Master Thesis

Gingipaine als Virulenzfaktoren von *Porphyromonas gingivalis* und ihre Bedeutung in der Pathogenese der Parodontitis

Dr. med. dent. Uwe Swaneburg

STEINBEIS-HOCHSCHULE BERLIN

in Zusammenarbeit mit

Deutsche Gesellschaft für Parodontologie e. V.

Master of Science in Periodontology (M.Sc.)
Jahrgang 2007/2009

Gingipaine als Virulenzfaktoren von *Porphyromonas gingivalis* und ihre Bedeutung in der Pathogenese der Parodontitis

Verfasser:
Dr. med. dent. Uwe Swaneburg

Zeitraum der Projektarbeit: 22.10.2007 bis 14.02.2009
Betreuer: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfgang Pfister

Erklärungen

Eigenständigkeitserklärung:

Ich habe die vorliegende Abschlussarbeit im Rahmen des Studienganges „Master of Science in Periodontology“ 2007/2009 selbständig verfasst und keine anderen als die in der Danksagung angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und keine anderen als die in der Danksagung angegebenen Hilfen erhalten.

Soest, den 14.02.2009

Dr. med. dent. Uwe Swaneburg

Genehmigungsvermerk

Die vorliegende Arbeit „Gingipaine als Virulenzfaktoren von *Porphyromonas gingivalis* und ihre Bedeutung in der Pathogenese der Parodontitis“ entstand im Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Jena. Mit der Einreichung dieser Arbeit als Masterthesis bin ich einverstanden.

Jena, den _____

_____

Univ.-Prof. Dr. med. Wolfgang Pfister

Inhaltsverzeichnis

		Seite
Erklärungen		I
Genehmigungsvermerk		II
Inhaltsverzeichnis		III
1.	Einleitung und Fragestellung	4
1.1	Parodontitis	4
1.1.1	Epidemiologie	4
1.1.2	Klassifikation	4
1.1.3	Ätiologie und Pathogenese	5
1.1.4	Mikrobiologie	7
1.1.5	Biofilm	8
1.2	*Porphyromonas gingivalis*	10
1.3	Verwandtschaftsverhältnisse von *P. gingivalis*	12
1.4	Mit *P. gingivalis* assoziierte Proteinasen	15
1.5	Fragestellung	16
2.	Material und Methoden	17
3.	Ergebnisse und Diskussion	18
3.1	Einführung – Gingipaine als Enzyme von *P. gingivalis*	18
3.1.1	Definition der Gingipaine	18
3.1.2	RgpA- und RgpB-Gen-Gingipaine	19
3.1.3	Kgp-Gen-Gingipain	20
3.2	Bedeutung der Gingipaine für die Pathogenität von *P. gingivalis*	21
3.2.1	Gingipaine und fimbrienvermittelte Adhäsion, intrazelluläre Invasion und parazellulärer Pfad von *P. gingivalis*	21
3.2.2	Effekte auf die Integrität des Bindegewebes	24
3.2.3	Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems	25
3.2.4	Aktivierende Einflüsse auf das Gerinnungssystem	27
3.2.5	Hemmende Einflüsse auf das Fibrinogen-Fibrin-System	28
3.2.6	Beeinträchtigung der Immunabwehr des Wirts	28
3.3	Gingipaine im biochemischen Regulationsmechanismus von *P. gingivalis*	35
3.3.1	Die Rolle des proteolytischen Systems von *P. gingivalis* beim Nährstofferwerb	35
3.3.2	Gingipainreifung und die Steuerung des intrazellulären Haushalts von *P. gingivalis*	39
3.3.3	Regulation der Proteinaseexpression von *P. gingivalis*	40
3.3.4	Gingipaine als bakterielle Hämagglutinine, Adhäsine und hämoglobinbindende Proteine	42
3.3.5	Proteinasegenmutationen bei *P. gingivalis* und ihre enzymatische Aktivität	42
3.4	Gingipaine und systemische Effekte	44
3.5	Synergismen mit anderen Spezies und quorum sensing	45
3.6	Hemmstoffe der Gingipaine	46
3.7	Immunisierung gegen Gingipaine	48
4.	Zusammenfassung / Summary	52
5.	Literaturverzeichnis	53
Anhang		87
Abbildungsverzeichnis		87
Tabellenverzeichnis		87
Danksagung		88
Lebenslauf		89

1. Einleitung und Fragestellung

1.1 Parodontitis

1.1.1 Epidemiologie

Bei der Parodontitis handelt es sich primär um eine bakteriell induzierte entzündliche Infektionserkrankung des Parodontiums, die unbehandelt zu einem Verlust des parodontalen Stützgewebes und letztendlich zum Zahnverlust führen kann[152]. Von den über 500 subgingival nachgewiesenen Mikroorganismen[466] stehen nur wenige eng mit der Parodontitis in Verbindung. Zu diesen wird *Porphyromonas gingivalis* gezählt, welcher darüber hinaus eine der „Schlüsselfunktionen" bei der Parodontitis einnimmt[414].
Interessantes erbrachte die jüngste Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV). Bei den 35-44-Jährigen deutschen Erwachsenen entwickelten sich die Parodontalerkrankungen im untersuchten Zeitraum von 1997 bis 2005 wie folgt: Mittelschwere Parodontitiden nahmen von 32,2% auf 52,7% zu. Schwere Parodontitiden nahmen von 14,1% auf 20,5% zu. Bei den Senioren (65-74 Jahre) sind inzwischen 48% von einer mittelschweren und 39,8% von einer schweren Parodontitis betroffen, in dieser Altersgruppe entwickelte sich folglich eine famose 23,7%ige Zunahme der Prävalenz innerhalb von nur 9 Jahren[264]!
In der Bundesrepublik Deutschland ist die Parodontitis mit 27.3% bei den über 40-Jährigen immerhin die häufigste Ursache für Zahnextraktionen, deutlich vor der Karies mit 20.7%. Mit 18.7% folgt die kombinierte Indikation aus Parodontitis und Karies[359].
Die Prävalenz der Diagnose Parodontitis nimmt demnach eindeutig mit dem Alter zu, zum Beispiel liegen bei lediglich 10% der 20-29-Jährigen klinische Attachmentverluste von 3-4mm (an mehr als vier Stellen) vor, bei den 60-69-Jährigen sind es jedoch schon 62%[318] mit derartigen Attachment-reduktionen.
9-35% der 18-35-Jährigen sowie 18-70% der 36-55-Jährigen und 44-81% der über 55-Jährigen haben klinische Attachmentverluste von 3-4mm, gleichermaßen zeigt sich eine Zunahme auch bei den klinischen Attachmentverlusten von mindestens 5mm: bei den 18-35-Jährigen lediglich 0.3-6%, 12-27% bei den 36-55-Jährigen und 35-51% bei den über 55-Jährigen[13, 55, 56].
Bei allein 40-100% der Patienten mit „chronischer Parodontitis" ist *P. gingivalis* nachweisbar[400]. Damit korreliert, dass der Anteil von *P. gingivalis* an der subgingivalen Mikroflora der parodontalen Taschen bei den tiefen Taschensondierungstiefen proportional beträchtlich höher ist als bei den schwach ausgeprägten Taschensondierungstiefen[400]. Die Spezies ist darüber hinaus ein Hauptpathogen sowohl bei periimplantitisbedingten Implantatverlusten, bei Misserfolgen der regenerativen Therapien sowie bei akuten parodontalen Abszessen[294, 301, 399].

1.1.2 Klassifikation

Eine bis zum Ende der 90iger Jahre des letzten Jahrhunderts gültige Klassifikation der Parodontitiden, die sich nach dem Lebensalter des Auftretens sowie der Progressionsrate richtete, wurde durch die auf dem „International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions" im Jahre 1999 erstellte Klassifikation der parodontalen Erkrankungen und Zustände[22] aufgegeben und ist in Tabelle Nr. 1 dargestellt.
Begriffe wie „juvenile Parodontitis" oder „adulte Parodontitis" wurden verlassen und durch die Gliederung in „chronische Parodontitis" und „aggressive Parodontitis" ersetzt, da sie das Augenmerk auf das Ausmaß und die Schwere der Erkrankung in Relation zum Alter verstärken[108].

Tabelle Nr. 1: Klassifikation parodontaler Erkrankungen und Zustände (gekürzt: Armitage et al., 1999)[22]; Gingivopathien werden hier nicht berücksichtigt.
*weitere Einteilung nach Schweregrad: leichter (1-2 mm), moderater (3-4 mm) und schwerer (≥ 5mm) klinischer Attachmentverlust.

I Chronische Parodontitis *
- A lokalisiert (< 30 sites betroffen)
- B generalisiert (> 30 sites betroffen)

II Aggressive Parodontitis *
- A lokalisiert (< 30 sites betroffen)
- B generalisiert (> 30 sites betroffen)

III Parodontitis als Manifestation systemischer Erkrankungen
- A assoziiert mit hämotologischen Störungen
  - 1 erworbener Neutropenie
  - 2 Leukämie
  - 3 andere
- B assoziiert mit genetischen Störungen
  - 1 Familiäre oder zyklische Neutropenie
  - 2 Down-Syndrom
  - 3 Leukozyten-Adhäsions-Syndromen
  - 4 Papillon-Lefèvre-Syndrom
  - 5 Chediak-Higashi-Syndrom
  - 6 Histiozytose
  - 7 Glykogenosen
  - 8 Infantile Agranulozytose
  - 9 Cohen-Syndrom
  - 10 Ehlers-Danlos-Syndrom (IV und VIII)
  - 11 Hypophosphatasie
  - 12 andere
- C nicht anderswertig klassifiziert

IV Nekrotisierende parodontale Erkrankungen
- A Nekrotisierende ulzerative Gingivitis
- B Nekrotisierende ulzerative Parodontitis

V Abszesse des Parodontiums
- A Gingivaler Abszess
- B Parodontaler Abszess
- C Perikoronaler Abszess

VI Parodontitis assoziiert mit endodontalen Läsionen
- A Kombiniert parodontal-endodontale Läsion

VII Entwicklungsbedingte oder erworbene parodontale Deformitäten oder Zustände
- A Lokalisierte zahnbedingte Faktoren, die zu plaque-induzierten gingivalen oder parodontalen Erkrankungen prädisponieren
- B Peridentale mukogingivale Deformitäten oder Zustände
- C Mukogingivale Deformitäten oder Zustände im zahnlosen Kiefer
- D Okklusales Trauma

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Um Parodontalerkrankungen entstehen zu lassen, sind Pathogene erforderlich. Die gegenwärtig vorhandenen Daten lassen aber den Schluss zu, dass diese für sich allein genommen nicht ausreichen, das pathologische Geschehen zu erklären. Wenn auch Plaque über den Weg der Gingivitis für die häufigsten Parodontitiden eine Grundvoraussetzung ist, so führt dieser Biofilm alleinig respektive dass Vorhandensein von parodontopathogenen Bakterien nicht unbedingt direkt zu einer Parodontitis[379, 237] (s. Abb. 1). Genauso gilt, dass auch nicht aus jeder Gingivitis wiederum eine Parodontitis entsteht, letzterer jedoch in der Regel eine Gingivitis vorangeht. Auch gibt es nach der „Burst-Hypothese“ keine kontinuierliche Progression von Attachmentverlusten, sondern ein Wechselspiel zwischen Exazerbationsphasen und Remissionsphasen, welche in den oben angedeuteten Interaktionen zwischen Wirtsmolekülen und den parodontopathogenen Bakterien wurzelt[410].

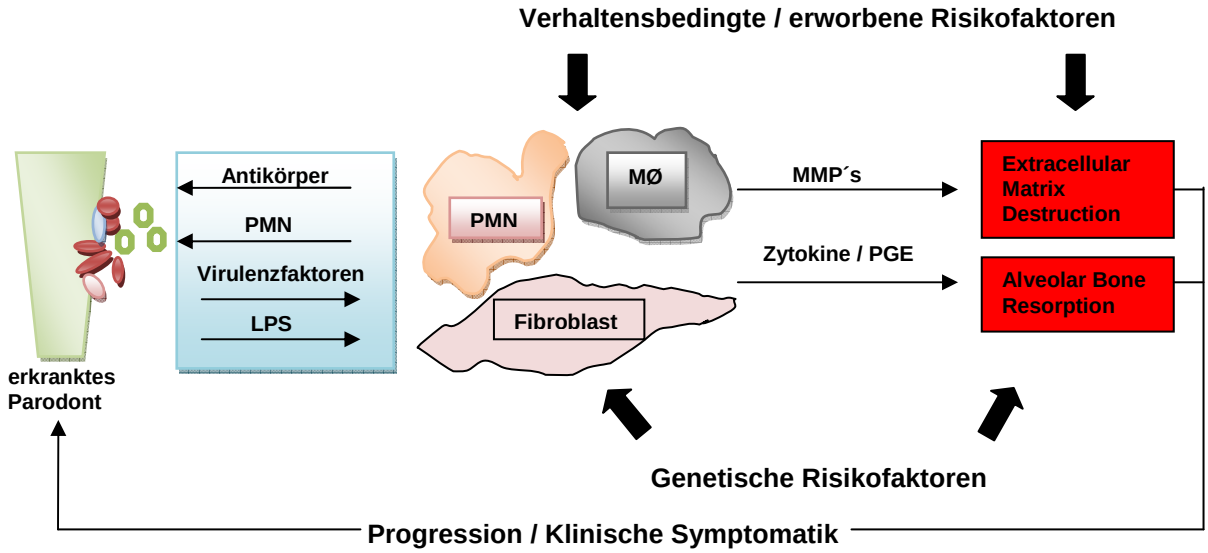

Abb. 1.: Pathogenese der Parodontitis (modifiziert nach Page & Kornman 1997)[325]

Die lokalen Umweltbedingungen in der parodontalen Tasche sind bei der Regulation der Expression von Virulenzfaktoren durch pathogene Spezies gleichsam von Bedeutung:
Voraussetzung ist, dass es sich um einen virulenten Typus handelt, welcher chromosomale und extrachromosomale genetische Faktoren besitzt, um die Erkrankung zu initiieren. Ebenso muss der Wirt eine gewisse Anfälligkeit für dieses Pathogen mitbringen. Darüber hinaus müssen die Bakterien in ausreichender Anzahl vorhanden sein und eine individuelle Schwelle für den Wirt übersteigen, andere Bakterienspezies haben den Vorgang zu begünstigen oder ihn zumindest nicht zu hemmen, die Mikroorganismen müssen am entsprechendem Ort lokalisiert sein und die lokalen Umweltbedingungen sollten der Expression von speziesvirulenten Eigenschaften zuträglich sein[412].
Es hat sich daneben herauskristallisiert, dass neben *P. gingivalis* nur einige bestimmte Bakterienspezies an der Parodontitis beteiligt sein können, was die Theorie der spezifischen Plaquehypothese unterstützt[412].
Des Weiteren gestaltet sich die individuelle Anfälligkeit für die Parodontitis in Abhängigkeit von der Potenz des Immunsystems eines Wirts, woraus folgt, dass es exogene und/oder endogene Faktoren gibt, welche die lokale und/oder die systemische Immunabwehr negativ beeinflussen. Risikofaktoren oder Risikoverhaltensweisen für Parodontitis scheinen neben HIV unter anderem genetische Prädispositionen zu sein, zum Beispiel bedingt durch einen IL-1-Gen-Polymorphismus, Dysfunktionserkrankungen der Polymorphkernigen Neutrophilen Granulozyten (PMN) (z. B. Papillon-Lefèvre-Syndrom) oder andere Anomalien der Immunabwehr. Weiterhin zu nennen, jedoch auch noch kontrovers diskutiert sind endokrinologische Erkrankungen wie die Osteopenie und die Osteoporose, vielleicht die Hormonersatztherapie bei Frauen in der Postmenopause, wohl sicher aber auch psychosozialer Stress und Rollenstress, Rauchen und Diabetes mellitus[360, 361, 435, 123, 88, 144].
Neben möglichen Variationen in der Expression von Virulenzfaktoren von *P. gingivalis*, welche durch unterschiedlich virulente Stämme bedingt wird, sind in erster Linie lokale und/oder systemische Immunstörungen verantwortlich[324, 308, 434, 379]. Etwas allgemeiner lässt sich also formulieren, dass sich die Anfälligkeit eines Wirts für eine Parodontitis aus dem Zusammenspiel zwischen Bakterien, dem Wirt und Umweltfaktoren ergibt[379].
Bei der Pathogenese marginaler Parodontitiden können prinzipiell unterschiedliche Zustände differenziert werden. Existiert eine adäquate Antwort des spezifischen und/oder unspezifischen Immunsystems ist es unwahrscheinlich, dass parodontopathogene Bakterien eine Parodontitis erzeugen. Allerdings kann sich bei den oben bereits angesprochenen exogenen oder endogenen Störfaktoren der lokalen und/oder systemischen Immunabwehr die Situation zu Gunsten dieser Bakterien auswirken und die Erkrankung induzieren. Auch bei einer eigentlich adäquaten lokalen und systemischen Immunabwehr können parodontopathogene Bakterien eine überschießende Immunantwort bewirken (zum Beispiel bei einem hyperinflammatorischen Reaktionstyp). Wiederum kann es besonders virulenten parodontopathogenen Bakterien einer adäquaten Immunabwehr zum Trotz gelingen, eine Parodontitis zu induzieren. Gerade *P. gingivalis* scheint eine paradoxe Situation herbeiführen zu können, da es die Fähigkeit besitzt, zum einen Komponenten der angeborenen Immunabwehr zu aktivieren als auch andere zu supprimieren, was sich unter anderem in komplexen

Zytokin- und Lipopolysaccharid-Interaktionen begründet (siehe unter Kap. 1.2)[227]. Der größte Teil des Gewebeschadens entsteht bei dieser Infektionserkrankung jedoch aufgrund der Immunantwort des Wirts und nicht durch das infektiöse Agens selbst[450, 434].

1.1.4 Mikrobiologie

P. gingivalis gehört zu einem von zwei mikrobiologischen Komplexen, die zu den mikrobiellen Hauptursachen der Parodontitis gezählt werden. Zum einen ist der sogenannte „rote Komplex" zu nennen, bestehend aus *P. gingivalis, Tannerella forsythia* und *Treponema denticola* (siehe Abb.2)[413]. Dieser Komplex ist auffallend mit den klinischen Messungen bei parodontal Erkrankten wie der Taschensondierungstiefe und dem Bluten auf Sondierung assoziiert. Der zweite „orangene Komplex" setzt sich aus *Prevotella intermedia, Prevotella nigrescens, Peptostreptococcus micros, Fusobacterium nucleatum vincentii, Fusobacterium nucleatum nucleatum, Fusobacterium nucleatum polymorphum* und *Fusobacterium periodonticum* zusammen. Assoziierte Spezies dieser Gruppe sind wiederum *Eubacterium nodatum, Campylobacter rectus, Campylobacter showae, Streptococcus constellatus* und *Campylobacter gracilis*[413, 217].
Bei parodontal Gesunden überwiegen supra- als auch subgingival *Actinomyces*arten. Diese Dominanz von *Actinomyceten* findet sich noch, aber schon stark reduziert, im supragingivalen Bereich von parodontal Erkrankten[470], ändert sich jedoch massiv in deren subgingivalen Arealen. Die *Actinomyceten* reduzieren sich zu Gunsten der Spezies des roten und orangenen Komplexes. Dies gilt nicht nur für die Relationen, sondern auch für die absoluten Zahlen.
Drei weitere Komplexe sind neben den erstgenannten beiden Komplexen noch zu erwähnen (siehe Abb. 2): Der „grüne Komplex" (drei *Capnocytophaga*-Spezies, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* und *Actinobacillus actinomycetemcomitans serotyp a*) (neu: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)[300], der „gelbe Komplex" (eine *Streptokokken*-Gruppe mit den wiederum eng verwandten *Streptococcus mitis, Streptococcus sanguis* und *Streptococcus oralis*) und schließlich der „violette Komplex" (*Actinomyces odontolyticus* und *Veillonella parvula*). Alle diese Komplexe spiegeln bevorzugte Gemeinschaften in subgingivaler Plaque bei parodontal Erkrankten wieder. Ist ein Komplex weiter unterteilt, weist dies auf eine engere Verwandtschaft hin. Bakterien außerhalb dieser Komplexe (*Actinomyces*-Spezies wie *Actinomyces naeslundii genospezies II* (=*Actinomyces viscosus,* in untenstehender Abbildung blaues Feld), *Selenomonas noxia* und *A. actinomycetemcomitans serotyp b*) haben keine nähere Beziehung zueinander respektive zu den Komplexen[413].

