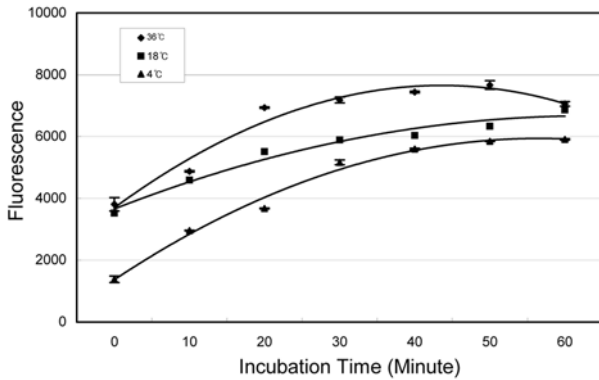


Fig 6. Effects of incubation temperature on OAF-labeling of *T. denticola* ATCC 35405. OAF was added in log-phase *T. denticola* ATCC 35405 culture and incubated for 1 hour at 4°C, 25°C, 36°C respectively. Bacteria were washed twice with PBS and adjusted to 0.2 in absorbance at 660 nm. The fluorescence intensity of each specimen was measured with a fluorescent spectrophotometer. Values indicate means of duplicate determinations; standard errors of the mean are indicated by vertical lines. The unit of Y axis is relative fluorescence unit (RFU).

반면 *E. coli* 89E14의 경우 형광 수치가 100이하로 측정되어 형광 지방산이 *E. coli* 89E14에 labeling이 되지 않는 것으로 확인되었다(data not shown). 앞의 실험결과를 토대로 세 가지 형광 지방산 중에서 구강 spirochetes에 잘 labeling되는 것으로 여겨지는 OAF를 선택하여 이후의 실험에서는 OAF만을 가지고 실험을 진행하였으며, 1 µg/ml의 농도를 적정 농도로 정하여 이후의 실험에서는 OAF를 1 µg/ml로 사용하였다.

세 종의 세균을 대상으로 배양 시간에 따른 OAF의 labeling 정도를 비교한 결과 *T. denticola* ATCC 35405의 경우 5분까지 급격하게 labeling 정도가 증가하다가 30분 이후에는 완전히 포화되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). *T. denticola* ATCC 35405에 비해 현저히 낮은 형광 수치를 나타낸 *T. vincentii* LA-1의 경우 5분 이내에 급격하게 증가하다가 더 이상 증가하지 않는 것으로 나타났다. 반면 *E. coli* 89E14에서는 한 시간 배양 후에도 labeling이 되지 않는 것으로 관찰되었다(Fig. 5).

형광 지방산인 OAF가 세균의 외막 내부로 안정적으로 삽입이 되었는지 조사하기 위해 *T. denticola* ATCC 35405를 1 µg/ml의 OAF로 한 시간 동안 36°C 혐기성 배양기에서 labeling 한 후 1회에서 4회까지 세척 횟수에 따른 형광 변화를 조사하였다. 세척 횟수에 따라 형광의 변화는 크게 차이를 나타내지 않았다(Fig. 5). 이러한 결과는 친 지질성 분자인 OAF가 외막에 단순히 묻어있는 것이 아니라 소수성인 내막으로 안정적으로 침투했음을 보여준다. 배양 온도에 따른 OAF labeling 실험에서 36°C에서 가장 labeling이 잘되는 것으로 관찰되었다. 비록 36°C와 25°C에 비해 낮은 수치이긴 하지만 4°C

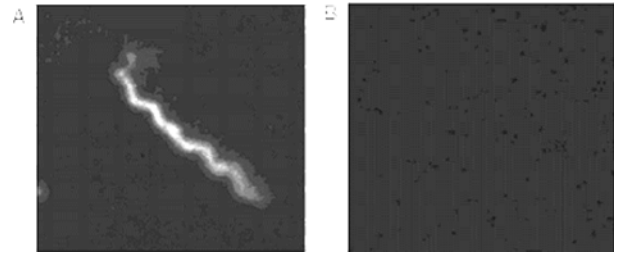


Fig 7. Observation of OAF-labeled *T. denticola* ATCC 35405 with Fluorescent microscope. OAF-labeled *T. denticola* ATCC 35405 (A) and the *E. coli* 89E14 (B) were compared. *T. denticola* ATCC 35405 and *E. coli* 89E14 were labeled with 1 µg/ml OAF at 36°C for 1 hour, and then washed out twice with PBS.