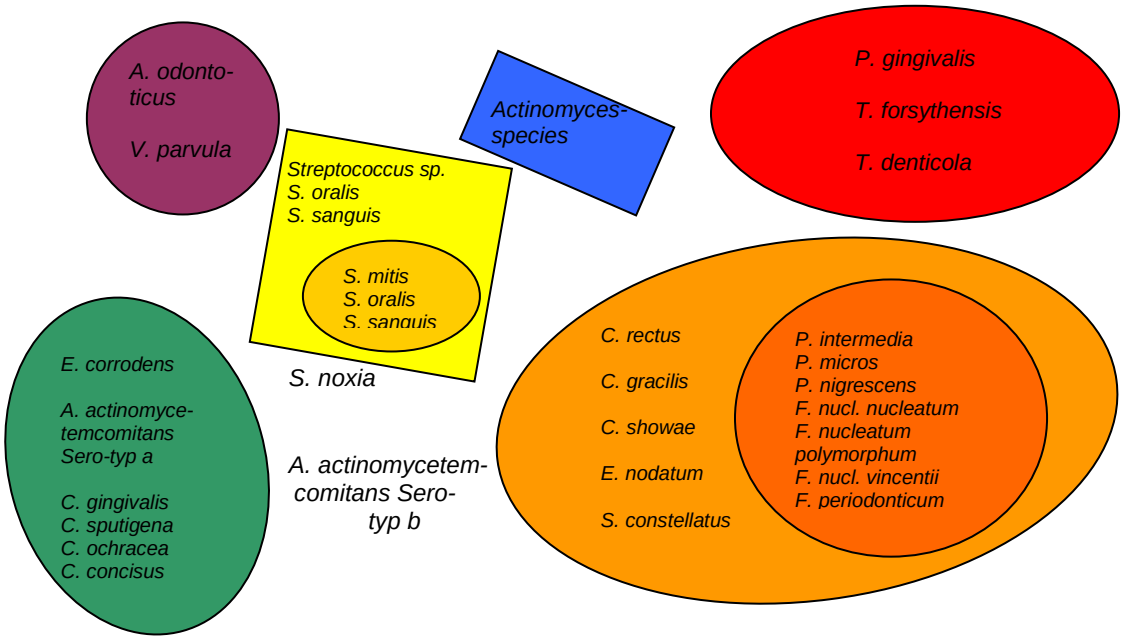

Abb.2: „Subgingivale mikrobiologische Komplexe“ frei nach Socransky et al. (1998)[413]

Der vielleicht wichtigste Faktor für die Zusammensetzung der subgingivalen Mikroflora ist jedoch der parodontale Gesundheitsstatus des Wirts, mit den Parametern gingivale Rötung, Blutung auf Sondierung, Suppuration sowie der Zusammensetzung der mikrobiellen Besiedlung, welche wiederum eng mit der Taschensondierungstiefe korreliert. Damit einhergehend ist das Auftreten respektive die Anzahl der Spezies des „roten Komplexes“ als auch des „orangenen Komplexes“, wobei der Vergleich der mikrobiellen Besiedlung zu parodontal nicht Erkrankten interessant ist. Daraus geht unter anderem hervor, dass Spezies des „roten Komplexes“ nicht nur an erheblich mehr Messstellen, sondern auch in erheblich größerer Anzahl gefunden werden[153, 411, 413]. Veränderungen der lokalen Umweltbedingungen wie beispielsweise der Vertiefung von Zahnfleischtaschen führen zu einem sprunghaften Anstieg sowohl der Bakterienzellzahlen als auch der Häufigkeit der Detektion der Spezies aus den beiden vorgenannten Komplexen, wohingehend wiederum *Actinomyces naeslundii genospecies II* von solchen Veränderungen des Habitats unbeeindruckt bleibt[153, 411, 413].

1.1.5 Biofilm

Auf den anorganischen Zahnoberflächen können, unterstützt durch die spezifischen Bedingungen der Mundhöhle, ortständige Bakterien sogenannte Biofilme ausbilden. Im Biofilm lebende Bakterien haben gegenüber den planktonisch existierenden Bakterien einige Selektionsvorteile, wie zum Beispiel einen erhöhten Schutz gegenüber antimikrobiellen Substanzen[63] oder körpereigene Abwehrmechanismen[419, 472, 74]. Hinzu kommen diverse synergistische Effekte. Durch die Synthese kaum löslicher extrazellulärer Polysaccharide und verschiedener Verankerungsmechanismen an der Zahnoberfläche sind Biofilme nur relativ schlecht von dieser zu lösen. Jedoch muss man den primären Biofilm als solchen nicht alleinig als den pathologischen Faktor bei der Entstehung von Parodontitiden sehen. Vielmehr verleiht erst die allmähliche Umwandlung eines kommensalischen und somit zuerst noch physiologischen bakteriellen Ökosystems hin zu einer pathogenen Bakterienflora dem Biofilm seinen negativen Charakter[112].
An dieser Stelle sei ein kurzer Blick auf den Aufbau eines Biofilms erlaubt. Biofilme setzen sich zu 75-80% aus einer von den Bakterien synthetisierten, organischen polymeren Matrix sowie zu nur 15-20% aus Bakterienzellen zusammen[420]. So genannte Mikrokolonien bilden die morphologische Grundeinheit des Biofilms. Eine solche Mikrokolonie setzt sich wiederum in der Regel aus einer Vielzahl von verschiedenen Bakterienspezies zusammen[95]. Die Mikrokolonie sitzt basal fest verankert der besiedelten Oberfläche auf. Zwischen den Einzelkolonien durchzieht den Biofilm ein Netzwerk von

wasserführenden Kanälen[112]. Diese führen wiederum einen Flüssigkeitsstrom, der vermutlich dem Transport von Stoffwechselprodukten, Nährstoffen und der Homöostase innerhalb des Biofilms dient[112]. Der biochemische Informationsaustausch zwischen den Bakterien, das „quorum sensing" scheint eng mit diesen Kanälen verbunden zu sein[72, 439]. Die extrazelluläre Matrix bildet das Gerüst, das die einzelne Bakterienzelle im Verbund hält. Sie besteht aus unterschiedlich verzweigten Polysacchariden mit atypischen Glykosidbindungen, Proteinen, Salzen sowie extrazellulär abgelagerten DNA-Molekülen. Diese Struktur verleiht dem Biofilm unter anderem die mechanische Stabilität, schützt vor Austrocknung, vor antibakteriellen Faktoren und übt eine Pufferfunktion aus[112]. Zum Teil dienen diese Polysaccharide auch wiederum als Nährstoff für Biofilmbakterien[423].
Des Weiteren unterliegt der Biofilm einer funktionellen Kompartimentierung[112], das heißt, man findet dort zum Teil eng benachbarte Areale mit Unterschieden im pH-Wert, der Sauerstoffspannung, dem elektrochemischen Potential, der Reproduktionsrate, der Proteinexprimierung oder dem Vorhandensein energiereicher Verbindungen, mit anderen Worten, die Kompartimentierung sorgt für Areale mit unterschiedlichen Aufgaben[73, 209, 418, 471]. Bakterien einer Spezies können in dem einen Kompartiment bevorzugt synthetisieren, in einem anderen Kompartiment wiederum eher Zellteilung betreiben. Eine selektive Regulation der Gentranskriptionsrate führt zu diesen verschiedenen phänotypischen Merkmalen innerhalb einer Spezies in einem Biofilm, was eine permanente genetisch gesteuerte Anpassung an sich verändernde Lebensbedingungen in der Mundhöhle bewirkt[154, 371].
Die Entwicklung eines bakteriellen Biofilms kann in drei Phasen differenziert werden: Die primäre Adhäsion planktonischer Bakterien auf der Zahnoberfläche, die Proliferation mit gleichzeitiger Ausbildung von Mikrokolonien unter Formierung des typischen Biofilmgerüstes und schließlich der Ausstoß von Tochterkolonien[74]. Dabei sind über 500 orale Bakterienspezies[466] in der Lage, Adhäsine zu synthetisieren, die diese Spezies unter anderem zur interzellulären Ko-Aggregation befähigen[214]. Zum Teil wird die Anlagerung weiterer Spezies auch durch das sogenannte „bridging" ermöglicht, welches die Anheftung von Bakterien an vor allem durch *Streptokokken*-Spezies synthetisierte extrazelluläre Polysaccharide vermittelt[362]. Kommen interessanterweise epitheliale Zellen mit bakterieller Neuraminidase in Kontakt, wird das Attachment der *Streptokokken* herabgesetzt sowie das von *P. gingivalis* und *P. intermedia* verstärkt [112, 216, 126].
Damit sich ein funktionierendes „Ökosystem Biofilm" entwickeln kann, ist eine Synergismen schaffende, sich selbst optimierende Koordination der Einzelprozesse im reifenden Biofilm unabdingbar. Dies erfolgt durch eine Art von interzellulärer Kommunikation, welche als „quorum sensing" bezeichnet wird und wiederum stark von der Zelldichte abhängt[74, 117]. Der Hauptsinn dieses signalmolekülvermittelten Informationsaustausches, welcher darauf basiert, dass Bakterienzellen kontinuierlich Signalmoleküle abgeben, liegt in der gegenseitigen Regulation der Genexpression zum gegenseitigen Nutzen[112]. Auch bei der Spezies *P. gingivalis* ist ein solcher Regulationsmechanismus nachgewiesen worden (sogenanntes Autoinduktor-II-System zur Signaltransduktion)[112, 217, 114].
Es müssen sich aber noch etliche weitere, auch durch andere Bakterien verursachte *P. gingivalis* begünstigende Faktoren einstellen, um diesem Bakterium fördernde Wachstumsbedingungen in einem Biofilm zu ermöglichen, wie Veränderungen der Temperatur, des pH-Werts oder des elektrischen Potentials[409, 151].
Trotz schon vieler bekannter und spannender Details sind die Kommunikation der Spezies untereinander, die „Zell zu Zell-Adhärenz" als auch die sogenannte „Koaggregation" zur Zeit nur teilweise geklärte Fragen, vieles bleibt noch offen.

1.2 *Porphyromonas gingivalis*

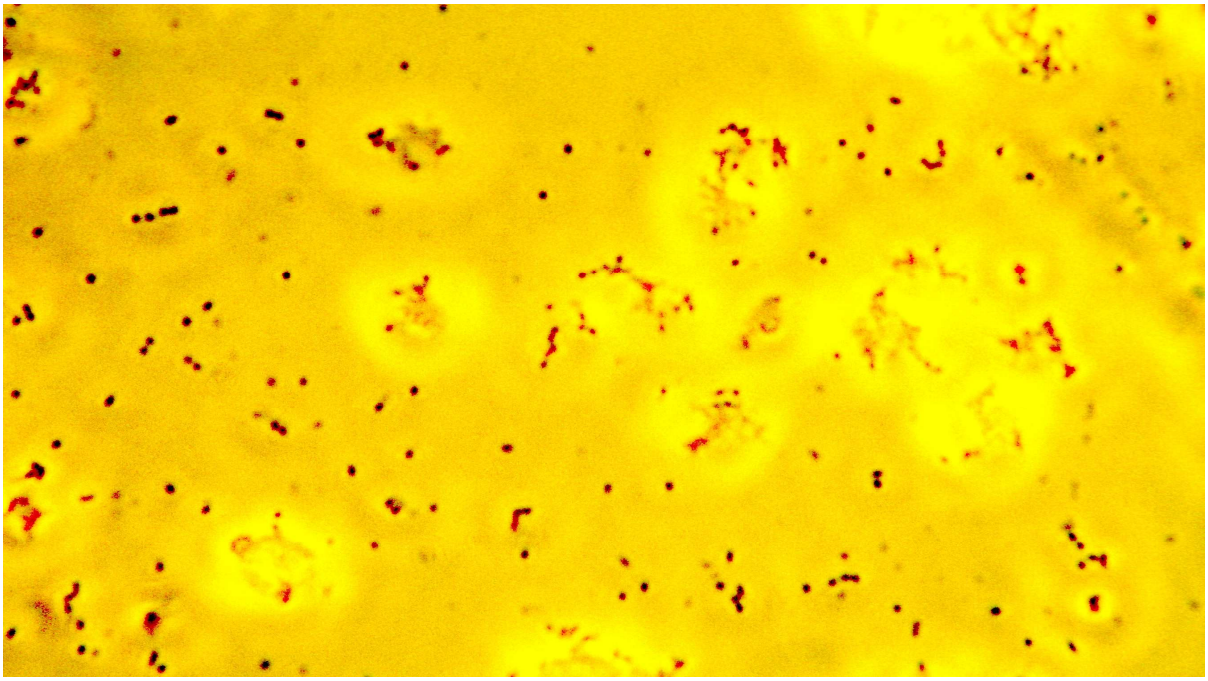

Abb. 3: *P. gingivalis*-Isolat (Phasenkontrast)

Die meisten oralen, obligat anaeroben, gramnegativen Stäbchen wurden ursprünglich der *Bacteroides*-Gattung zugeordnet, jedoch änderte sich die Taxonomie dahingehend, dass man die Masse dieser Keime der *Bacteroides fragilis*-Gruppe, welche bevorzugt im Darm vorkommt, zugruppierte. *Bacteroides forsythus* wurde gänzlich neu zu *Tannerella forsythia* klassifiziert. Unter den oralen Mikroorganismen entstanden des Weiteren die saccharolytische Gattung *„Prevotella“* sowie die asaccharolytische Gattung *„Porphyromonas“.* Einige Spezies dieser Gattungen, sogenannte „schwarzpigmentierte Anaerobier“, bilden spezifisch auf Blutagar gezüchtet, schwarz oder braun pigmentierte Kolonien. Dieses Pigment stellt eventuell einen Abwehrmechanismus gegen toxisch-oxidative Sauerstoffmetabolite dar, da das eisenporphyrinhaltige, schwarze Pigment Hämatin nicht nur Sauerstoff, sondern auch reaktive Oxidationsmittel von PMN binden und diesen „oxidativen Stress“ neutralisieren kann[25]. Speziell *P. gingivalis* (siehe Abb. 3) verfügt noch im besonderen Maße über ein weiteres Schutzenzym gegenüber „oxidativen Stress“, die Superoxiddismutase, welche O^-_2 –Ionen mit Protonen wieder zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff reduziert[16, 17]. Ein essentieller Wachstums-faktor für diese „schwarzpigmentierten Anaerobier“ ist folglich das Hämin, welches mittels des bakterieneigenen Hämolysins für die Bildung des Hämatins notwendig ist[324, 59].
Die weitere taxonomische Unterteilung von *P. gingivalis* erfolgt in sechs Serotypen, die sich durch ihre verschiedenen Kapselpolysaccharide (K-Antigene) ergeben[253].
Alle oben genannten Gattungen können unterschiedliche Primärhabitate haben, *P. gingivalis* kommt zum Beispiel hauptsächlich in subgingivalen Regionen vor, vor allem in Zellen und Gewebe von fortgeschrittenen parodontalen Läsionen, wo es das Risiko für Attachment- und Alveolarknochenverluste ansteigen lässt[150, 152, 98, 239, 12, 33, 34, 36, 144, 145]. Man kann es jedoch auch in den Sekundärhabitaten Zunge und Tonsillen, Speichel oder in bukkalen Epithelien nachweisen[324], wodurch eine Transmission zwischen Wirten ermöglicht werden könnte[365]. *P. gingivalis* kommt nur selten in der Plaque von Gesunden vor, hat jedoch seine ökologische Nische respektive sein Reservoir auf den vorgenannten diversen Schleimhautoberflächen[365, 253]. Wie oben angedeutet, ist die sowohl die Detektionsfrequenz von *P. gingivalis* als auch dessen Quantität in parodontalen Läsionen, besonders auch bei refraktären posttherapeutischen parodontalen Taschen, erhöht[52, 150, 456, 42, 388, 465, 429, 64, 273].
Die Spezies gilt im Tierversuch als hoch virulent, allerdings ist diese Virulenz nicht bei jedem *P. gingivalis*-Typstamm von gleicher Ausprägung. Nicht erstaunlich ist, dass je virulenter ein Typstamm ist, dieser auch umso eher mit parodontal Erkrankten assoziiert ist und bei gesunden *P. gingivalis*-Trägern wiederum eher die avirulenten Typstämme zu finden sind[134, 451, 251, 292, 422, 26, 142, 18, 39]. Die Expression der Virulenzfaktoren wird durch die lokalen Umweltfaktoren, wie die Kalzium-, Eisen- oder

Magnesiumkonzentration, osmotischer Druck oder die Temperatur beeinflusst. So kann interessanterweise speziell die Eisenkonzentration die Membranproteinsynthese von *P. gingivalis* verändern und ein Eisenmangelstress das Wachstum sogar vollends zum Stillstand bringen[261, 32, 53].
Die Virulenz dieser Spezies resultiert aus etlichen potentiellen Virulenzfaktoren, welche helfen, die Wirtsabwehr zu umgehen und Gewebe zu destruieren. Dieses sind unter anderem der „fibroblast inhibitory factor", der „bone resorption inducing factor"[152] wie auch eine Vielzahl von Proteasen (zum Beispiel die Gingipaine, welche spezifisch für arginin- oder lysinhaltige Peptidbindungen sind und mit Oberflächenadhäsinen komplexieren). Des Weiteren sind Wirtsmoleküle wie Immunglobuline, Komplementfaktoren, häm- oder eisenbindende Proteine, Glykoproteine oder Moleküle, welche die Wirtsentzündungsreaktion modulieren oder inaktivieren können, zu nennen. Zu diesem schwungvollen Cocktail gesellen sich auch noch kollagenabbauende Enzyme[37], Fettsäuren[324], Hämolysin[90], zytotoxische Stoffwechselprodukte wie beispielsweise NH_3, H_2S und Indol sowie Kapselantigene und Fimbrien[324, 299, 463], wobei die letztgenannten wiederum für die Adhärenz an oralen Epithelzellen und an speichelbenetzten Zahnoberflächen sorgen. *P. gingivalis* kann die Migration von PMN durch epitheliale Barrieren hemmen[246] und ebenso die Zytokinsynthese als auch den Zytokinabbau in epithelialen Gingivazellen (zum Beispiel IL-8) beeinflussen[81, 111, 369].
Dabei lässt das Bakterium, wie schon oben angedeutet, immunologisch eine paradoxe Situation entstehen[227]. Es entfaltet zum einen antiinflammatorische Effekte, da es durch seine Lipopolysaccharide (LPS) die IL-1ra-Ausschüttung von PMN und Monozyten/Makrophagen fördert. Ebenso entsteht ein solcher Effekt durch die Fimbrien des Bakteriums, welche die IL-4-Synthese von T-Zellen begünstigt. Dem gegenüber stehen jedoch mannigfaltige proinflammatorische Effekte, von denen die paradoxen nur einen kleinerer Ausschnitt darstellen. Unter anderem fördern die LPS auch die proinflammatorisch wirkenden Zytokine IL-8 und TNF-α von PMN's und Monozyten/Makrophagen, während die Fimbrien die ebenso proinflammatorische IL-2-, TNF-α- und IFN-γ-Ausschüttung von T-Zellen begünstigen[227].

1.3 Verwandtschaftsverhältnisse von *P. gingivalis*

Nachfolgend stehen 10 Phyla (Divisionen, Sektionen), durch die die Welt der „eubacteria“ unterteilt wird[467]; das Phylum Nr. 6 wird „*CFB*“-Phylum genannt:

1. Purple bacteria
2. Gram-positive eubacteria
3. Cyanobacteria and chloroplasts
4. Spirochetes and relatives
5. Green sulfur bacteria
6. Bacteroides, flavobacteria and relatives
7. Planctomyces and relatives
8. Chlamydiae
9. Radioresistant micrococci and relatives
10. Green non-sulfur bacteria and relatives

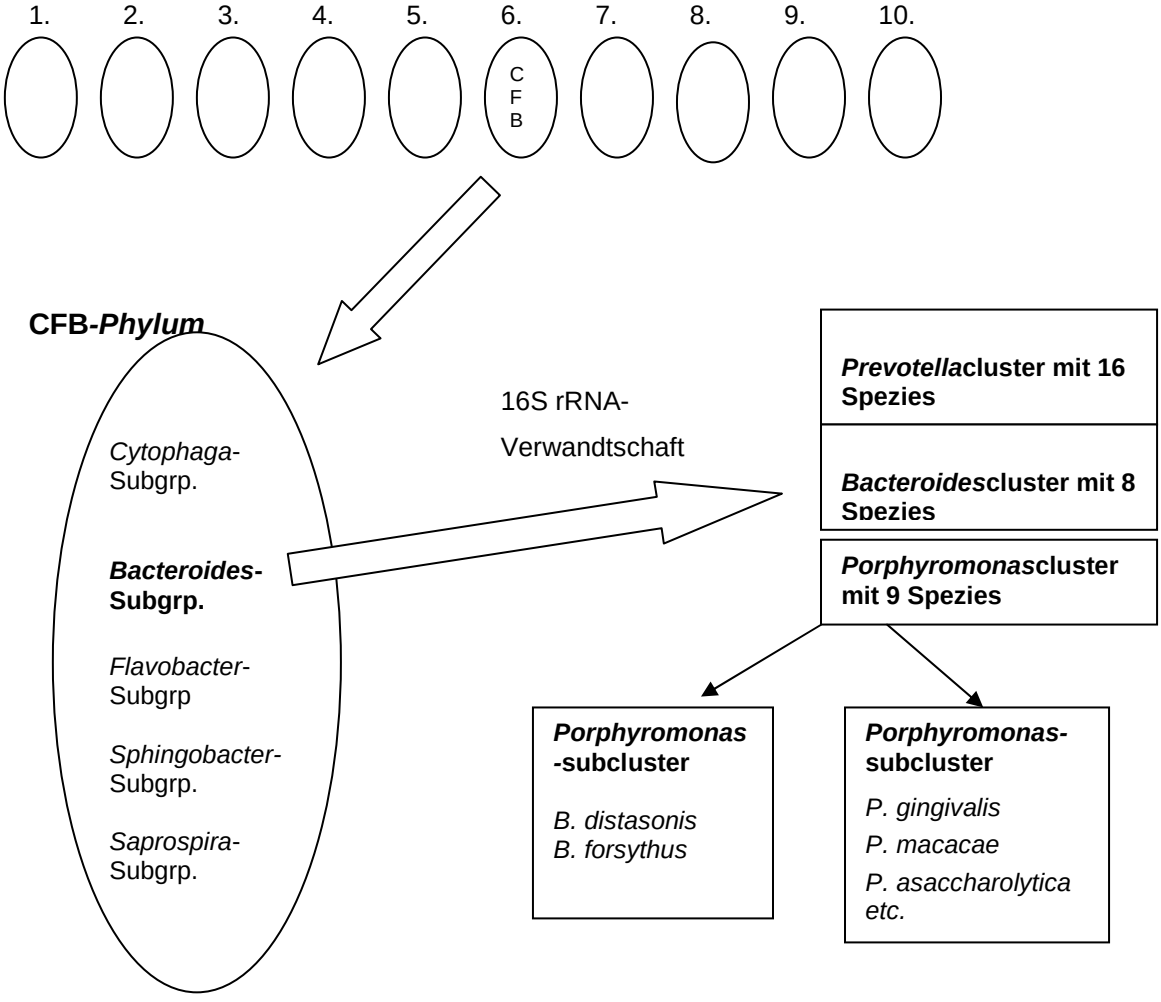

Abb. 4: Das *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides*-Phylum (*CFB*-Phylum)[328]

1994 wurde die Verwandtschaftsnähe anhand der 16S rRNA beschrieben[328]. Demzufolge repräsentiert die *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides*-Gruppe (*CFB*) eines von insgesamt alle Bakterien umfassenden zehn Phyla. Das *CFB*-Phylum ist wiederum aus fünf Subgruppen zusammengesetzt: *Cytophaga, Flavobacter, Sphingobacter, Saprospira* und *Bacteroides* (Abb. 4).
In der *Bacteroides*subgruppe des *CFB*-Phylums werden wiederum drei große phylogenetische Cluster unterteilt, welche die meisten der Spezies von *Prevotella, Bacteroides* und *Porphyromonas* umfassen. Die phylogenetische Untersuchung der 16S rRNA führt im Einzelnen zur folgenden Einteilung: dem *Prevotella*cluster, dem *Bacteroides*cluster und dem *Porphyromonas*cluster. Der *Prevotella*cluster

umfasst 16 *Prevotella*spezies, unter anderem *P. intermedia, P. nigrescens* (früher *P. intermedia serotype II* [380]) und *P. oralis*. Der *Bacteroides*cluster enthält acht Spezies, unter anderem *B. fragilis*. Der *Porphyromonas*cluster beinhaltet neun Spezies, beispielsweise genannt seien *P. asaccharolytica, P. gingivalis, B. macacae* (heute *Porphyromonas macacae*) und *B. forsythus* (heute *T. forsythia*) und wird wiederum in zwei Subcluster unterteilt, wobei der eine davon ausschließlich *B. forsythus (T. forsythia)* und *B. distasonis* umfasst.
Im *Prevotella*cluster stimmt die 16S rRNA durchschnittlich zu 91% überein, im *Bacteroides*cluster zu 93% und im *Porphyromonas*cluster zu annähernd 87%. Zwischen den beiden Clustern *Prevotella* und *Porphyromonas* gibt es eine durchschnittliche Übereinstimmung von annähernd 80% und zwischen Mitgliedern des *Porphyromonas*- und des *Bacteroides*cluster von ca. 84%. Zwischen den beiden *Porphyromonas*subclustern wiederum liegt die Übereinstimmung im Durchschnitt bei 86%[328]. Eine Veranschaulichung der verwandtschaftlichen Beziehung von *P. gingivalis* bietet der aus der 16S rRNA-Sequenzierung entstandene phylogenetische Baum in Abbildung 5.
In jedem der drei Hauptcluster erscheinen die beiden Schlüsselbasensignaturen: ein A:U-Paar an Basenposition 947:1234 und ein G an 1202. Ebenso ein G:C an Position 897:902, ein A:U an 943:1340 und ein C:G an 1089:1096. Eine weitere Kontinuität besteht zwischen dem *Prevotella*- und dem *Porphyromonas*cluster: ein G an Position 122 (außer bei *P. asaccharolyticus*, dort ein A).
Alle Mitglieder des *Prevotella*clusters haben dagegen ein G an Position 547 (in den anderen beiden Clustern ist es ein A).

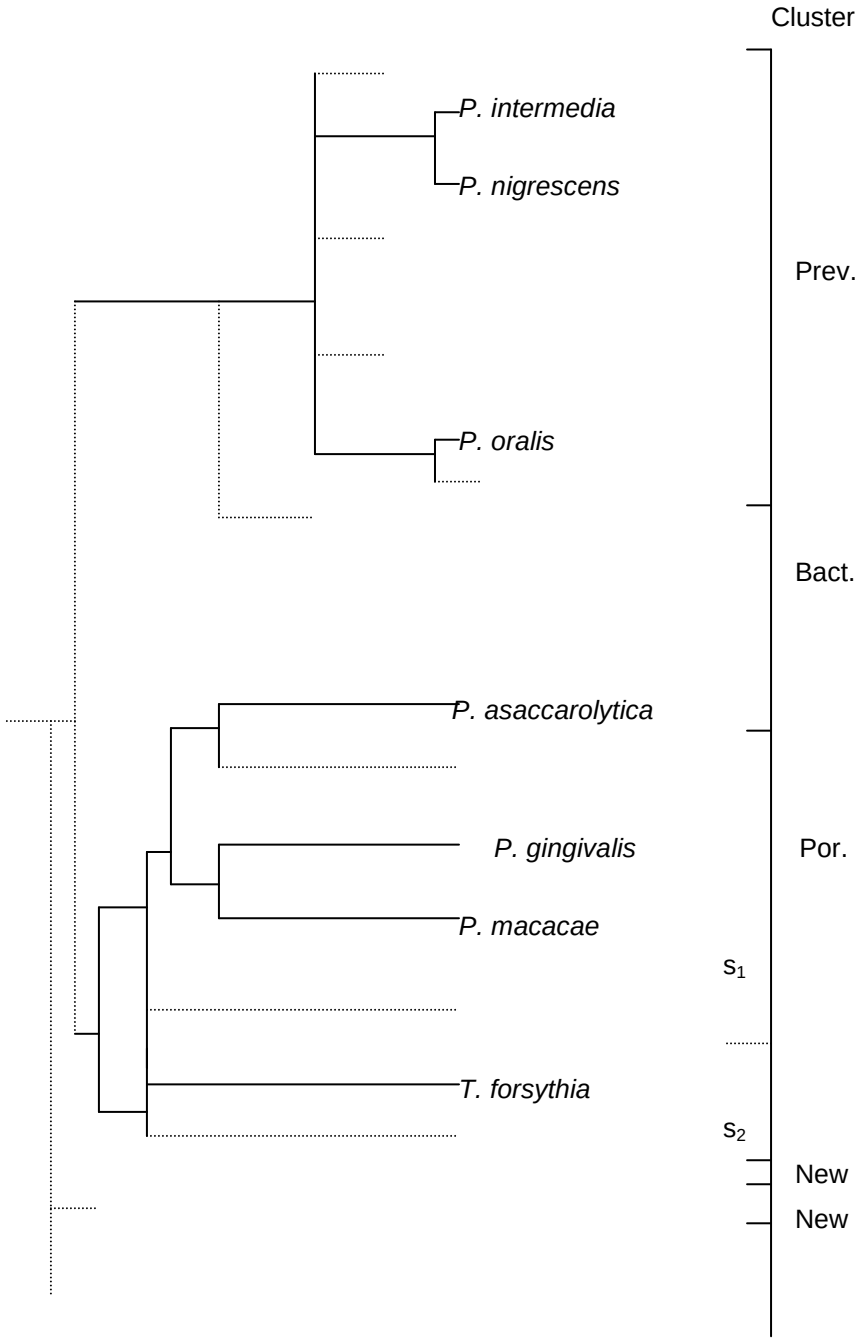

Abb. 5: Ausschnitt eines phylogenetischen Baumes der *Bacteroides*-Subgruppe des *CFB*-Phylums als Resultat einer 16S rRNA-Sequenzierung (im Bereich der gestrichelten Linien modifiziert und gekürzt, da nur in dieser Arbeit verwendete Spezies aufgeführt sind; Paster et al., 1994)[328]. (Prev. = *Prevotella,* Bact. = *Bacteroides*, Por. = *Porphyromonas*, s_1 und s_2 = Subgruppen des *Porphyromonas*clusters).

Tabelle Nr. 2: Prozentuale Übereinstimmungen bzw. Unterschiede zwischen den jeweiligen 16S rRNA-Sequenzen[328]

Übereinstimmung[%] **Unterschied[%]**	***Bma***	***Pas***	***Tf***	***Po***	***Pn***	***Pi***	***Pg***
Porphyromonas	88,3	85,1	87,5	79,6	80,2	80,2	---
gingivalis (Pg)	12,8	16,6	13,6	23,8	23,0	23,0	---
Prevotella	78,2	78,4	81,4	87,0	94,0	---	
intermedia (Pi)	25,8	25,4	21,4	14,3	6,3	---	
Prevotella	78,5	77,5	80,9	87,9	---		
nigrescens (Pn)	25,3	26,7	22,1	13,2	---		
Prevotella oralis (Po)	78,0	77,7	80,9	---			
	26,0	26,4	22,1	---			
Tannerella forsythia	86,6	84,5	---				
(Tf)	14,7	17,3	---				
Porphyromonas asa-	85,7	---					
ccharolytica (Pas)	17,1	---					
Bacteroides	---						
macacae (Bma)	---						

1.4 Mit *P. gingivalis* assoziierte Proteinasen

P. gingivalis synthetisiert wenigstens acht verschiedene Endopeptidasen, dazu Exopeptidasen die sich aus Cystein-, Serin- und Metallo-Peptidasen zusammensetzen (siehe Tabelle Nr. 3).

Tabelle Nr. 3: Peptidasen von *P. gingivalis* modifiziert nach Potempa et al. 2000[347]

Proteinasen	**Kurzbeschreibung**
R-Gingipaine	Arg-Xaa spezifische Endopeptidasen, Produkte der verwandten Gene *rgpA* und *rgpB*.
K-Gingipain	Lys-Xaa spezifische Cystein Endopeptidase, die mit Gingipain R verwandt ist.
Periodontain	Cystein Endopeptidase, homolog zu Streptopain
PrtT-Proteinase	Homolog zu Periodontain
Tpr-Proteinase	Endopeptidase, Produkt des *tpr* Gens, welches homolog zu Mitgliedern der Papain oder Calpain Familie ist. Die Expression wird heraufreguliert, wenn *P. gingivalis* zu wenig Peptide zur Verfügung hat.
Kollagenase	Produkt des *prtC* Gens, spaltet Pz-Pro-Leu-Gly-Pro Peptide und lösliches Kollagen Typ I. Gesteigerte Aktivität durch Calzium, gehemmte durch EDTA und p-Hydroxymercuribenzoat.
Polyl tripeptidyl-peptidase (PtpA)	Serin Exopeptidase homolog zu Mitgliedern der Prolyl Oligopeptidase Familie S9 der Serin Proteasen. Spaltet Peptidbindungen hinter Prolinresten.
Dipeptidyl-peptidase IV (DPP IV)	Serin Exopeptidase (Glycylprolyl Peptidase), homolog zu denen anderer eu- und prokaryontischer Spezies. Spaltet bevorzugt H_2N-Xaa-Pro-Dipeptide (Xaa=Aminosäurerest) in Peptiden und Proteinen.

Tabelle Nr. 3 Fortsetzung

Dipeptidyl-peptidase VI	Vermutlich eine Cystein Exopeptidase, homolog zu Proteasen anderer Bakterienspezies welche am Peptidoglykanumsatz beteligt sind.
Amino-peptidase P	Hydrolysiert spezifisch bestimmte *N*-terminal Xaa-Bindungen und legt sie frei. Signifikante Sequenzhomologie zu eu- und prokaryontischen Xaa-Pro Aminopeptidasen, welche zur M24 Familie der Metallopeptidasen gehören.
Oligopeptidase O	Vermutetes Enzym bekannt durch seine Genstruktur, welche für ein s-Protein codiert homolog zu einer Oligoendopeptidase von *Lactococcus lactis* , einem Mitglied der M13 Familie der Metallopeptidasen.
"Echte" Kollagenase	Proteinase, die die helikale Domäne von nativem Kollagen Typ I, II und III angreift, spaltet alle drei α-Ketten nahe ihrem C-terminalen Ende.
Gelatinase (Kollagenase, Pz-peptidase)	Cystein Proteinase, welche spezifisch Kollagen Typ IV, Gelatin, low-molecular-mass-kininogen und Transferrin degradiert, nicht jedoch Albumin, Fibrinogen oder Azocasein. Es hydrolysiert das synthetische Pz-Peptid, ist aber reaktionslos gegen synthetische chromogene Substrate die entweder spezifisch für Dipeptidyl Peptidase oder Trypsin sind.

Die in der obigen Tabelle aufgeführten Gingipaine sollen in der vorliegenden Arbeit Gegenstand des weiteren Interesses sein.

1.5 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine aktuelle Übersicht zur Bedeutung der Gingipaine als Virulenzfaktoren von *Porphyromonas gingivalis* in der Pathogenese der Parodontitis zu erarbeiten. Damit kann diese Übersicht als Beispiel für die Funktion bakterieller Proteinasen in pathogenetischen Abläufen von Entzündungen dienen.

2. Material und Methoden

Die Literaturrecherche wurde zunächst mit Hilfe einer medizinischen Literaturdatenbanksuche durchgeführt. Folgende Datenbanken wurden benutzt:

- National Library of Medicine (Internet: www.pubmed.com, www.gopubmed.com)
- Medline
- Cochrane Library

Der Literaturstand bis einschließlich März 2008 wurde in die Recherche einbezogen. Englisch- und deutschsprachige Literatur aus den Jahren 1995 bis 2007 wurden berücksichtigt. Als Suchbegriffe fanden Verwendung: „gingipain“ und „gingipains“.
In Kombination von mindestens zwei Suchbegriffen wurden benutzt: „Gingipain OR gingipains“, „gingipains“ und „periodontitis“, „gingipains“ und „pathogenesis“, „gingipains“ und „Porphyromonas gingivalis“. Die Suche ergab 453 gefundene Artikel.

3. Ergebnisse

3.1 Einführung – Gingipaine als Enzyme von *P. gingivalis*

3.1.1 Definition der Gingipaine

Gingipaine stehen seit Anfang der 1990iger Jahre zunehmend im Rampenlicht wissenschaftlicher Neugierde[68]. Der Begriff Gingipaine steht für Proteinasen des Bakteriums *Porphyromonas gingivalis*, welche zu einer Gruppe von extrazellulären, hydrolytischen Enzymen gehören. Neben diesen sind andere Virulenzfaktoren dieses Erregers wie Fimbrien, Hämagglutinin, Hämolysin und Lipopolysaccharide (LPS) bekannt. Der Begriff Virulenz beschreibt den Pathogenitätsgrad eines Organismus, welcher durch seine Invasivität und Toxizität charakterisiert wird. Die Progredienz einer Erkrankung kann unter anderem von der Virulenz eines Stammes innerhalb einer Spezies abhängen. Die Pathogenität von *P. gingivalis* ist wiederum von seinen verschiedenen Virulenzfaktoren abhängig[113, 160, 227].
Welche evolutionären Selektionsvorteile verschaffen die Gingipaine dieser Spezies? Die Gingipaine befähigen im Wesentlichen *P. gingivalis*, Wirtsmoleküle wie Immunglobuline, Komplement und eisenbindende oder hämbindende Proteine/Glykoproteine sowie Wirtsmoleküle, welche die Entzündungsreaktion modulieren, abzubauen[253].
Was sind nun Gingipaine und welche Gene kodieren für sie? Innerhalb der von *P. gingivalis* synthetisierten Proteinasen konnte man, basierend auf der Primärsequenz innerhalb der Cysteinproteinasen, die Gruppe der Gingipaine als separate Familie beschreiben[343]. In einer späteren Kristallstrukturanalyse ließ sich dieses zusätzlich bestätigen[27]. Diese Cysteinendopeptidasen sind für mindestens 85% der gesamten proteolytischen Aktivität sowie für 100% der sogenannten trypsinartigen Aktivität verantwortlich[179, 343, 345]. Die codierenden Gene der Gingipaine sind *rgpA*[6, 29, 14], *rgpB*[395, 288, 867, 353, 78] und *kgp*[347, 79, 396, 317, 336, 29, 234].
Der Mechanismus der Regulation der Gingipainexpression wie auch die Reifung, Aktivierung, Glykosylierung und die Sekretion sind noch relativ wenig verstanden. Die Gingipaine werden als große „Präproproteine“ synthetisiert[348]. Eine so genannte „zwei Komponenten Sensor Kinase“ scheint in der Reifung und bei der richtigen Lokalisierung der Gingipaine in Richtung der äußeren Membran (Outer Membrane, OM) involviert zu sein. Das entsprechende Gen dafür wird *gppX* (regulation of gingipains and black pigmentation in *P. gingivalis*) genannt[155]. Im Wesentlichen ist es bis dato leider noch unklar, wie die Gingipaine durch die äußere Membran hindurch transportiert werden, da dieser Organismus die dafür in gramnegativen Spezies üblichen sekretorischen Systeme (II, IV, VI) missen lässt respektive die Struktur der Gingipainpolypeptide nicht vergleichbar ist mit der von in gramnegativen Bakterien sonst vorhandenen Systemen (I, III und V). Folglich wird ein unbekanntes System vermutet, welches für die Reifung und posttranslationale Modifikation der Gingipaine verantwortlich ist[296]. Wahrscheinlich sind hier die Gene *vimA* und *vimE* und *vimF* beteiligt[320, 453-55]. Das membranassoziierte Protein PorT ist offensichtlich für den Transport von den *kgp, rgpA, rgpB* und *hagA* Genprodukten durch die äußere Membran hindurch essentiell, dem Weg vom periplasmatischen Raum bis zur Zelloberfläche, wo diese Genprodukte anschließend weiterbearbeitet werden und reifen können[370]. Gleichwohl dient es anscheinend der Verankerung von Rgp, Kgp, Hämagglutininen sowie dem Hämoglobinrezeptorprotein[390]. Erst vor Kurzem fand man ein neues Protein namens Sov, das wohl für den Sekretionsmechanismus von Gingipainen von Bedeutung ist und wodurch die Vermutung, es mit einem besonderen sekretorischen Weg zu tun zu haben, bestätigt wird[366].
Unterschiedliche Mechanismen der Assoziierung dieser Proteinasen mit der Zelloberfläche wurden beschrieben: Membranverankerungsmotive in den hoch konservierten C-terminalen Resten, Glykolipid/Glykosylierungsmodifikationen der reifen Proteinasen oder auch die enge Assoziation mit LPS der äußeren Membran durch LPS- oder kohlenstoffbindende Motive. Es existiert zur Zeit eine gewisse Evidenz dafür, dass zumindest bei RgpB die 72 Reste des carboxyterminalen Endes für die Verankerung der membranassoziierten Form zuständig sind und ein weiterer, bisher unbekannter sekretorischer Weg bei verschiedenen Mitgliedern des *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*-Komplexes existiert[396, 378]. Auch steht fest, dass das RgpB für die normale posttranslationale Glykosylierung der von *rgpA* stammenden Arg-Gingipainen benötigt wird und das dieser Vorgang für die Enzymstabilisierung notwendig ist[356]. So werden auch RgpA und Kgp beide C-terminal durch eine Carboxypeptidase (CPG70) weiterverarbeitet[458].
Daneben ist allen Gingipainen ist die Eigenschaft gemeinsam, das Oberflächenmolekül CD14 von Makrophagen abzubauen, einem Rezeptor für bakterielle Lipopolysaccharide, was wiederum zu einer

unzulänglichen immunologischen Antwort seitens der Makrophagen/Monozyten gegenüber dem Agens *P. gingivalis* führt[179, 421]. Rgp wie auch weitere Proteine des *P. gingivalis* Autolysats konnten sogar noch nach dem Zelltod dieser Spezies für eine Prolongation der Parodontitis verantwortlich gemacht werden[203]. Betrachtet man die Virulenz der einzelnen Cysteinproteinasen, so differiert diese sicherlich, zumindest konnte man diese Annahme im Versuch mit Mäusen bestätigen. Dort ergab sich in einem Parodontitismodell folgende Virulenzabfolge: Kgp ≥ RgpB >> RgpA. Ein solches Modell ist aufgrund von mikrobiologischen und immunopathologischen Ähnlichkeiten zum Menschen durchaus nicht ohne Belang[333] und mit aller gegebenen Zurückhaltung auf den Menschen in gewissen Grenzen übertragbar.
Des Weiteren beeinflussen Gingipaine durch die Aufnahme von Aminosäuren aus Wirtsproteinen auch den bakteriellen Stoffwechselhaushalt, insbesondere in Hinblick auf die Fimbrienreifung[179], so dass alle bis dato bekannten Fakten es verständlich machen, warum seit der Mitte der 90-iger Jahre es zu einem zunehmenden wissenschaftlichen Interesse an dem Thema der Gingipaine gekommen ist.