에서도 labeling이 되는 것으로 조사되었다(Fig. 6).

OAF로 labeling된 세균의 형태는 형광현미경으로 관찰하였다. 형광 497 nm로 100배 관찰 시 OAF로 labeling된 *T. denticola* ATCC 35405의 형태를 관찰할 수 있었으나 OAF로 labeling한 *E. coli* 89E14의 경우는 형태가 관찰되지 않는 것으로 보아 labeling이 되지 않았음을 확인할 수 있었다(Fig. 7).

고 찰

본 연구에서는 구강 spirochetes의 외막으로 형광 지방산을 삽입하는 방법을 이용하여 세균의 labeling법을 개발하고 표준화하였다. 형광 지방산인 OAF, HAF 그리고 DAF 중 탄화수소의 길이가 가장 긴 OAF가 *T. denticola* ATCC 35405와 *T. vincentii* LA-1의 labeling에 가장 효과적인 것으로 나타났다. *T. denticola* ATCC 35405와 *T. vincentii* LA-1은 세 가지 형광 지방산 모두 labeling이 되는 것으로 나타났으나 TYGVS에서 배양한 *T. vincentii* LA-1에 비해 NOS에서 배양한 *T. denticola* ATCC 35405의 형광의 수치가 훨씬 크게 관찰되었다. *T. denticola* ATCC 35405를 NOS와 TYGVS에 각각 배양하여 비교한 결과 NOS에서 배양한 경우가 TYGVS에 배양한 경우 보다 더 높게 labeling됨을 관찰할 수 있었다(data not shown). 그러나 *T. vincentii* LA-1은 NOS 배지에서는 잘 자라지 않아 배지의 차이에 따른 labeling 정도의 차이는 비교할 수 없었다. 본 연구에서는 형광 지방산인 OAF를 사용하여, 외막의 소수성 부분까지의 삽입을 확인하기 위하여, 4회에 걸친 세척 횟수에 따른 실험을 하였다. 세척에 따른 형광의 수치가 차이가 없는 것으로 보아 형광 지방산이 세균의 외막에 단순히 묻어있는 것이 아니라 소수성인 막 안으로 안정적으로 삽입했음을 알 수 있었다. 형광 지방산이 지질 이중층 안으로 활성화되어 침투하는 증거는 배양온도에 따른 형광 변화에서도 찾을 수 있었다. 36°C에서 가장 잘 labeling이 되

는 것으로 관찰되는 것은 지질 이중층이나 온전한 세포막의 물리적인 구조가 낮은 온도에서는 매우 질서가 잡힌 gel 상태로 존재하는데 이보다 높은 온도에서는 보다 무질서한 액상결정상태(liquid crystalline)로 온도가 올라감에 따라 체적이 늘어나며 분자 당 면적이 팽창하고 분자 운동이 증가하여 비극성 용매에 대한 용해도가 증가하는 결과로 생각된다.

*T. pallidum*과 *B. burgdorferi*를 이용한 Cox and Radolf (Cox and Radolf, 2001)의 실험에서도, 본 실험에서와 유사한 농도인 약 2.0 µg/ml의 OAF 농도에서 *T. pallidum*과 *B. burgdorferi* 모두 완전하게 labeling되는 것으로 관찰 되었다. 여러 연구에 따르면 *T. pallidum*과 *B. burgdorferi*는 다른 그람 음성 세균과 외막의 단백질과 지질의 성분에서 차이를 보인다고 알려져 있다(Belisle et al., 1994; Radolf et al., 1995a; Radolf et al., 1995b; Cox et al., 1992). 그중 한가지 주된 차이점은 이들 두 세균은 다른 그람 음성 세균들과는 달리 lipopolysaccharide (LPS)를 지니고 있지 않다는 것이다(Fraser et al., 1998; Fraser et al., 1997; Radolf et al., 1995a; Radolf et al., 1995b). LPS는 permeability barrier를 형성하여 소수성 물질들이 그람음성 세균의 외막속으로 침투하는 것을 제한한다.