3.1.2 RgpA- und RgpB-Gen-Gingipaine

R-Gingipaine liegen, verglichen mit Gingipain K, in dreifacher Menge vor[345]. Diese von den *rgp*-Genen synthetisierten Produkte spalten entweder Polypeptidketten hinter dem Argininrest und nennen sich dann „arginin-spezifische Gingipaine“ (Rgp, 50kDa und 95kDa) oder aber sie gehören alternativ der zweiten Gruppe der Cysteinproteinasen an, den „lysin-spezifischen Gingipainen“ und werden weiter unten noch näher besprochen (Kgp, 105kDa)[77, 343, 426].
Das *rgpA*-Gen codiert für Gingipain R[335]. Diesem Gingipain R werden nun mehrere Enzymformen zugeordnet. Zum einen ein membranassoziiertes Enzym (mt–RgpA, mt= membrane-type), zum anderen zwei lösliche Formen. Bei den löslichen Formen handelt es sich um die katalytische Domäne $RgpA_{(cat)}$ (catalytic chain only, 50kDa) oder einem nicht kovalenten Komplex aus katalytischer Domäne und Hämagglutinin-/Adhäsionsdomäne (HrgpA, high-molecular-weight, 95kDa)[77, 78, 267, 342, 344, 354, 478].
Beim nicht kovalenten Komplex sorgt der katalytische Teil für die proteolytische Aktivität, HrgpA wiederum für die Adhäsion an Erythrozyten und extrazellulären Matrixproteinen. Die Familie der Arg-Gingipaine, in ihrer vesikulär gebundenen Form, ist vor allem bei der Adhärenz an anderen Bakterienspezies (*A. naeslundii*), Wirtszellen und Matrixproteinen beteiligt[106].
Die während des Wachstums in die extrazelluläre Umgebung abgegebenen Membranvesikel enthalten Lipopolysaccharide, Phospholipid, Membranproteine und periplasmatische Proteine. Die dominierende Form von Rgp´s in Vesikeln scheinen mt-RgpA und HRgpA zu sein, wobei sich HRgpA von der löslichen Form leicht durch ein 15kDa-Peptid unterscheidet, welches mit der Membranverankerung assoziiert ist[79].
Das *rgpB*-Gen betrachtet fehlt diesem, anders als beim *rgpA*-Gen, der Großteil des codierenden Bereiches für Hämagglutinin-/Adhäsionsdomäne, somit liegt als überwiegendes Produkt das lösliche 50kDa-Protein (RgpB) vor[267]. Das *rgpB*-Genprodukt ist kristallstrukturanalytisch untersucht und strukturelle Ähnlichkeiten zwischen der katalytischen Domäne von RgpB und Caspasen deuten auf eine evolutionäre Verwandtschaft hin[100]. Insgesamt sind vier Isoformen von RgpB bekannt[346], wobei es sich bei einer Isoform auch wieder um eine hoch modifizierte membranassoziierte Form, mt-RgpB genannt, handelt[3]. Weitere Unterscheidungsmerkmale ergeben sich aus der Länge und aus unterschiedlichen Monosaccharidzusammensetzungen der Isoformen.
Die posttranslationale Proteinmodifikation durch Anbindung von Zuckerresten wie bei der Glykosylierung von Proteinen ist ein weit verbreiteter Mechanismus in Eukaryontenzellen. Dieser Mechanismus scheint auch bei den Gingipainen eine funktionelle Bedeutung bezüglich der Stabilität, der Struktur und der Widerstandsfähigkeit gegenüber proteolytischen Einflüssen zu besitzen und somit die enzymatischen Eigenschaften bei der Parodontitis mit zu charakterisieren[118]. Die genauen Mechanismen der Glykosylierung der Rgp´s sind unbekannt[79], wobei RgpB im posttranslationalen Weg von RgpA eine Rolle spielen könnte[8]. In jüngerer Zeit konnte dieselbe Arbeitsgruppe aber sogar schon die Unabhängigkeit des Glykosylierungsapparates der Arg-Gingipaine von der Kapselbiosynthese nachweisen[10].
Trotz des Umstandes, dass auf Primärstrukturebene die katalytische Domäne von RgpB mit der von $RgpA_{cat}$ fast identisch ist, konnte das unterschiedliche Substratspaltungsverhalten auf die Substitution von lediglich vier Aminosäuren in den Bereichen der aktiven Stelle des *rgpA*- respektive des *rgpB*-Genprodukts zurückgeführt werden[15]. Da es bis dato keine Informationen über die Prävalenz dieser

Substitutionen bei klinischen Isolaten von *P. gingivalis* gab, dieses Wissen aber für die Medikamentenentwicklung von Bedeutung wäre, wurde diese Prävalenz eingehender untersucht[40].
Bei dieser Analyse möglicher Sequenzvariationen der Gene *rgpA* und *rgpB* fanden sich unter 82 Parodontitispatienten zwar keine Variationen innerhalb des *rgpA*-Gens, dafür fand man fünf verschiedene Genotypen beim *rgpB*-Gen (NYPN, NSSN, NSSK, NYPK und DYPN, entsprechend ihrer Aminosäuresubstituierung). Eine Parodontitistherapie, die supra- und subgingivales Debridement beinhaltet, führt prä- und posttherapeutisch zu einer Verschiebung der Häufigkeit des Nachweises von *P. gingivalis*. So wurde der Genotyp NYPN bei 32,9% der Patienten prätherapeutisch und nur noch bei 9,8% der Patienten posttherapeutisch nachgewiesen. Ähnliches bei den anderen Genotypen: NSSN 31,7% zu 12,2%, NSSK 26,8% zu 2,4%, NYPK 6,2% zu 1,2%, DYPN 1,2% zu 0%. Bei nur einem Patient (0%) fanden sich zwei Genotypen (NSSK/NYPN) vor der Therapie, posttherapeutisch ließ sich keiner der beiden mehr nachweisen. Es finden sich also innerhalb der natürlichen *P. gingivalis* Population fünf *rgpB*-Genotypen, was hinsichtlich einer zukünftigen Entwicklung spezifischer Inhibitoren von Bedeutung sein könnte[40].

3.1.3 Kgp-Gen-Gingipain

Kgp ist die zweithäufigste Cysteinproteinase von *P.* gingivalis[79]. Es wird als großes Vorläuferprotein exprimiert, bestehend aus einer Führungssequenz, einem Profragment, einer katalytischen Domäne mit einer C-terminalen IgG-like Subdomäne (IgSF) und einer großen Hämagglutinin/Adhäsions-domäne[425]. Das *kgp*-Gen codiert im Endprodukt eine Protease, welche Lysin-spezifisch ist und aus fünf Domänen besteht: einem Propeptid, einer katalytischen Domäne und drei Adhäsin-/Hämagglu-tinindomänen[347, 336]. Kgp hat eine Bindungsaffinität zu Hämoglobin, die durch aktive Domäne(n) vermittelt wird, welche nicht mit der Proteinaseaktivität identisch ist[223]. Das Enzym besitzt entsprechend seiner Domänen auch eine Hämagglutininaktivität.
Im Rahmen einer Untersuchung wurden 108 *P. gingivalis*-Isolate von 104 Parodontitispatienten analysiert. Es bestätigten sich vier bereits bekannte *kgp*-Hämagglutiningenotypen in einer in Tabelle Nr. 4 aufgeführter Häufigkeitsverteilung. Auffällig ist, dass sich drei Viertel der Isolate auf nur zwei Subtypen verteilen[349].

Tabelle Nr. 4: Prävalenz der identifizierten Hämagglutininvarianten bei *P. gingivalis* Wildstämmen[349]

***kgp*-Hämtyp**		**N**	**%**
kgp-Häm U68464	381	43	39,81
kgp-Häm AF017059	W83	37	34,26
kgp-Häm AY559244	W83var	10	9,26
kgp-Häm U54691	HG66	18	16,67

Kgp ist in der Lage Proteinsubstrate wie BSA, Casein, Hämoglobin[223], säuregelöstes Typ-I-Kollagen der humanen Plazenta, humanes IgG und IgA zu hydrolysieren[79]. Das Enzym scheint spezifisch für die Aufhebung des Gerinnungspotentials von Fibrinogen zu sein und würde dann die Blutungsneigung respektive einen anhaltende inflammatorischen Effekt in von *P. gingivalis* infiziertem Parodont nahe legen[172]. Von den drei verschiedenen Gingipainen im humanen Plasma ist Kgp das potenteste Fibrinogen/Fibrin-inhibierende Protein[179], was sich auch im Tierversuch bestätigen läßt, wo es sich deutlich virulenter als die Arg-Gingipaine zeigt[306]. Kgp besitzt darüber hinaus noch die Eigenschaft, den Leukozyten C5a-Rezeptor zu inaktivieren, was das Bakterium vor durch C5a stimulierte Granulozyten schützen könnte[191].
Anhand von Sequenzanalysen erfolgte eine weitere Subtypisierung des *kgp*-Gens: *kgp-I* und *kgp-II*, welche auf Unterschieden in der katalytischen Domäne beruhen[38]. Die verschiedenen Allele von *kgp*

werden mit einer unterschiedlichen Virulenz dieser Spezies in Zusammenhang gebracht, da man bei Erkrankten immer einen vorherrschenden Biotyp nachgewiesen hat. Es obliegt zukünftigen Analysen zu beurteilen, ob eine Beziehung zwischen der Struktur und dem Stadium einer parodontalen Läsion und einer Assoziation zwischen den *kgp* Allelen und der Virulenz der Spezies existiert[281].

3.2 Bedeutung der Gingipaine für die Pathogenität von *P. gingivalis*

3.2.1 Gingipaine und fimbrienvermittelte Adhäsion, intrazelluläre Invasion und parazellulärer Pfad von *P. gingivalis*

Die Adhäsion[334] und Invasion von epithelialen Zellen durch *P. gingivalis* sind grundlegende Schritte der Pathogenese[103] der Parodontitis. In vitro Studien konnten zeigen, dass diese Spezies in transformierte als auch in primäre Epithelzellen eindringen kann[97, 226, 368, 463]. Dieses bestätigend konnte *in vivo* in Gewebeproben von bukkalem und von gingivalem Epithel der intrazelluläre Nachweis von *P. gingivalis* erbracht werden[228, 365].
Gingivale Keratinozyten verfügen zwar prinzipiell über einen Abwehrmechanismus gegen die Bindung und die Invasion dieser Organismen im Rahmen der Calprotectinexpression, die genauen Pathomechanismen und molekularen Interaktionen sind aber bis dato leider noch nicht geklärt[298].
Dafür ist bekannt, dass *P. gingivalis* dazu befähigt ist, das Zell zu Zell Adhäsionsmolekül E-Cadherin zu degradieren, ein Vorgang, der sich durch die Behandlung mit den spezifischen Inhibitoren Arginin und Lysin abschwächen lässt. Kgp vermag innerhalb der Gingipaine am potentesten diese Zell-zu-Zell-Verbindungen aufzulösen, auch mehr noch als seine katalytische Domäne alleine, jedoch ist dieser Effekt konzentrationsabhängig. Die guten Ergebnisse entstanden bei 500nM, bei 250nM kam der Effekt nicht mehr zu Stande, dass heißt, es gibt für diese proteolytische Aktivität einen kritischen Schwellenwert. Somit gibt es eine Evidenz dafür, das die Gingipaine, insbesondere Kgp, *P. gingivalis* auch über den parazellulären Weg den Eintritt in das Bindegewebe durch die Basalmembran hindurch erleichtern[207, 19, 49]. Auch führt eine künstliche Infektion stromaler Mäusezellen *in vitro* zu mehr als einer Verdopplung der Expression von unterschiedlichen Genen, darunter auch Gene für Zytokine wie Interleukin 6 (IL-6) und Matrixmetalloproteinase 13 (MMP 13)[312].
R-Gingipaine spielen direkt oder indirekt eine Rolle bei der Steuerung von Interaktionen mit gram-positiven Bakterien, oralen Epithelzellen und Typ I Kollagen im Bereich des margo gingivae[436]. Der Kontakt mit epithelialen Zellen unterdrückt aber auch andererseits (Typstamm *P. gingivalis* ATCC 33277) die Sekretion von Arg-Gingipainen und Lys-Gingipainen[326], die Arg-Gingipaine haben dabei anscheinend für das Attachment[436] und für die Invasion[326] keinerlei Bedeutung. Dafür spricht auch, dass bei der Spezies innerhalb von KB-Zellen eine Abwärtsregulation des *rgpA*-Gens eintritt[103]. Eine andere Arbeitsgruppe sieht zwischen Kgp und HRgpA eine synergistische Form der Zusammenarbeit, um dadurch einen schnelleren Zelladhäsionsverlust der Wirtszellen zu provozieren[384]. So wurde ein molekularer Komplex beobachtet, der aus LPS besteht, welche mit den katalytischen Domänen und der Hämagglutinindomäne Hgp44 von Rgp und Kgp assoziiert sind. Dieser Komplex verfügt über die Fähigkeit, Typ I Kollagen wie auch Elastin abzubauen und mit hoher Potenz die Lebensfähigkeit gingivaler Fibroblasten wie auch die der von Umbilicalvenenendothelzellen zu beeinträchtigen. Dieser Komplex vermag das mit einer Effizienz zu bewerkstelligen, die deutlich über das Maß von einfach monomeren Gingipainen hinausgeht. Der Komplex produziert dabei geringe Mengen an Stickstoffdioxid, TNF-α und IL-6 durch Makrophagen, wohin gehend ein hitzedenaturierter Komplex zu einer Zunahme der Produktion dieser Moleküle führt. So wird aus dieser Erkenntnis heraus interpretiert, dass dieser Komplex eine herausragende Bedeutung beim Unterlaufen der Wirtsabwehrmechanismen und dem daraus resultierendem Zusammenbruch der Wirtsgewebe hat[430].
Einige, jedoch nicht alle Typstämme scheinen sich dauerhaft in epithelialen Zellen halten zu können oder ihre Zellzahlen Tage nach einer Invasion sogar vermehren zu können[103, 245]. Einzelne Bakterien scheinen die Zelle dann auch wieder verlassen respektive sie anschließend wiederbesiedeln zu können[103]. Ein längeres Verweilen in einer Wirtszelle in einem nicht kultivierbaren Stadium wird diskutiert[103]. Sogar die insuffiziente Wirkeffizienz von Antibiotika gegen das intrazellulär persistierende Bakterium[102] könnte mit einer Phänotypveränderung von *P. gingivalis* zusammenhängen[103]. Weiterhin führt eine niedrige Arg-Gingipainkonzentration möglicherweise zu einer Stimulation der mitotischen Aktivität von Keratinozyten[103] und eine hohe HrgpA-Konzentration zu einer Unterdrückung dieser

Aktivität[377]. Auch führen extrazelluläre Proteinasen, explizit HrgpA, zu einem Verlust der Zelladhäsionsfähigkeit und zusätzlich zur Apoptosis in humanen epithelialen KB-Zelllinien[66, 377].
Eine Leukozytenmigraton aus dem Blutstrom heraus in das Gewebe hinein in Richtung einer Entzündung wird durch aufeinander folgende, interzelluläre Adhäsionprozesse an die Endothelzellen der Gefäßwände, kontrolliert. Das anfängliche Rollen sowie die Anbindungsschritte der PMN an die Endothelzellen werden durch Selektine wie dem ELAM-1 (oder auch E-Selektin, endothelial leukocyte adhesion molecule-1 genannt), und L-Selektin vermittelt. VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) und ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule 1), beide auf der zytokinaktivierten Endotheloberfläche lokalisiert, sind beim nächsten Schritt der Leukozyten-Endothel-Interaktion beteiligt, wenn eine engere Adhäsion folgt. Die Endothelzellen des chronisch entzündeten Parodontalgewebes exprimieren jedoch kein E-Selektin. Untersuchungen zeigen, dass ELAM-1, VCAM-1 und ICAM-1 sich in Endothelzellen nahe des Saumepithels schon relativ früh im Verlaufe von experimentell induzierter Gingivitis nachweisen lassen. Es wird vermutet, dass diese Moleküle eine Schlüsselstellung bei der Leukozytenmigration in das Gewebe und in Richtung des sulcus gingivae einnehmen[488]. Die Gingipaine können darüber hinaus die Expression von CD99 auf Endothelzellen reduzieren, was indirekt zu einer Störung der Adhäsionsmolekülexpression und der Leukozytenrekrutierung zum Entzündungsgeschehen hin, führt[490]. Das ICAM-1 oraler Epithelzellen ist nachweislich durch Gingipaine proteolytisch angreifbar[427, 462]. Zugleich führt die Infektion durch diese Spezies nach initialer Förderung der ICAM-1 mRNA Expression schon nach 8-20 Stunden postinfektionem zu einer Abwärtsregulation dieser Expression[167].
Die Bedeutung dieser Zelladhäsionsmoleküle wird bei schwerer und schnell progredienter Parodontitis deutlich, die durch Leukozytenadhäsionsdefizite charakterisiert ist und dementsprechend die PMN nicht adäquat befähigt sind, durch das Endothel der gingivalen Gefäße zu migrieren. Folglich ist die Expression von Leukozytenadhäsionsmolekülen eine kritische Determinante bei der Gewebeantwort auf die mikrobielle Herausforderung. Gingipaine haben offenbar auch hier einen Einfluss auf die Expression und die Funktion dieser Rezeptoren. Noch ein weiterer Effekt auf Endothelzellen ist beschrieben worden. Die Endothelzellen der Gefäße exprimieren PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1). Aktivierte Gingipaine können auch diese Expression herunter regulieren. Dieses lässt den Schluss zu, dass die Degradation von PECAM-1 durch Gingipaine wohl zu einer Zunahme der Gefäßpermeabilität und somit auch zu einer Zunahme des PMN-Durchflusses mit beiträgt[488].
Wie schon angedeutet, greifen die Gingipaine auch in die Regulationsmechanismen der Apoptose ein. Apoptose, oder programmierter Zelltod, ist eine physiologische Form des Zelltodes und hat eine charakteristische Morphologie bei einer determinierten Abfolge biochemischer Abläufe. Apoptotische Zellen lassen sich, einhergehend mit einer Zunahme von p53-positiven Zellen[119, 440] und einer Abnahme von Bcl-2-positiven Zellen[372, 440], auch innerhalb von parodontalen Läsionen finden[119, 220, 372, 440]. P53 und Bcl-2 sind bedeutende apoptoseregulierende Moleküle. Die Proteinasen von *P. gingivalis* können *in vitro* eine Apoptose in verschiedenen Zelltypen auslösen, einschließlich von Fibroblasten, Epithelzellen, Endothelzellen[24, 132, 192, 274, 381, 461] und KB-Zellen[69].
In den humanen gingivalen Fibroblasten wird in der Frühphase der Infektion mit *P. gingivalis* (2-12h) der proinflammatorische Transkriptionsfaktor NF-κB aktiviert. Dieses wird begleitet durch die Induktion von antiapoptotischen Genen. In der späteren Infektionsphase (24-36h) werden diese Gene größtenteils abgeschaltet und dafür proapoptotische Gene aktiviert. Die Gingipaine beeinflussen dabei die Bakterien-Wirt Interaktionen indem sie die Apoptose direkt durch intrazelluläre proteolytische Aktivierung von Caspase-3 fördern[447].
Eine andere Studie setzte Endothelzellen aus Koronararterien des Rindes respektive mikrovaskuläres humanes Endothel unterschiedlich aufbereiteten Gingipainen aus. Die Endothelien zeigten als Reaktion auf die Gingipaine einen schnellen Verlust ihrer Zelladhäsionseigenschaften, gefolgt von apoptotischem Zelltod. Gleichsam wird ein direkter Zusammenhang zwischen der Kinetik der beobachteten Spaltung von N- und VE-Cadherin sowie von Integrin β1 und der Zelladhäsion beschrieben. Die Folge von Attachmentverlust zwischen Endothelzellen sind apoptoseassoziierte Vorgänge wie Positivtestung auf Annexin V, Caspase-3-Aktivierung und die Spaltungen der Caspasesubstrate Poly(ADP-ribose)polymerase und Topoisomerase I (Topo I)[383]. Die Fähigkeit der Gingipaine, CAMs (cell adhesion molecules) zu spalten, konnte durch mehrere Studien bestätigt werden[23, 158, 207, 427]. Da die Gingipaine die Spaltung der CAMs mit resultierendem Zelladhäsionsverlust bewirken, kommt für diese besondere Apoptoseform ein spezieller Begriff ins Spiel, die sogenannte „Anoikis“. Diese wird gerade durch Zelladhäsionsverluste und dem Verlust von Integrinsignalen getriggert und wurde bis jetzt noch nicht vollständig charakterisiert[115]. Die Anoikis wird interessanterweise bislang mit pathologischen Prozessen wie kardiovaskulärer Erkrankung in Verbindung gebracht[265, 383].
Ein apoptotischer Zelltod kann auch in Abwesenheit aktiver Caspasen auftreten. Die Hemmung der Caspaseaktivität kann sogar einen sekundären caspaseunabhängigen Zelltod provozieren respektive

diesen verstärken. Wenn dem so ist, würde damit eine Art Sicherungsmechanismus für den Zelltod existieren. Diese caspaseunabhängige Apoptose kann auch durch Proteinasen getriggert werden. Kürzlich erst hat sich herauskristallisiert, dass sowohl gingipainaktive *P. gingivalis* W83 Extrakte wie auch gereinigtes HRgpA und RgpB in Abwesenheit von aktiver Caspase apoptotische Morphologien induzieren können. Dieses Ergebnis führt zu der Annahme, dass die Gingipaine nicht nur eine caspaseabhängige, sondern ebenso eine caspaseunabhängige Apoptose bei Endothelzellen verursachen können[384]. Man kann anhand der vorliegenden Einzelerkenntnisse zusammenfassend sagen, dass die Gingipaine in jedem Fall auf die eine oder andere Weise mit zum Überleben der Spezies innerhalb von humanen endothelialen Zellen beitragen[475].
Viele dieser Beobachtungen unterstützen die Theorie, dass *P. gingivalis* auch über den parazellulären Weg Zugang zu den tieferen Strukturen des Bindegewebes dadurch gewinnt, dass epitheliale interzelluläre Adhäsionsmoleküle abgebaut werden oder dass die Zytoskelette der Wirtszellen entsprechend moduliert werden. Gingipaine können diese Mechanismen wohl auch darüber fördern, dass sie auf der Epithelzelloberfläche die Abstoßung des Zelloberflächenproteoglykans Syndecan-1 fördern. Syndecan-1 funktioniert als Korezeptor für verschiedene Wachstumsfaktoren und Matrixmoleküle wie bFGF (basic fibroblast growth factor), Kollagen und Fibronektin. Solch ein Abstoßungsprozess kann ebenso eine wichtige Rolle bei der bakteriellen Invasion des Parodontalgewebes und der Modulation der Wirtsabwehr spielen[20].
In einem *in vitro* Modell mit humaner oraler Mukosa (EHAM, engineered human oral mucosa) konnte letztens gezeigt werden, dass *P. gingivalis* die MMP- (matrix metalloproteinases) und die TIMP- (tissue inhibitors of metalloproteinases) Produktion von Epithel wie auch von Fibroblasten regulieren kann. Im oralen Epithel steigerte die Spezies signifikant die MMP-2 und MMP-9 mRNA Expression. Dabei verlief die MMP-Genaktivierung parallel zu der der TIMP-2-Gene. Die zum Vergleich verwendete Gingipain-null-Mutation vermochte lediglich die MMP-9 mRNA Expression zu steigern. Auch diese durch *P. gingivalis* provozierten Phänomene haben das Potential, zu den Gewebedestruktionen, die mit einer Parodontitis einhergehen können, beizutragen[21, 133].
Um einen weiteren Schlüsselfaktor bei der initialen Interaktion zwischen *P. gingivalis* und den humanen oralen Epithelzellen handelt es sich offenbar bei den Fimbrien dieser Spezies. Diese steuern direkt zum initialen Attachment der Spezies an die Epitheloberfläche der Mukosa bei[463, 347].
Die katalytische Aktivität der Gingipaine moduliert das Attachment von *P. gingivalis* an den epithelialen Zellen, wobei die Adhäsindomänen involviert sind und wahrscheinlich ist ein ganzer Proteinkomplex hieran beteiligt[66]. Einige Daten unterstützen den Vorschlag, dass Proteinasen und andere mit ihnen verwandte Genprodukte als eine Adhäsinfamilie fungieren können, die sich von anderen Oberflächenkomponenten dieses Organismus mit spezialisierterer Adhäsionsfunktion abheben[76]. Speziell gegen die Adhäsionsdomäne von „Arg-Gingipain A“ gerichtete Antikörper blockieren die Fähigkeit, bakterielles Attachment an Epithel zu entwickeln. Dadurch entstand für die Theorie, dass die Adhärenz von *P. gingivalis* an Epithel durch Adhäsinpeptide der Gingipaine vermittelt wird, noch zusätzliche Evidenz[495]. Eine Hypothese dabei ist, dass die katalytische Aktivität der Gingipaine die extrazellulären Matrixproteine auf der Oberfläche von Gingivafibroblasten spaltet, um kryptisch bindende Epitope für Fimbrienadhäsine zu exponieren[66, 218, 219]. *P. gingivalis* mit Typ II Fimbrien dringen sehr effizient in Epithelzellen ein und bauen fokale Adhäsionskomponenten wie Paxillin und FAK (focale adhesion kinase) durch das Arg-Gingipain ab. Diese Eigenschaft führt nachgewiesener Maßen zu einer Verschlechterung der Wundheilung und der parodontalen Regeneration[283].
Auch an anderer Stelle spielen die R-Gingipaine eine Schlüsselrolle, denn sie regulieren die Synthese von Fimbrien aus Profimbrilin, gleiches gilt auch für das 75kDa-Protein[391]. Gingipain R kann sogar die Bindung an kultivierte Fibroblasten, den eben erwähnten extrazellulären Matrixproteinen[218] als auch zu Fibronektin[219] steigern. Gleichsam sind die Fimbrien, zusammen mit den Oberflächenvesikeln, bedeutende Strukturen für die Koadhäsion zu *A. naeslundii*[106] und in der Konsequenz vermutlich auch der Biofilmbildung zuträglich.
Die Bedeutung der Fimbrien näher untersuchend fand man bei Patienten mit aggressiver Parodontitis als prävalentesten *fimA* Genotyp den Typ II (46,7%) gefolgt von den Typen Ib und I, dagegen bei Gesunden ausschließlich den Typ I *fimA*. Die Arg- wie auch die Lys-Gingipainaktivität ist beim *fimA* Typ I- Typstamm signifikant höher als beim *fimA* Typ II-Typstamm. Die Koadhärenz mit anderen Pathogenen bei der *P. gingivalis fimA* Typ II-assoziierten aggressiven Parodontitis wie auch die quantitative Zunahme von *P. gingivalis* bei der *fimA* Typ I-assoziierten Parodontitis stehen im engen Bezug zu der Virulenz dieser Spezies[270]. Innerhalb der *Rgp*- und der *Kgp*-Gensequenz befindet sich weitere Abschnitte, die für die HGP-17 Domäne kodieren, einem Protein, dass für die vesikelassoziierte Koaggregation dieser Organismen zu *P. intermedia* verantwortlich ist. Solche Koaggregationen unter Bakterienzellen dienen als potentielle Kolonisationsmechanismen[202].

3.2.2 Effekte auf die Integrität des Bindegewebes

Gingipaine degradieren *in vitro* extrazelluläre Matrixkomponenten wie Laminin, Fibronektin und Kollagen Typ III, IV und V[401, 376, 347]. Trotz der beeindruckenden Gesamtheit von destruktiven Einzeleffekten auf Wirtszellen, extrazellulärer Matrix und Basalmembranen reicht dieses nicht aus, Gingipaine als alleinverantwortliches Substrat für die Erklärung einer Parodontitisprogression zu machen[347]. Nicht natives Typ I Kollagen (Hauptbestandteil von Kollagenfasern, welche ca. 60% des bindegewebigen Volumens ausmachen) scheint nicht durch Gingipaine gespalten werden zu können [30, 347], wobei dazu auch gegenteilige Aussagen zu finden sind[37, 165, 196, 347]. Der Effekt einer Typ I Kollagenspaltung könnte vielleicht auch indirekt durch eine Stimulation der Proteinasefreisetzung von Wirtszellen des Bindegewebes zu Stande kommen[347], dieses Problem wird gegenwärtig noch kontrovers diskutiert.
Konsens existiert hinsichtlich der Eigenschaft von Gingipain K, MMP-1 und MMP-9 zu prozessieren/aktivieren, Gingipain R prozessiert/aktiviert spezifischer das MMP-3. Dieses hat eine Degradierung von Zelloberflächen und Matrixglykoproteinen in Kulturfibroblasten zur Folge, welche aktive Formen von Kollagenase und Plasminogenaktivator sekretieren[445, 83]. Die Toxizität von *P. gingivalis* gegenüber humanen Gingivafibroblasten ist schon seit längerem bekannt[192, 274]. Nun ließ sich diese Beobachtung genauer den Gingipainen, besonders dem Arg-Gingipain zuordnen. Schon allein diese Proteinasen verfügen über einen ausgeprägten, zellschädigenden Effekt auf humane Gingivafibroblasten, der über die negativen Einflüsse der Lipopolysaccharide und der Stoffwechselendprodukte dieses Organismus deutlich hinaus geht[141]. Neben der Fähigkeit von Gingipainen, über die Aktivierung von MMP´s indirekt zur Schädigung von Geweben beizutragen, inaktivieren sie auch noch zusätzlich Proteinaseinhibitoren des Wirts[135, 19]. So wird auch die Expression von SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor), ein endogener Inhibitor für die von PMN stammenden Proteinasen, bei der *P. gingivalis* assoziierten chronischen Parodontitis im gingivalen Gewebe supprimiert. Auch hier sind die Rgp´s verantwortlich, obendrein „verdauen“ sie, zumindest *in vitro*, noch zusätzlich das SLPI-Molekül. Durch die von Rgp verursachte Störung der SLPI Funktionen, welche normalerweise der Elastaseproduktion der PMN entgegensteuert und bakterielle, proinflammatorische Bestandteile schützt, beschleunigen sich pathogene Prozesse zumindest im Bereich erkrankter Gingiva[185].
Wie sich auch zeigte, vermögen gereinigte Gingipaine die Synthese von latenten MMP (Kollagenase und Stromelysin) im Mukosaepithel von Ratten zu steigern ebenso wie in humanen Fibroblasten[83, 84].
An Synovialfibroblasten von Kaninchen wurde durch die künstliche Blockade des Fibronektinrezeptors nachgewiesen, dass Abbauprodukte der extrazellulären Matrixkomponenten wiederum einen kollagenabbauenden Phänotyp der epithelialen und bindegewebigen Zellen induzieren können[496]. Gingipain R ist in der Lage, direkt den Abbau von Fibronektin zu begünstigen als auch den $\alpha_5\beta_1$-Integrinrezeptor auf humanen Gingivafibroblasten abzubauen. Dieser Rezeptor spielt eine dominierende Rolle in der Regulation der Expression von Kollagenase, Stromelysin und 92-kDa Gelatinase in Fibroblasten. Der Abbau dieses Rezeptors führt in der Konsequenz direkt zur Destruktion von Bindegewebe bei der Parodontitis[347].
Eine andere Arbeitsgruppe beobachtete, dass Arg-Gingipain für die Unterbrechung der Fibrinogen-Integrin Interaktionen in humanen Gingivafibroblasten verantwortlich ist, was zu einem zeitabhängigen Verlust an zellulärer Adhäsionsaktivität führt. Die Integrinuntereinheiten α2, β1 und β3 der Fibroblasten verschwinden, was diese Zellen apoptotisch werden lässt. Bei *P. gingivalis* Mutationen ohne Arg-Gingipain haben diese kaum einen Einfluss auf die Zelladhäsionsfähigkeit oder die Lebensfähigkeit von Fibroblasten[23, 483]. Eine neuere Untersuchung ergab, dass die Spezies durch einen Proteinkinase A und AIF (apoptosis-inducing factor) beinhaltenden Pfad die Apotose von Fibroblasten verursachen kann. Dieser Weg ist unabhängig von der bakteriellen proteolytischen Aktivität und folglich ebenso unabhängig von den klassischen Apoptosewegen, welche unbedingt Caspase-3 benötigen[91].
Da Fibronektin nicht nur auf der Oberfläche humaner Gingivafibroblasten, sondern ebenso in der azellulären Matrix des Bindegewebes zu finden ist[417], spielt dieses Molekül vor allem bei der Zelladhäsion, dem Vorkommen, der Proliferation sowie diversen weiteren biochemischen Aktivitäten der Fibroblasten eine wichtige Rolle[433, 459]. Diese Beobachtungen könnten eine Form der Virulenz widerspiegeln, die zu einem Angriff auf die Fibronektin-Integrin-Interaktionen in der parodontalen Tasche führen würde. Eine solche Attacke würde wiederum die Bindung an die extrazelluläre Matrix erlauben und somit zu einer Steigerung der Adhärenz an Epithelzellen, gegebenenfalls gefolgt von einer Invasion dieses Zelltyps, führen. Resultat wären die bekannten Destruktionen des Parodonts[23].
Das Auftreten von Gingipainen und von Dipeptidylpeptidase in der Sulkusflüssigkeit kann sogar zur Vorhersage einer Progression der Erkrankung beziehungsweise zur Vorhersage von parodontalen Attachmentverlust dienen[105].

Eine noch sehr junge Untersuchung beschäftigte sich mit der Genexpression von RANKL (Receptor Activator of NF-κB ligand) und von OPG (Osteoprotegerin) in PDL (human periodontal ligament) Zellen und in Gingivalfibroblasten in Reaktion auf *P. gingivalis* W50. RANKL kann die Knochenresorption stimulieren, OPG wirkt dem antagonistisch entgegen. Der Wildtyp verursachte im Ergebnis eine Zunahme des Expressionsverhältnisses RANKL/OPG bei den PDL Zellen wie auch bei den Gingivalfibroblasten. Eine Lys-Gingipain defizitäres Derivat des Wildtyps hatte keinen Einfluss, dagegen provozierte eine Arg-Gingipain defizitäre Mutation einen weiteren Anstieg der RANKL mRNA Expression, beide verglichen mit dem elterlichen Typstamm[41, 314]. Es liegen zwar noch weitere Untersuchungen vor die einen Zusammenhang zwischen *P. gingivalis* und einem mit den RANKL/OPG Interaktionen verbundenen Knochenverlust bei Patienten mit Parodontitis herstellen können[120], weitere Evidenz für den expliziten Einfluss von Gingipainen gibt es jedoch zur Zeit noch nicht.

3.2.3 Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems

Die Leber synthetisiert Prohormone wie das Angiotensinogen oder das Kininogen. Aus dem Kininogen werden durch eine als Kallikreine bezeichnete Gruppe von Proteinasen die sogenannten Kinine synthetisiert. Diese sind zum einen das Nonapeptid Bradykinin, zum anderen das Dekapeptid Kallidin.
Kallikreine werden aus den entsprechenden Proenzymen, den Präkallikreinen gebildet und kommen im Plasma (Plasmakallikreine) oder in bestimmten Zellen wie beispielsweise den Granulozyten, in Zellen der Speicheldrüsen oder der Nieren vor (Gewebskallikreine). Gewebskallikreine setzen aus Kininogen das Kallidin frei, Plasmakallikreine dagegen das Bradykinin. Für die Aktivierung des Prokallikreins zu Kallikrein ist der Hageman-Faktor (XII) notwendig. Kinine aktivieren die Prostaglandinsynthese, das dabei entstehende Prostaglandin E ist für die Dilatation arterieller Gefäße verantwortlich. In einigen Geweben wird Prostaglandin E in Prostaglandin F überführt, was eine Kontraktion der glatten Muskulatur bewirkt (zum Beispiel Bronchien, Darm). Die freigesetzten Prostaglandine können aber auch ebenso Schmerzrezeptoren stimulieren.
Gingipain R aktiviert die Kallikrein- und Bradykininbildung, Gingipain K ausschließlich die Letztere, somit begünstigen beide Proteinasen die Vasodilatation und die Zunahme der Gefäßpermeabilität, was sich vorteilhaft auf die Substratversorgung und damit auf das Wachstum und die Virulenz von *P. gingivalis* auswirkt (Abb. 6)[157, 171, 172, 179]. Es wurde diese Eigenschaften betreffend kein Unterschied zwischen HRgpA und RgpB festgestellt[175].