Cox와 Radolf(Cox and Radolf, 2001)는 *T. pallidum*과 *B. burgdorferi*와 *E. coli*의 소수성 물질에 대한 상대적인 투과성을 조사하였다. 이들의 연구에 의하면 실제로 *T. pallidum*과 *B. burgdorferi*는 LPS를 지니고 있지 않아 이들 세균의 외막은 다른 그람 음성 세균들에 비하여 소수성 물질들이 더 쉽게 침투된다고 보고하고 있다. 몇몇 연구는 treponema종에서 LPS가 발견된다고 보고하고 있으며(Beck et al., 1985; Greer and Wannemuehler, 1989; Wannemuehler et al., 1988) 다른 연구자들은 이 구조물을 lipo-oligosaccharide로 분류하고 있고(Bronz et al., 1991; Livesley et al., 1993; Yotis et al., 1993) Schultz 등의 연구에 따르면 *T. denticola*는 새로운 종류의 외막 lipid를 지니고 있는 것으로 보고하고 있다(Schultz et al., 1998). 하지만 긴 사슬의 지방산이 *T. denticola*에 침투할 때 *T. pallidum*과 *B. burgdorferi*의 경우에서처럼 LPS를 지니고 있지 않아서 더 용이하게 labeling이 되는지에 대해서는 아직 확실하지 않다.

*T. pallidum*과 *B. burgdorferi*의 genome에는 알려진 fatty acid transporter를 만들 수 있는 유전자가 존재하지 않는다고 알려져 있으며(Fraser et al., 1997; Fraser et al., 1998) 이 두 세균은 long-chain fatty acid의 외막 운반을 위하여 다른 종류의 기전이 필요하다고 여겨지고 있다. 이들은 *T. pallidum*과 *B. burgdorferi*가 필수 영양소인 지방산을 외막을 통한 passive diffusion에 의하여 획득하는 것으로 추정하고 있다. 또한 이들은 *T. pallidum*의 경우 짧은 길이의 지방산이 긴 사슬의 지방

산보다 침투하기 어려운 이유는, 인체에 존재하는 가장 많은 fatty acid가 oleic acid (C18), palmitic acid (C18), linoleic acid (C16)으로(Cox and Radolf, 2001) 이들의 섭취를 위하여 환경에 적응한 결과로 설명하고 있으며 구강 spirochete의 경우에도 같은 이유로 설명될 수 있을 것으로 생각된다. 구강 spirochete에도 긴 사슬의 지방산의 외막 운반을 위한 transporter가 존재하는지의 여부는 좀 더 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

본 연구를 통하여 긴 사슬의 지방산이 구강 spirochete도 labeling 시킬 수 있음을 보였으며, 구강 spirochete의 형광지방산 labeling 방법을 표준화할 수 있었다. 본 실험의 연구 결과는 형광지방산을 이용하여 쉽게 구강 spirochetes도 표지 할 수 있음을 보였고, 표준화된 labeling 방법은 oral spirochete의 부착 실험 등에 다양한 용도로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Beck, G., Habicht, G.S., Benach, J. L. and Coleman, J. L.: Chemical and biologic characterization of a lipopolysaccharide extracted from the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*). *J. Infect. Dis.* **152**: 108-117, 1985.
- Belisle, J. T., Brandt, M. E., Radolf, J.D. and Norgard, M.V.: Fatty acids of *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins. *J. Bacteriol.* **176**: 2151-2157, 1994.
- Bronz, I., Fiehn, N.E., Olsen, I. and Sjostrom, M.: Multivariate analyses of cellular fatty acids and carbohydrates of 1:2:1 and 2:4:2 spirochetes. *APMIS.* **99**: 567-575, 1991.
- Cox, D.L., Chang, P., McDowall, A.W. and Radolf, J. D.: The outer membrane, not a coat of host proteins, limits antigenicity of virulent *Treponema pallidum*. *Infect. Immun.* **60**: 1076-1083, 1992.
- Cox, D.L. and Radolf, J.D.: Insertion of fluorescent fatty acid probes into the outer membranes of the pathogenic spirochaetes *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi*. *Microbiology.* **147**: 1161-1169, 2001.
- Dewhirst, F.E., Tamer, M.A., Ericson, R.E., Lau, C.N., Levanos, V.A., Boches, S.K., Galvin, J.L. and Paster, B.J.: The diversity of periodontal spirochetes by 16S rRNA analysis. *Oral Microbiol. Immunol.* **15**: 196-202, 2000.
- Fraser, C. M., Casjens, S., Huang, W. M., Sutton, G. G., Clayton, R., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K. A., Dodson, R., Hickey, E. K., Gwinn, M., Dougherty, B., Tomb, J. F., Fleischmann, R. D., Richardson, D., Peterson, J., Kerlavage, A. R., Quackenbush, J., Salzberg, S., Hanson, M., van Vugt, R., Palmer, N., Adams, M. D., Gocayne, J., Weidman, J., Utterback, T., Wathley, L., McDonald, L., Artiach, P., Bowman, C., Garland, S., Fuji, C., Cotton, M.D., Horst, K., Roberts, K., Hatch, B., Smith, H.O. and Venter, J.C.: Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature.* **390**: 580-586, 1997.
- Fraser, C. M., Norris, S. J., Weinstock, G. M., White, O., Sutton, G.G., Dodson, R., Gwinn, M., Hickey, E. K.,