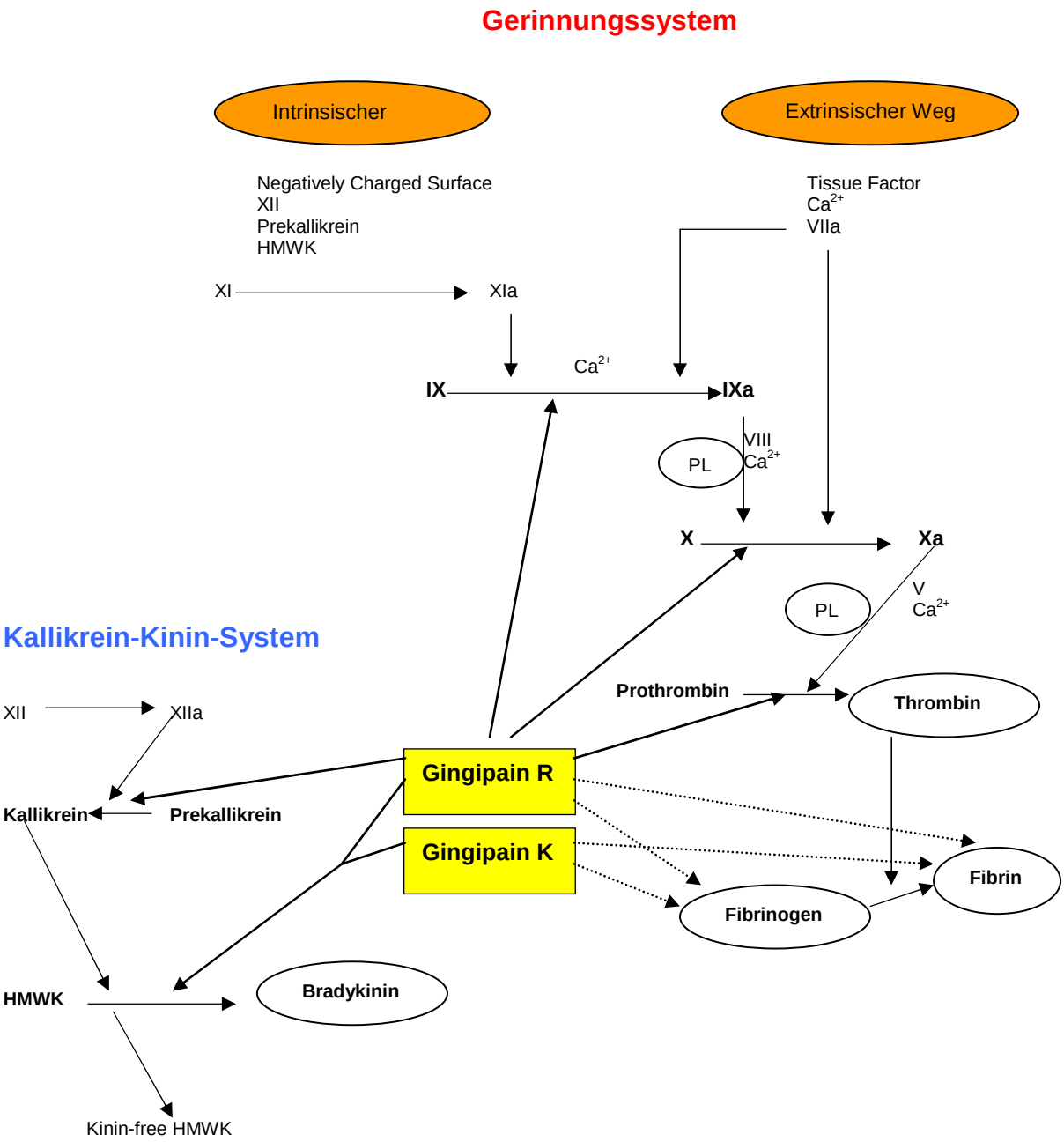

Abb. 6: „Die Angriffspunkte der Gingipaine im Kallikrein/Kinin-System und im Blutgerinnungssystem“ frei nach Imamura (2003). Durchgezogene Pfeile beschreiben aktivierende / freisetzende, unterbrochene Pfeile deaktivierende Prozesse. HMWK= high molecular weight kininogen[179].

Holt et al.[161] sprechen dagegen Gingipain K die Fähigkeit, Gefäßpermeabilität zu induzieren ab und berufen sich dabei auf eine Arbeit aus dem Jahr 1993[204]. Hiernach seien exklusiv die R-Gingipaine für die Steigerung der Gefäßpermeabilität verantwortlich. Das RgpA bewirkt eine konzentrationsabhängige Zunahme der Plasmaexsudation der oralen Mukosa, was wiederum durch einen selektiven antagonistischen Bradykinin B_2-Rezeptor inhibiert werden kann. Leupeptin wie auch andere Proteinaseinhibitoren blocken ebenso diese Funktion der RgpA-induzierten Antworten[364].
Die oben bereits erwähnten Bradykinine scheinen, vermittelt über die Prostaglandinsynthese in Osteoblasten und Periodontal Ligament Cells, an Alveolarknochenresorption beteiligt zu sein[357, 351]. Synergistische Effekte zwischen Bradykinin und Interleukin-1, Thrombin, und Haptoglobulin (Akute Phase Protein) gesellen sich hinzu[357, 233].

Abschließend betrachtet könnten die Gingipaine nicht nur für *P. gingivalis* die Funktion haben, eine Quelle für Peptide mit niedrigem Molekulargewicht für das eigene Wachstum, die Reproduktion und die Virulenz aufrecht zu erhalten, sondern vielleicht sind die Gingipaine auch für die anderen Mitglieder der parodontalpathogenen Mikroflora wie *T. denticola* und *T. forsythia* förderlich[161]. Für RgpB wurde dieses schon postuliert, RgpB wirkt sich positiv aus auf die gemeinsame Biofilmbildung mit *T. denticola*[473]. Unter pathophysiologischen Gesichtspunkten muss auch die Möglichkeit betrachtet werden, dass in erkrankten Arealen die Kininogenspaltung durch Proteinasen bakterieller als auch leukozytärer Herkunft (PMN, Elastase) erfolgen kann und dort auch andere Kinine neben Bradykinin und Kallidin entstehen können. So können innerhalb von Läsionen durch die dortigen Proteinasen und durch alternative Spaltungen der Kininogene neue biologisch aktive Kinine generiert werden. Diese Interaktion von bakteriellen und körpereigenen Proteinasen erschwert sicherlich eine zukünftige medikamentöse Intervention[181].

3.2.4 Aktivierende Einflüsse auf das Gerinnungssystem

Calciumionen (Faktor IV) und die von Leberparenchymzellen gebildeten Plasmaproteine Fibrinogen (Faktor I) und Prothrombin (Faktor II) sind ständig im Blut zirkulierende Gerinnungsfaktoren. Diese Faktoren setzen im Falle einer Gewebeverletzung nach Freisetzung von Gewebethromboplastin (Faktor III) eine Gerinnung in Gang. Gewebethromboplastin setzt in Gegenwart von Calciumionen das Proenzym Prothrombin zu Thrombin um, einer hochaktiven Protease, die in kürzester Zeit Fibrinogen zu Fibrin umwandelt (Abb. 6). Diese Kaskade wird auch als exogenes (extrinsisches) oder extravaskuläres Gerinnungssystem bezeichnet.
Das endogene (intrinsische) oder intravaskuläre Gerinnungssystem wird durch Kontakt mit „ungewohnten“ Oberflächenstrukturen wie freiliegenden Kollagenfasern oder Kunststoff aktiviert und führt ebenso über proteolytische Prozesse vom Thromboplastinkomplex zur Fibrinbildung. Gemeinsame Schnittstelle beider Gerinnungskaskaden ist der Faktor X (Stuart-Prower-Faktor).
Das oben erwähnte Thrombin sorgt neben der Fibrinbildung für eine Steigerung der Gefäßpermeabilität[89], für die Chemotaxis und die Aggregation von neutrophilen Granulozyten[44, 31]. Beide Eigenschaften steuern zur Sulkusflüssigkeitsentstehung und zur PMN-Anreicherung in von Parodontitis betroffenen Arealen bei[179]. Thrombin steigert die Prostaglandinsyntheserate von Osteoblasten[327] sowie die lipopolysaccharidvermittelte Interleukin-1-Synthese von Makrophagen[194]. Beide, Prostaglandin und Interleukin-1, sind in der Sulkusflüssigkeit bei der chronischen Parodontitis in erhöhtem Maße nachgewiesen worden, wodurch man die Korrelation zu Gewebedestruktion und Parodontitis bestätigen konnte[311, 254]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass Thrombin die Knochenresorptionsrate von Osteoklasten gleichsam prostaglandininduziert stimuliert[159].
Die Progression der Parodontitis einhergehend mit der Knochenresorption des Alveolarknochens scheint mit einer überschießenden Thrombinsynthese, welche wiederum durch die Gingipaine gefördert wird, vergesellschaftet zu sein[179]. Die R-Gingipaine (RgpB und HRgpA) induzieren eine intrazelluläre Kalziumzunahme bei Thrombozyten und verursachen so, ähnlich wie bei Thrombin, eine Thrombozytenaggregation, immer jeweils abhängig von der proteolytischen Aktivität der Enzyme[161]. Die Plättchenaggregation durch R-Gingipaine ist dosisabhängig und lässt sich durch Leupeptin und Arginin inhibieren[338]. RgpB und HRgpA scheinen dazu mit proteinaseaktivierten Rezeptoren PAR-1-4 zu interagieren, welche sich auf der Thrombozytenoberfläche befinden[242].
Gleichermaßen ist *P. gingivalis* befähigt, Thrombozyten in PRP (platelet-rich plasma) zu aggregieren. Vor Kurzem wurde dieser Mechanismus genauer untersucht. Proteinaseinhibitoren gegen Arg-Gingipain (Rgp) und Lys-Gingipain (Kgp) können die *P. gingivalis* induzierte Plättchenaggregation in PRP nicht unterdrücken, wohingegen der Rgp-Inhibitor bei gereinigten Plättchen die Aggregation deutlich zu hemmen in der Lage ist. Man fand heraus, dass die von *P. gingivalis* induzierte Plättchenaggregation in PRP von Rgp-, Kgp- und Hämagglutinin A (HagA)-kodierenden Genen abhängig ist, welche intragenetisch für Adhäsine wie Hgp44 kodieren. Dieses Hgp-Adhäsin wird von Rgp und Kgp prozessiert und gilt als essentiell für diese von *P. gingivalis* induzierte Plättchenaggregation in PRP. Als mitverantwortliche Komponenten für diesen Mechanismus stellten sich das *P. gingivalis* zellreaktive IgG des Plasmas, der FcγRIIa-Rezeptor und auch im geringerem Ausmaß der GPIbα-Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche heraus[282].
Gingipain R- Proteinasen sind, wie aus der Abb. 6 erkennbar, in der Lage die Gerinnungsfaktoren II (Prothrombin)[178], IX (Christmas-Faktor)[177], X (Stuart-Prower-Faktor)[174] zu aktivieren. HRgpA kann insgesamt die Blutgerinnungszeit, verglichen mit RgpB, fünfmal so gut verkürzen[174], so dass man

HRgpA mit seiner Hämagglutinin/Adhäsions-Domäne insgesamt als deutlich potentere Proteinase ansehen darf[179]. Des Weiteren kann Gingipain R auch das Protein C aktivieren, was zu einem verstärkten Verbrauch an Protein C führt[164]. Protein C hemmt die Faktoren V und VIII und ist somit ein wichtiges Regulationsprotein. Ist es durch den Gingipain R-Effekt weniger vorhanden, ist dieses für beide Gerinnungskaskaden entsprechend förderlich und letztendlich auch, wie oben beschrieben, günstig für das Fortbestehen oder vielleicht auch die Progredienz der Parodontitis.

3.2.5 Hemmende Einflüsse auf das Fibrinogen–Fibrin-System

Das Vorhandensein von *P. gingivalis* in der parodontalen Tasche korreliert signifikant mit dem BOP (bleeding on probing), einem schwach sensitiven Zeichen für den eventuell stattfindenen entzündlichen Prozess und damit für eine vielleicht mögliche Progredienz der Erkrankung[11]. Gingipaine sind in der Lage, Fibrinogen binnen Minuten abzubauen[340] und die Bildung eines Gerinnsels zu unterbinden, Gingipaine können sogar das Fibrin wieder auflösen[175]. Bei der Prolongation der Gerinnungszeit scheint hier jedoch diesmal Kgp effizienter zu sein als Gingipain R, was seiner Interaktionsfähigkeit mit Fibrinogen zuzuschreiben ist[173]. Dazu kommt, dass kein plasmatischer Proteinase-Inhibitor in der Lage ist, Kgp effektiv zu supprimieren[143]. Kgp zeigt eine starke fibrinogenolytische und fibrinolytische Eigenschaft, die durch die Proteinase-Inhibitoren des Wirtes nicht kontrolliert werden können. Diese Eigenschaft des Kgp ist ursächlich für die Blutungstendenz des Parodonts bei der Parodontitis mitverantwortlich[179].

3.2.6 Beeinträchtigung der Immunabwehr des Wirts

Das Immunsystem besteht unter anderem aus Makrophagen, die in Zusammenarbeit mit polymorphkernigen Granulozyten eine erste Barriere gegen infektiöse Krankheitserreger darstellen. Auf diese sogenannte unspezifische (auch als angeboren bezeichnete) Immunabwehr fußt die einige Tage später einsetzende adaptive Immunantwort, welche sich spezifisch gegen den Krankheitserreger richtet. Ihre Grundsäulen sind die T- und B-Lymphozyten. Die differenzierten Abkömmlinge der B-Lymphozyten, die Plasmazellen, synthetisieren und sezernieren diverse Antikörper mit jeweils unterschiedlicher Bindungsspezifität für die jeweiligen Antigene. Die T-Lymphozyten sind für die zelluläre Abwehr zuständig, die in erster Linie gegen intrazelluläre Erreger, aber ebenso gegen transformierte körpereigene Zellen gerichtet ist.
Ruhende T- und B-Lymphozyten zirkulieren im Blut und wandern kontinuierlich in sekundäre Lymphorgane wie Lymphknoten, Tonsillen oder Milz ein. Durch einen Antigenkontakt werden sie aktiviert und nehmen ihre Funktion auf.
Wenn Bakterien erfolgreiche Kolonisatoren der subgingivalen Region einer inflammatorischen Reaktionslage zum Trotz sein können, müssen sie Mechanismen entwickelt haben, diese Immunantwort zu untergraben. Ein von *P. gingivalis* praktizierter Weg wird auch, dem militärischem Jargon entlehnt, mit „stealth technology“, in unserem Sprachgebrauch auch synonym mit dem Begriff „Tarnkappenbomber“, tituliert. Damit wird der Eintritt in Wirtszellen, vornehmlich Epithelzellen, mit dem Ziel, sich in einem privilegierten und vom Immunsystem akzeptierten Raum aufhalten zu können[227], umschrieben.
Speziell bei *P. gingivalis* scheinen die Gingipaine eine Schlüsselrolle in den Ausweichstrategien dieser Spezies gegenüber der Immunantwort des Wirtes zu spielen[179]. *P. gingivalis* erweist sich als äußerst resistent gegenüber dem Abwehrfaktor Komplementsystem[341, 398]. Vermutlich verursacht Gingipain R in der flüssigen Phase eine Komplementsystemaktivierung. Diese wird durch den D-like Faktor induziert[373, 374], der für die Bildung einer C3-Konvertase verantwortlich ist, was auf dem alternativen Weg des Komplementsystems zu einem Komponentenverbrauch führt[374, 179](siehe auch Abb. 7). Dadurch würden sich die Voraussetzungen für eine Bakteriolyse durch Komplementaktivierung auf der Bakterienoberfläche verschlechtern. RgpB kann sehr leicht den zentralen Faktor des alternativen Weges, das C3 degradieren[464], so dass das daraus auf proteolytischem Weg entstehende C3b nicht

mehr entstehen kann. Gerade dieses C3b fungiert jedoch als wichtiges Opsonin und C5a, der chemotaktischer Faktor für Phagozyten kann nun ebenso wenig entstehen wie der „Lytische Komplex“, der zur Porenbildung in der Zellmembran führt[464]. Gleichsam wurde für Kgp der Nachweis erbracht, den C5a-Rezeptor spalten zu können[190].
Eine neuere Untersuchung bestätigt diese Ergebnisse, die *P. gingivalis*-Wildtypen W50 und W83 führten experimentell zu einer drastischen Abnahme bakterizider Aktivität humanen Serums. Dieses Ergebnis kann auf die Aktivität aller drei Cysteinproteinasen zurückgeführt werden, doch sind die argininspezifischen Gingipaine (vor allem HRgpA aber auch RgpB) diesbezüglich effizienter als das lysinspezifische Gingipain (Kgp). Alle drei Proteinasen können auch, bei entsprechend geringer Konzentration in humanem Serum, den C1-Komplex aktivieren. Beispielsweise hemmen die Gingipaine schon bei nur geringen Konzentrationen den klassischen Pfad, wohingegen der alternative Pfad selbst bei höchsten Gingipainkonzentrationen nur zu maximal 50% inhibiert wird. Grundsätzlich jedoch interferieren Gingipaine mit allen drei Pfaden (klassischer Pfad, alternativer Pfad und Lektin Pfad), nur sind die Wirkungsgrade von jedem Gingipain bei den einzelnen Pfaden unterschiedlich ausgeprägt. Interessanterweise ist der C1-Komplex besonders resistent gegenüber dem proteolytischen Abbau, jedoch sind paradoxerweise die eher niedrigen Proteinasekonzentrationen der Degradation des C1-Komplexes eher förderlich als die höheren. Die Autoren postulieren, dass *P. gingivalis* Komplement aktiviert, wenn es in nur geringer Zellzahl vorhanden ist. Dieses resultiert somit in einer lokalen, inflammatorischen Reaktionslage und bietet damit den Bakterien Kolonisationsmöglichkeiten und Nährstoffe. In einem späteren Infektionsstadium mit höheren Zellzahlen und folglich höheren Proteinasekonzentrationen sind die Gingipaine in der Lage, Komplementfaktoren zu zerstören und den Bakterien somit zu einer Resistenz gegenüber der bakteriziden Aktivität des Komplementsystems zu verhelfen. Die Gingipaine scheinen aber auch noch weitere Komplementfaktoren des Systems negativ zu beeinflussen, wie die teilweise bereits erwähnten C3, C3b, C4, C4b, C5 und C9[341, 92]. Vor wenigen Jahren wurde dagegen eine Arbeit veröffentlicht, die die Resistenz dieser Spezies gegenüber dem Komplementsystem explizit auf das Vorhandensein eines anionischen Oberflächenpolysaccharids (APS) zurückführen konnte[398]. Vermutlich ergänzen sich die Effekte der Gingipaine und der Einfluss des APS synergistisch.
HRgpA kann explizit diese Reaktivität der PMN deutlich drosseln[196]. Somit führen verschieden Mechanismen dazu, dass die Gingipaine die Migrationsfähigkeit der PMN in Richtung des Infektionsherdes beeinträchtigen können. Neben Immunzellrezeptoren wie CD4 und CD8 zerstören Gingipaine auch den CD14-Rezeptor der Monozyten, einem Lipopolysaccharidrezeptor[211, 426, 421, 96].
Die Lipopolysaccharide von *P. gingivalis* induzieren somit eine insuffiziente, hyporesponsive Reaktionslage seitens der Makrophagen respektive der Monozyten, es wird in der Folge nicht mehr genug phagozytiert und es werden auch nicht mehr genug Zytokine exprimiert, um das weitere Immunsystem zu aktivieren, was den chronischen Charakter der Parodontitis erklären könnte[179]. Hinzu kommt, wie eine Gruppe berichtet, dass „Argingipain“ die Funktion der PMN in dem Sinne stört, als dass sie einen hemmenden Effekt auf die Bildung von Sauerstoffradikalen hat[196, 161].
Die Gingipaine hydrolysieren daneben auch das Zytokin IL-12, entsprechend reduziert sich die IL-12 induzierte Interferon-γ Produktion der CD4 Zellen. Man vermutet, dass diese Inaktivierung von IL-12 Th2 Zellen und die Progression der Parodontitis begünstigen könnte[485]. Vesikel der äußeren Membran der Zellwand (Outer membrane (OM) vesicles) von *P. gingivalis* können andererseits auch eine Interleukin-12 induzierte Interferon-γ Produktion bei T-Zellen bewirken. Dieser Effekt wird den Lipopolysacchariden zugeschrieben und führt zu der Vermutung, dass darin ein Potential zur Produktionssteigerung von inflammatorischen Enzymen in Bezug auf die Immunopathologie der Parodontitis liegt. Gingipaine könnten für eine reduzierte Interferon-γ Akkumulation in der Gegenwart von IL-12 verantwortlich sein. Die Zugabe von Gingipainen zu Lipopolysacchariden führt zu einer teilweisen Wiederherstellung des Interferon-γ Spiegels. In einer destruierenden parodontalen Läsion führt die Freisetzung von Gingipainen aus der OM zu einer Abwärtsregulation der Th-1-Antwort. Sind dagegen Gingipaine mit den Lipopolysacchariden der OM assoziiert oder in outer membrane vesicles eingebunden, resultieren eher stimulatorische Effekte[486]. Die Gingipaine heften sich an die Oberfläche der T-Zellen, spalten CD2 und CD4 Moleküle und haben so das Potential, die T-Zellantwort im Gebiet parodontaler Läsionen zu verschlechtern[489].
Ein weiteres involviertes Interleukin ist das Interleukin-8 (IL-8). Es wird überwiegend nur von stimulierten Monozyten produziert, daneben aber auch von Makrophagen (aber nicht von gewebeständigen), Fibroblasten, Endothelzellen, Melanozyten, Hepatozyten und Chondrozyten. Seine Synthese wird durch Interleukin-1 und Tumor Nekrose Faktor-α (TNF-α) stimuliert, während Glucocorticoide und Transforming growth factor (TGF-β) die Synthese hemmen. IL-8 unterscheidet sich von allen anderen Zytokinen dadurch, dass es spezifisch neutrophile Granulozyten aktiviert. IL-8 verstärkt unter anderem die Chemotaxis sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen, es inhibiert die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen[169]. Gingipain R und Kgp spalten in gelöster Form diesen chemotaktischen Faktor an zwei Stellen der Aminosäurenkette, die entstehenden beiden

Produkte sind zwei- bis dreimal so potent wie das ursprüngliche IL-8. Sind dagegen die Gingipaine in Vesikeln eingebunden, degradieren sie IL-8 sofort und hemmen damit sein chemotaktisches Potential[268, 477, 492].
Möglicherweise ist eine Zunahme der IL-8 Freisetzung von mit *P. gingivalis* infizierten epithelialen Zellen 2 bis 3 Tage postinfectionem ein Resultat der intrazellulären Lokalisation des Bakteriums, zelloberflächengebundene Proteinasen können nicht mehr auf freigesetztes IL-8 einwirken, die mRNA Expression zumindest von *rgpA* ist herunterreguliert[103, 167]. Lipopolysaccharide, welche sonst ein Stimulus für die Zytokinexpression sind, sind hierfür nachweislich nicht verantwortlich, sie reagieren weder mit Epithelzellen der Gingiva noch mit KB Zellen[443]. Auch hat sich herauskristallisiert, dass Gingipain R den CD14-Rezeptor spalten kann. Diese Rezeptorspaltung hemmt die lipopolysaccharidinduzierte IL-8 Sekretion von humanen Gingivafibroblasten und wird als Ausweichstrategie gegenüber dem Immunsystem interpretiert[426]. In einer anderen Veröffentlichung aus dem Vorjahr wurden humane Gingivafibroblasten in direkten Kontakt mit R-Gingipainen gebracht, wobei es hier wiederum nach T-Zell Kontakt zu einer Zunahme der IL-8 Synthese kam. Begleitet wurde dies von einer gleichzeitigen Induktion von COX-2 (Cyclooxygenase) sowie einer Abschwächung der IP-10 (interferon-gamma-inducible protein) Synthese[313].
Wahrscheinlich ist die Interaktion zwischen Gingipainen, IL-8 und den PMN gradientenabhängig, PMN sammeln sich nah der Plaque, sind aber dann nicht in der Lage, sich den Bakterien weiter zu nähern. Dieses Problem der Ansammlung vor dem Feind ($1{,}7 \times 10^8$ PMN/cm^3)[347] ohne ihn tatsächlich zu sehen und angreifen zu können, führt zu „Kollateralschäden“ wie der bekannten Gewebedestruktion bei der Parodontitis[179], schützen aber auch das tiefer gelegene Gewebe des Körpers vor der Infektion[347].
PMN werden physiologischer Weise nach einer gewissen Zeit apoptotisch. Die Phagozytose solch apoptotischer Zellen bedarf der Erkennung von so genannten „Fress mich“ Signalen durch spezifische Oberflächenrezeptoren auf Makrophagen. Eines dieser Systeme ist das System mit Phosphatidylserin (PS) und dem entsprechenden PS-Rezeptor der Makrophagen. Die normale Halbwertszeit von PMN in der Blutzirkulation beträgt lediglich sechs Stunden. Im entzündeten Gewebe wird sie durch die dortigen Zytokine deutlich verzögert, damit sie dort besser ihre immunologische Wirkung entfalten können. Da sich schon in nur geringgradig entzündeter Gingiva enorme PMN-Mengen ansammeln, ist eine Störung der Phagozytose apoptotischer PMN durch Makrophagen für das Pathogenesemodell der Parodontitis von großer Bedeutung. Das bei dieser Erkrankung vorliegende proteolytische Milieu scheint dieses Zusammenspiel von Makrophagen und PMN massiv zu stören. Obendrein sensibilisieren Arg-Gingipaine die noch gesunden PMN für die Aufnahme durch Makrophagen. Vermutlich ist dies der Spaltung eines antiphagozytischen Signals (CD31) sowie der Generierung eines neuen „Fress mich“ Signals auf der Oberfläche der PMN zu verdanken. Das Unvermögen, apoptotische PMN abzuräumen ist auch von anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen bekannt, im Speziellen von systemischen Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis oder der zystischen Fibrose. Entsprechend könnte die Parodontitis als ein weiteres Beispiel einer entzündlichen Erkrankung betrachtet werden, dass durch proteinaseinduzierte, dysfunktionelle Beseitigung apoptotischer Zellen verursacht wird[148, 149].

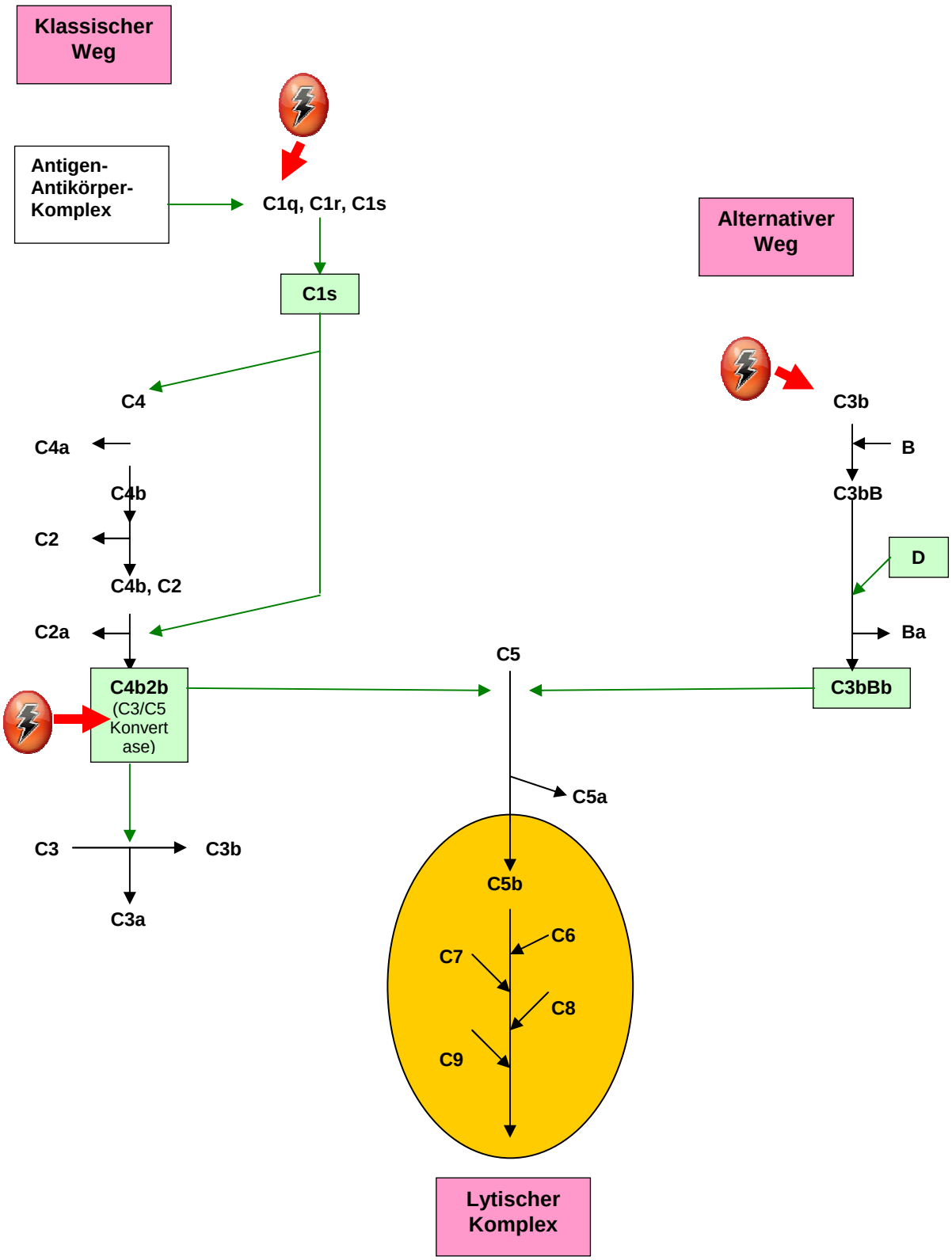

Abb. 7: Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen bzw. den alternativen Weg. Aktive Proteinasen sind hellgrün dargestellt, proteolytische, zur Aktivierung führende Reaktionen sind mit grünen Pfeilen hervorgehoben. Die roten Pfeile zeigen einige Angriffspunkte der Gingipaine. (Frei und modifiziert nach Löffler, 1999)[238].

Bekannt sind bei Anwesenheit von *P. gingivalis* nicht nur der angehobene IL-8 Spiegel, der von gingivalen Epithelzellen induziert wird. Eine Forschergruppe konnte durch die RT(real time)-PCR nachweisen, dass *P. gingivalis* neben IL-8 ein weiteres Zytokin, MCP-1 (monocyte chemoattractant protein), sonst von peripheren mononukleären Blutzellen sezerniert, abbaut. Es wird wie auch IL-8 von Endothelzellen während der Herausforderung durch diese Spezies sekretiert[213, 291]. TLCK, ein Hemmstoff der Proteaseaktivität (Serin-und Cysteinproteinasen), kann wiederum diesen Abbau verhindern, so dass daraus die Vermutung resultiert, dass die Proteinasen von *P. gingivalis* auch *in vivo* Zytokine, die von Endothelzellen sezerniert werden, gezielt abbauen, um die Rekrutierung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten in Richtung infizierter Regionen zu verhindern. Diese Störung der Interaktion zwischen Endothelzellen und der Rekrutierung von PMN in infizierten Arealen könnte vielleicht zu der verzögerten Immunreaktion des Wirts bei einer aktiven Parodontitis führen[161]. Bei den schweren Erkrankungsformen gesellt sich vermutlich eine gewisse Prädisposition hinzu, die sich in einer Hyperresponsivität der PMN widerspiegelt[205]. Weiter gedacht ist die Vermutung, dass im infizierten Gingivagewebe der Abbau von Wirtszytokinen die Mechanismen der angeborenen Immunabwehr des Wirts im gesamten infizierten Parodontium negativ beeinflusst, eines ökologischen Habitats, welches ja auch noch von zahlreichen anderen Spezies bewohnt wird. Ein solch reduzierter Zytokinspiegel könnte demzufolge die Fähigkeit des Wirts beeinträchtigen, diese anderen Spezies zu erkennen und die PMN zur Bekämpfung dorthin zu dirigieren. Das Resultat dessen könnte die dauerhafte Etablierung einer residenten Mikroflora sein[161].
Ungünstig wirken sich Gingipaine auch auf Interleukin-6 (IL-6) aus, auch dieses Zytokin inaktivieren sie sehr schnell, wobei Kgp dabei am potentesten ist[28]. Auch hier entsteht ein negativer Gradient, so dass sich kaum mehr IL-6 in parodontalen Läsionen nachweisen lässt. Je größer die Distanz zwischen der Plaque und dem angrenzenden Gewebe aber wird, umso mehr nimmt die Konzentration wieder zu, um dann schließlich in 6mm Entfernung ihr Maximum zu erreichen[260].
Die Hauptquellen des IL-6 sind stimulierte Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen. Makrophagen, B- und T-Lymphozyten, Mastzellen, Keratinozyten und Gliazellen. Das exprimieren von IL-6 beeinflusst die antigenspezifische Immunantwort und inflammatorische Reaktionen, es fördert die Knochenresorption[187] und induziert zugleich sehr potent die Osteoklastenbildung in Zellkulturen[161, 266].
IL-6 ist Hauptauslöser der Akute-Phase-Reaktion (induziert unter anderem CRP), wirkt als Differenzierungsfaktor für B-Lymphozyten und als Aktivierungsfaktor für T-Lymphozyten. In Gegenwart von Interleukin-2 ist es zusätzlich ein Differenzierungsfaktor für die zytotoxische T-Zellbildung. IL-6 ist das Endstimulanz für die abschließende B-Zellreifung und deren anschließender Antikörpersekretion[169]. In diesem Licht wird auch hier die Bedeutung dieses Zytokins im parodontalen Destruktionsprozess deutlicher. In direkter Nähe zur Plaque finden sich reduzierte, IL-6-vermittelte Entzündungsreaktionen, in einigen Millimetern Entfernung finden sich jedoch gesteigerte inflammatorische Prozesse, welche zu den bekannten parodontalen Destruktionen führen[65, 179].
Bekannt ist auch die Beeinflussung eines weiteren Interleukins. Gingpaine fördern durch einen IL-4 Abbau den „Th-2 Pfad“, verstärken die CD69 Expression von B-Zellen und aktivieren diese. Diese Aktivierung korreliert mit der gesteigerten Expression von IL-4 Rezeptoren auf der B-Zelloberfläche. Die Gingipaine fungieren wohl im frühen Stadium des B-Zellwachstums als ein Kompetenzsignal, wodurch sensibilisierte B-Zellen vielleicht etwas responsiver gegen zukünftige Herausforderungen dieser Erkrankung sein könnten[487].
So ist gleichermaßen bekannt, dass neben den beschriebenen Einflüssen der Gingipaine auf diverse Interleukine diese zusätzlich auch IL-1β[110, 111], Tumor-Nekrose-Faktor-α[60], Interferon-γ[484], RANTES (Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted)[45] sowie auch zum Teil deren Rezeptoren[323, 426] abbauen können. Es kann aber auch gegenteilig zu einer Zunahme der Sekretion von einigen dieser Zytokine in mit von diesem Schlüsselkeim infiziertem Gewebe kommen[19]. Dieses geschieht beim IL-6 durch ein Herunterregulieren der Signaltransduktion, was zur Abstoßung, Abbau und Inaktivierung des IL-6-Rezeptors führt[323]. *P. gingivalis* innerhalb von KB-Zellen führt zu einer Verschlechterung der mRNA-Expression für IL-1β, IL-6 und TNF-α drei Tage postinfectionem, was zu der Annahme führt, dass diese intrazellulären Bakterien eine Herunterregulation der initialen Entzündungsreaktion initiieren, um so in einem Ruhestadium überleben zu können[103].
R-Gingipaine, vor allem HRgpA, sind im Versuch mit Mäusefibroblasten deutlich stärker befähigt, gelöstes TNF-α zu spalten als es das Kgp vermag, ebenso wie die membrangebundene Form dieses Zytokins. Der Aktivierungsstatus des Transkriptionsfaktors NK-κB wird durch die Gingipaine supprimiert und dementsprechend sind die Fibroblasten nicht länger in der Lage, eine Apoptose in HL-60-Zellen zu induzieren[263].
Man betrachte ein weiteres Molekül, das α_2-Makroblobulin. Es ist neben α_1-Antitrypsin eines von den zwei wichtigsten Proteinaseinhibitoren des Plasmas. α_1-Antitrypsin dient ausschließlich der Regulation der Elastase der PMN. Das α_2-Makroglobulin kann prinzipiell die Proteinasen aller vier Klassen durch die Spaltung einer Peptidbindung inhibieren. Wie gezeigt werden konnte, funktioniert dieses auch zumindest teilweise bei den Gingipainen. HRgpA und $RgpA_{cat}$ werden durch α_2-Makroglobulin

inhibiert, Kgp wiederum reagiert nicht mit diesem Molekül[143]. Es könnte sogar sein, dass auch noch das vom α_2-Makroglobulin gebundene HRgpA seine pathologische, metabolische Aktivität teilweise oder in Gänze beibehält, eine Untersuchung mit Fibroblasten scheint daraufhinzuweisen[355, 79].
Wenn *P. gingivalis* in der Lage ist, dem Immunsystems des Wirtes zu entkommen und im Gewebe langfristig zu überleben, könnte dieses eine permanente Immunantwort mit sich ansammelnden Leukozyten ohne durchschlagenden Erfolg gegen das Pathogen erklären. Die Folge sind die oben erwähnten „Kollateralschäden", der Zerstörung des parodontalen Gewebes und eine Progression der Erkrankung[179]. Sämtliche pathogenen Aktivitäten werden abschließend noch einmal in der Abb. 8 zusammengefasst.

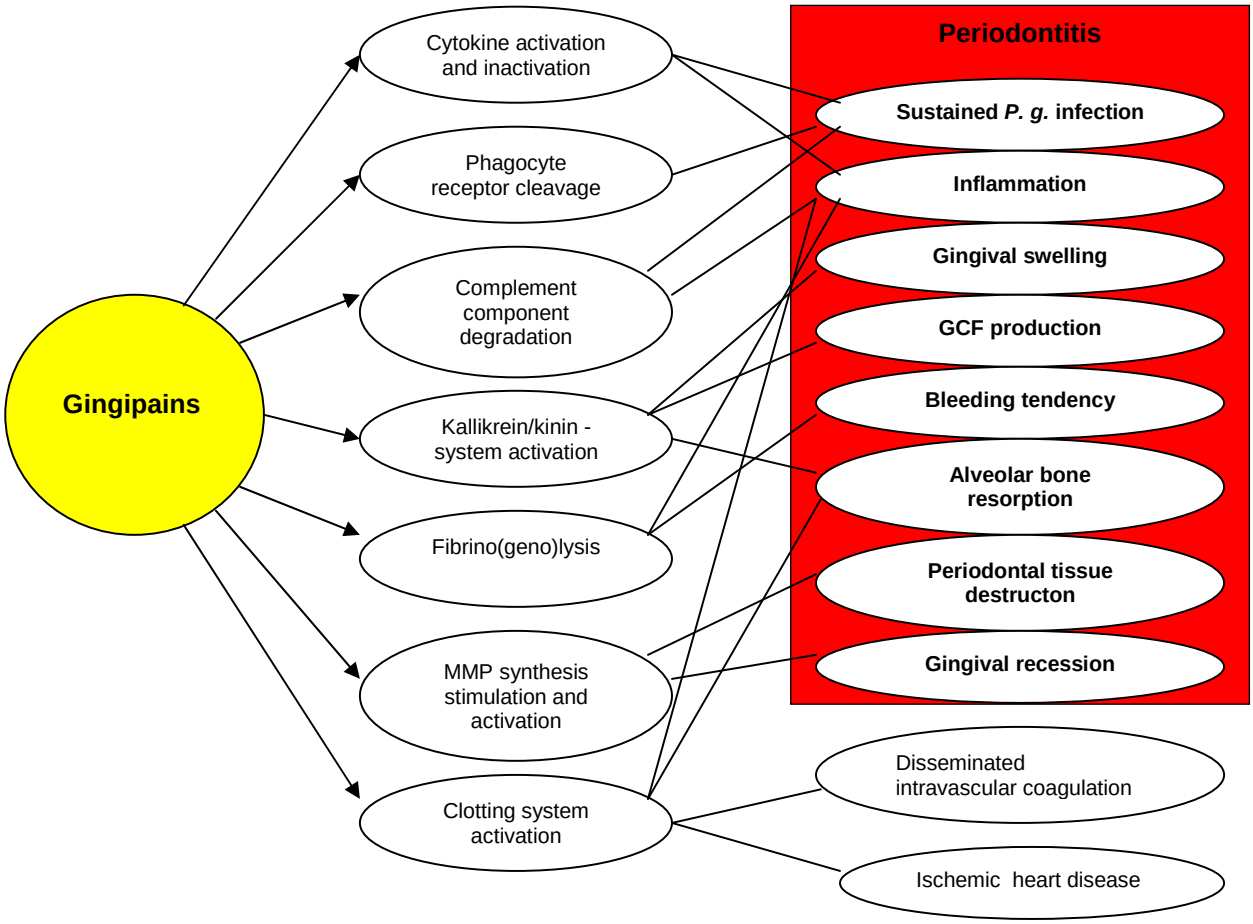

Abb. 8: Die multiplen pathogenen Aktivitäten der Gingipaine in ihrer Assoziation mit der Parodontitis und anderen Erkrankungen. Die Verbindungslinien stehen für vermutete Zusammenhänge zwischen Gingipainen und Symptomen der Parodontitis sowie weiteren Erkrankungen (frei nach Imamura 2003 bzw. Potempa et al. 2000[179, 347].