- Clayton, R., Ketchum, K. A., Sodergren, E., Hardham, J. M., McLeod, M. P., Salzberg, S., Peterson, J., Khalak, H., Richardson, D., Howell, J. K., Chidambaram, M., Utterback, T., McDonald, L., Artiach, P., Bowman, C., Cotton, M. D., Fujii, C., Garland, S., Hatch, B., Horst, K., Roberts, K., Sandusky, M., Weidman, J., Smith, H.O. and Venter, J. C.: Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science*. **281**: 375-388, 1998.
- Greer, J.M. and Wannemuehler, M.J.: Comparison of the biological responses induced by lipopolysaccharide and endotoxin of *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens*. *Infect. Immun.* **57**: 717-723, 1989.
- Lee, S.Y., Kim, K.K. and Choe, S.J.: Binding of oral streptococci to human fibrinogen. *Oral Microbiol. Immunol.* **16**: 88-93, 2001.
- Livesley, M. A., Thompson, I. P., Gern, L. and Nuttall, P. A.: Analysis of intra-specific variation in the fatty acid profiles of *Borrelia burgdorferi*. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 2197-2201, 1993.
- Page, R. C., Engel, L. D., Narayanan, A. S. and Clagett, J. A.: Chronic inflammatory gingival and periodontal disease. *JAMA*. **240**: 545-550, 1978.
- Paster, B. J., Boches, S. K., Galvin, J. L., Ericson, R. E., Lau, C. N., Levanos, V. A., Sahasrabudhe, A. and Dewhirst, F. E.: Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol.* **183**: 3770-3783, 2001.
- Radolf, J. D., Goldberg, M. S., Bourell, K., Baker, S. I., Jones, J. D. and Norgard, M.V.: Characterization of outer membranes isolated from *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *Infect. Immun.* **63**: 2154-2163, 1995.
- Radolf, J. D.: *Treponema pallidum* and the quest for outer membrane proteins. *Mol. Microbiol.* **16**: 1067-1073, 1995.
- Schultz, C. P., Wolf, V., Lange, R., Mertens, E., Wecke, J., Naumann, D. and Zahringer, U.: Evidence for a new type of outer membrane lipid in oral spirochete *Treponema denticola*. Functioning permeation barrier without lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.* **273**:15661-15666. 1998.
- Sela, M. N.: Role of *Treponema denticola* in periodontal diseases. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **12**: 399-413, 2001.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. and Kent, R. L., Jr.: Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* **25**: 134-144, 1998.
- Wannemuehler, M. J., Hubbard, R. D. and Greer, J. M.: Characterization of the major outer membrane antigens of *Treponema hyodysenteriae*. *Infect. Immun.* **56**: 3032-3039, 1988.
- Yotis, W., Keene, J., Hoerman, K. and Simonson, L. G.: Fatty acid profiles of the outer membrane of ATCC strains 35405, 35404 and 33521 of *Treponema denticola*. *J. Periodontal Res.* **28**: 387-395, 1993.