Humane Gingivaepithelzellen exprimieren proteinaseaktivierte PAR-1, -2 und -3 Rezeptoren (protease activated receptors) an ihrer Oberfläche. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um G-proteingekoppelte Rezeptoren, die zelluläre Reaktionen auf extrazelluläre Proteinasen hin vermitteln[71]. Speziell RgpB scheint PAR-1 und PAR-2 so zu beeinflussen, dass es hierdurch die Sekretion des schon oben erwähnten proinflammatorisch wirkenden Zytokins Interleukin-6 begünstigt[240]. Das führt zu der faszinierenden Erkenntnis, dass eine Bakterienspezies anscheinend in der Lage ist, die Entzündungsintensität des Wirtsgewebes über in diesem Falle das IL-6 des Wirtes, seinen eigenen Lebensbedürfnissen entsprechend herauf- oder herunterzuregulieren!
Dabei spielt auch noch ein weiterer Teil der angeborenen Immunantwort eine Rolle. Die antimikrobiellen Peptide der hBD-Familie (human β-defensin) sind Bestandteil dieser Immunantwort und sind in die mukosale Immunabwehr involviert. Große bakterielle Herausforderungen provozieren auch im oralen Gingivaepithel (GEC) die hBD-Synthese, eine vermehrte Expression von hBD-2 und -3

ist die Folge. Unser spezieller Freund, *P. gingivalis,* vermag explizit diese hBD-2 Expression zu fördern. Dabei werden vermutlich verschiedene Signalkaskaden genutzt, wie auch der NF-κB vermittelte Weg. Fehlen aber Mutationen von *P. gingivalis* einzelne Gingipaine, reduziert sich auch entsprechend die hBD-2-mRna Expression der Gingivaepithelzellen. Die Proteinasen sind folglich direkt in der Regulation von hBD-2 des Epithels involviert und diese Induktion kommt teilweise dem oben angesprochenen PAR-2-Rezeptor mit seiner entsprechenden Signalkaskade zugute[71]. Jüngst konnte diese Beobachtung bestätigt werden. Dieser Effekt wurde der RgpB-Aktivität zugeordnet und ein noch Weiterer wurde beobachtet. Ein anderes antimikrobielles Peptid der Epithelzellen, CCL20 (macrophage inflammatory protein 3α/CC chemokine ligand 20), wird durch gereinigtes RgpB wie auch durch *P. gingivalis* beeinflusst, die mRNA wird nachweislich hochreguliert. Dieses wird nicht durch PAR-1 vermittelt, sondern fußt auch wieder auf den PAR-2-Rezeptor. Die GEC nutzen diese PAR-Rezeptoren, um *P. gingivalis* zu erkennen und vermitteln eine Zellantwort unter Einbeziehung der angeborenen Immunabwehr[93].

Arg-Gingipaine induzieren, wie oben bereits besprochen, auch bei gingivalen Fibroblasten Veränderungen, wie eine verstärkte Exprimierung des Hepatocyte growth factors (HGF). Auch dieses wird durch PAR-1 und PAR-2 Rezeptoren vermittelt[444].

Der PAR-2-Rezeptor findet sich auch auf der Oberfläche von Neutrophilen wieder. R-Gingipain bewirkt dosisabhängig eine Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration bei den PMN, wobei sich dieser Effekt aber bei Wiederholungen verbrauchen kann. Resultat ist jedoch die Aktivierung der Granulozyten mit einer Ingangsetzung des Entzündungsprozesses[240]. Da dieser PAR-2 Rezeptor in vielen Zellen vorkommt (Epithel, Fibroblasten, Osteoblasten, PMN) und sich durch HrgpA und RgpB aktivieren lässt, gilt er in zunehmendem Maße als verdächtig, an alveolärem Knochenabbau und der Parodontitis beteiligt zu sein. Die Mediatoren dafür könnten wieder die altbekannten Zytokine IL-1, IL-6, TNF-α, MMP und IFN-γ sein[162, 163]. Der PAR-2 Rezeptor wurde vor einiger Zeit auch in pulpalen Zellen nachgewiesen. Es stellte sich dar, dass RgpB die Synthese von proinflammatorischen Neuropeptiden in kultivierten Pulpazellen induziert, woraufhin diese unter anderem den PAR-2 Rezeptor verstärkt darstellen. Diese bisher unbekannte RgpB Aktivität könnte für eine Verknüpfung zwischen der Parodontitis und pulpalen Inflammation stehen, welche durch in der Läsion freigesetzte Neuropeptide moduliert wird[431].

RgpA produziert zeit- und konzentrationsabhängig eine Hydrolyse des CD 27 Rezeptors auf ruhenden T-Zellen, einem Mitglied der TNF-α Familie. Damit einhergehend aktiviert RgpA die Rezeptoren PAR-1, PAR-2 und PAR-4 und induziert in der Konsequenz eine CD69 und CD25 Expression auf T-Zellen. Kgp vermag in nur geringem Umfang CD27 abzubauen, kann jedoch die Expression und die biologische Aktivität von CD27 beeinflussen, vorausgesetzt, dass der PAR-2 Rezeptor künstlich inhibiert wird. Der Ligand für CD27, CD70 wird auf aktivierten B-Zellen induziert. Auch dieser wird durch RgpA signifikant reduziert, aber kaum durch Kgp. Man kann schlussfolgern, dass RgpA via PAR Rezeptoren T-Zellen aktivieren kann, der gleichzeitige Abbau von membrangebundenem CD27 wie auch CD70 einen eher herunter regulierenden Effekt hat, gesteuert durch die Inhibierung von CD27/CD70 vermittelter Zellaktivierung bei der Parodontitis[491].

Auch Osteoblasten können PAR-1 exprimieren, aktiviert durch Thrombin oder durch synthetische Peptide. Thrombin wie auch humanes PAR-1-aktivierendes Peptid induzieren bei humanen SaOS-2 osteoblast-like Zelllinien eine Anhebung des Kalziumspiegels, jedoch sorgt nur das Peptid für den rezeptorvermittelten Kalziumeintritt, nicht das Thrombin. Ebenso führt auch nur das Peptid zu einer gesteigerten Proliferationsrate dieser Zellen, zumindest bestätigt im Rattenmodell. Osteoblasten sind fähig, PAR-2 zu exprimieren, worin sich anscheinend die unterschiedliche Reaktion bezüglich des gesteigerten Kalziumspiegels auf Peptide und Thrombin begründet. Die Peptide aktivieren scheinbar beide Rezeptortypen. Interessant ist dies, da auch Trypsin und R-Gingipaine diese Anhebung der Kalziumkonzentration provozieren. Warum es jedoch zu einer unterschiedlichen proliferativen Antwort auf Peptide und Thrombin im Tierversuch kommt, ist noch leider unklar[4].

Es gibt eine zunehmende Evidenz dafür, dass die Gingipaine nicht nur die Freund-Feind-Erkennung des Immunsystems durch einfache Degradierung von Wirtsproteinen modulieren, sondern das gegnerische Immunsystem gezielt durch die Inaktivierung eigener Zelloberflächenliganden unterlaufen. In Folge dessen vermindert sich die Potenz des Immunsystems, den Gegner zu erkennen. Man weiß bisher, das die Gingipaine *P. gingivalis* eigene Oberflächenkomponenten inaktivieren, die sonst eine NF-κB Aktivierung über einen TLR-2 und -4 (Toll Like Receptor) unabhängigen Signalweg induzieren würden, bevor diese Komponenten durch den CD14 Rezeptor der Makrophagen erkannt werden können. Anscheinend können die Gingipaine ebenso die Ligandenexpression anderer, in der parodontalen Tasche lebender Mikroorganismen, inaktivieren[210].

Die vielfältigen Interaktionen der Gingipaine mit dem humanen Immunsystem lassen letztendlich an eine mögliche Immunisierung durch Vakzine denken, seit Jahren ist dies Gegenstand des Interesses einiger Arbeitsgruppen[275, 122]. Eine therapeutische Alternative sucht man in spezifischen Hemmstoffen gegen die Gingipaine, wie einem Proteinaseinhibitor, der gegen den aktivierten Gerinnungsfaktor X

gerichtet ist (DX-9065a)[257] oder im Tetracyclin und seinen Derivaten wie Doxycyclin[107] oder Minocyclin[146]. Am Schluss dieser Arbeit soll hierauf noch einmal eingegangen werden.

3.3 Gingipaine im biochemischen Regulationsmechanismus von *P. gingivalis*

3.3.1 Die Rolle des proteolytischen Systems von *P. gingivalis* beim eigenen Nährstofferwerb

Da die asaccharolytische Spezies nicht in der Lage ist, freie Aminosäuren für ihr Wachstum zu verwerten, ist sie gänzlich abhängig von äußerer Peptidversorgung, um welche sie sich innerhalb des dentalen Biofilms im Wettbewerb mit konkurrierenden Bakterienspezies befindet[347]. Naheliegend wäre es, den Cysteinproteinasen dieses Organismus eine relevante Rolle bei dem Abbau von Proteinen zur Substratgewinnung für den eigenen Wachstumsvorgang zuzuschreiben. Da jedoch Informationen bezüglich der Substratspezifität von Peptidtransportern dieser Spezies und seinen prinzipiellen Stoffwechselprozessen fehlen, ist es schwierig, bestimmte Aufgaben der Ernährung zu spezifischen Proteinaseaktivitäten zuzuordnen[79]. Zwischenzeitlich konnte aber nunmehr eine Arginin-Carboxypeptidase dargestellt werden, welche vermutlich in konzertierter Aktion zusammen mit Arg-Gingipain dem Wirt Aminosäuren abtrotzen kann[255].
In einem hypothetischen Modell[347] werden Plasma- und Gewebeproteine zunächst von Gingipainen und von Wirtsproteinasen abgebaut, wobei beide Wege zu Destruktionen innerhalb des parodontalen Gewebes führen können. Die bakteriellen Proteinasen spielen bei der Stimulation der MMP-Synthese in Fibroblasten[84, 415, 445] und der anschließenden proteolytischen Aktivierung der entstandenen Proenzyme eine Schlüsselrolle[84, 415].
Es konnten jedoch keine größeren Unterschiede bezüglich des Wachstums im Nährmedium für *P. gingivalis* ATCC 33277-Mutationen mit Insertionen bei *rgpA, rgpB* oder *kgp*, einer doppelten *rgpA/rgpB*-Mutation oder einer Dreifachmutation *rgpA/rgpB/kgp* gefunden werden[387]. Dieses Ergebnis scheint allerdings abhängig vom gewählten Nährmedium zu sein, denn wenn bovines Serum Albumin als einzige Proteinquelle gewählt wird, ist das Wachstum der *kgp*-Mutation gegenüber dem Wildtyp verschlechtert, die Dreifachmutation (*rgpA, rgpB, kgp*) stellt ihr Wachstum sogar vollends ein, eine Doppelmutation in *rgpA* und *rgpB* hat wiederum keinen Einfluss[7]. Ebenso unterstützen auch humanes Serum Albumin wie auch Transferrin das Wachstum dieser Spezies, wobei in diesem Fall die Arg-Gingipaine stärker als die Lys-Gingipaine einen Beitrag zum Wachstum leisten[137]. Andere Genabschnitte stehen jedoch durchaus in Verdacht, eine Rolle bei der Häminakquisition zu spielen (*tla*)[7]. Es gab bislang aber, zumindest *in vitro,* wenig Evidenz für eine definierte Rolle von Gingipainen bei der Ernährung mit der Ausnahme von Mutationen bei kgp[79, 339]. Dieser Kenntnisstand scheint sich jedoch in den letzten Jahren etwas geändert zu haben: Eine Gruppe untersuchte die Aminopeptidaseaktivität dieser Spezies. Ein Resultat war die Erkenntnis, dass die Arg-Gingipaine neben der Funktion als Endopeptidase auch die Funktion einer Aminopeptidase besitzen. Diese duale Aktivität einhergehend mit der Arginincarboxypeptidaseaktivität sichert dem Bakterium den effektiven Abbau physiologischer Proteine. Dieses wird durch den Umstand unterfüttert, dass die Arg-Gingipainaktivität und nicht die Lys-Gingipainaktivität für das Wachstum von *P. gingivalis* essentiell ist[138]. In jüngster Zeit veröffentlichte eine Gruppe ein neues Minimalmedium (GA Medium) für *P. gingivalis*. Das Wachstum der Spezies auf diesem Nährmedium ist klar gingipainabhängig, Arg- und Lys-Gingipain tragen in vergleichbarem Ausmaß zur Proliferation des Bakteriums bei[310]. Ein Vergleich zwischen verschiedenen Nährmedien und ihrem Einfluss auf die Gingipainaktivität zeigte, dass die Mengen an Arg- und Lys-Gingipainen beim BHI- und insbesondere beim CDM-Nährmedium deutlich abnahm. Das Medium sTSB wirkt sich offenbar besonders günstig auf das Wachstum dieser Spezies aus. Ähnlich ist auch in der Gelelektrophorese eine gesteigerte Bandenintensität im Vergleich zu anderen Nährmedien festzustellen. Die Autoren spekulieren, dass wohlmöglich noch andere unbekannte Mechanismen neben den quorum sensing Effekten existieren, welche in die Gingipainregulation verstrickt sind[279]. Als nachgewiesen gilt auch, dass eine Anhebung der Kultivierungstemperatur jenseits der 37°C sich ungünstig auf die Gingipainaktivitäten auswirken. Schon bei 39°C nimmt die Aktivität auf nur noch 65% der Ursprünglichen ab[279].
Auch konnte gezeigt werden, dass umweltbedingte Veränderungen, wie zum Beispiel ein *in vitro* simulierter Häminüberschuss zusammen mit einem angenommenen Peptidmangel während

Wachstumsphasen zu ansteigenden Mengen an FimA und dem 75-kDa-Protein führt. Beide Proteine sind an der Ausbildung kurzer und langer Fimbrien beteiligt. Die Quantität als auch die Aktivität der Gingipaine nimmt in diesem Häminüberschussmodell jedoch bemerkenswerterweise dabei ab. Reduziert man das Nährstoffangebot des Mediums gezielt, verändert sich die Menge an Gingipainen nur sehr uneindeutig, bei gleichzeitig abnehmenden Levels an Fimbrienproteinen. Nur unter aeroben Bedingungen konnte eine klare Abnahme der Gingipainaktivität gezeigt werden[256].
Verschieden Forschungsgruppen haben sich mit der Frage der Interaktionen zwischen Wirt, Bakterien und Eisenhaushalt *in vivo* beschäftigt[161, 121, 122, 251, 252, 262, 402]. Es wird bestätigt, dass *P. gingivalis,* unter Häminmangel gewachsen, weniger pathogen ist als wenn es unter Häminüberschuss gewachsen ist. Diese Beobachtung gilt für mehrere *P. gingivalis*- Typstämme[161]. Eine Mutation, die einen Defekt beim Verwerten und Transportieren von Hämin hat, zeigt jedoch erstaunlicherweise eine gesteigerte Virulenz im Mausmodell. Dagegen fand ein anderes Team bei einer *vimA*-Gen inaktivierten Mutation des Wildstammes *P. gingivalis* W83 (non-black pigmented *P. gingivalis* FLL 92) eine Reduktion der β-hämolytischen Aktivität. Dazu gesellschaftete sich die Beobachtung, dass sich die Arg- und die Lys-Gingipainaktivität um annähernd 90% reduziert hatten, trotz gleicher *rgpA, rgpB* und *kgp*-Genexpression wie beim elterlichen Wildtyp. Der in der vorherigen Publikation beschriebene Beobachtung einer gesteigerten Virulenz mit Defekten bei der Häminverwertung, steht die gerade erwähnte Untersuchung mit der *vimA*-Genmutation entgegen, wo interessanterweise im Mausmodell eine dramatisch geringere Virulenz beobachtet wurde[1]. So scheint auch das abwärts vom *vimA* gelegene *vimE* Gen in die Regulation der Proteinaseaktivität der Spezies involviert zu sein[452]. Invasiver und mit deutlich gesteigerter Trypsin-like Proteinaseaktivität unterscheidet sich das Ergebnis der Gruppe um Abaibou wiederum von eisenlimitierten Wildtypen[252, 262] oder nichtpigmentierten Mutationen[262] und könnte das unerwartete Resultat eines durch ein Transposon unterbrochenem Gens sein[161]. Eine Alternativtheorie vermutet, dass die veränderte Virulenz dieser *P. gingivalis*-Mutation darauf hinweisen könnte, dass diese Spezies *in vivo* eben nicht häminabhängig sei und die Möglichkeit, zu anderen Eisenquellen des Wirts Zugang zu haben das Überleben, die Vermehrung und die Virulenz begünstigen[161].
Der Eisenspiegel der Sulkusflüssigkeit liegt bei der Gingivitis und der Parodontitis deutlich höher als der durchschnittliche Eisenspiegel des Serums, eine Spanne von 26-170µM wurde beschrieben[277, 460]. Geht die Entzündung sogar mit Blutungen einher, kann der Eisenspiegel in der Sulkusflüssigkeit sogar 10-20mM erreichen (das Hämoglobin des Blutes enthält ca. die 350fache Eisenkonzentration des Plasmas)[468]. Die bekannten eisenbindenden Moleküle der Sulkusflüssigkeit sind Laktoferrin, Transferrin und Hämoglobin und gelten zugleich als die Haupteisenquellen parodontaler Pathogene[77, 247]. Transferrin unterstützt das Langzeitwachstum von *P.* gingivalis. Mutationen, die die Gingipaine verändern, führen wiederum zu einer beträchtlichen Abnahme der Fähigkeit, unter Transferrinverbrauch zu wachsen. In die gleiche Richtung zeigten Experimente mit Gingipainhemmstoffen[54]. Schließlich äußerten pathogene *P. gingivalis*-Stämme unter Eisenmangelbedingungen einen geringeren Transferrin- und Häminbedarf als „nichtpathogene" Stämme, so dass dieses zu der Annahme führt, dass genetische Variationen, die sich auf die Qualität und/oder Quantität der Eisenaufnahme, der Einlagerung und der Verwertung beziehen, zu der unterschiedlichen Virulenz bei *P. gingivalis* mit beitragen[161]. Der gingipaininduzierte Abbau von Transferrin fördert zusätzlich, entweder durch die Freisetzung der Transferrinfragmente oder durch die Eisenfreisetzung an sich, die Katalysierung der Hydroxylionenbildung und trägt dadurch mit zu Gewebedestruktionen bei[131].
In vitro Studien führen zu der Vermutung, dass die Cysteinproteinasen gegebenenfalls eine signifikante Zunahme der Aktivität von Wirtsenzymen im Parodontium verursachen. Dieses lässt sich durch mehrere Beobachtungen belegen: erstens können die Rgp´s proteinasetragenden Phagozyten in die parodontale Tasche hinein rekrutieren, indem sie den Komplementfaktor C5a sowie eine Steigerung der IL-8 Aktivität generieren[464, 268, 79]. Zum Zweiten ist das Kgp in der Lage, die C5a-Rezeptoren von humanen neutrophilen Granulozyten proteolytisch zu inaktivieren und folglich das korrekte Ansteuern gemäß der chemotaktischen Signale in Richtung der parodontalen Tasche stören. Zum Dritten verursachen die thiolhaltigen Enzyme von *P. gingivalis* in der Kultur eine Aufwärtsregulation der MMP-Synthese von Fibroblasten und Epithelzellen[83]. Eine vierte Beobachtung ist, dass die Proteinasen dieser Spezies viele der Plasmaproteinasekaskaden aktivieren können und so zu einer verstärkten Aktivität einiger Schlüsselproteinasen des Komplementsystems, der Fibrinolyse und der Blutgerinnung führen[297]. Schlussendlich ergaben wiederum *in vitro* Studien die Theorie, dass eine konzertierte Aktion von Rgp´s, Kgp und Periodontain (eine weitere Cysteinproteinase)[294] viele der regulatorischen Mechanismen des Wirtes für diese endogenen Proteasen einschließlich α_1-Antitrypsin und anderen Serinproteinaseinhibitoren, α_2-Makroglobulin und Cystatin C inaktivieren können[61].
Eine andere Untersuchung bestätigt diese Annahme bezüglich der Spaltung von Cystatin C. Die Kathepsin B-inhibitorische Aktivität des Cystatin C, wiederum induziert durch die Proteinasen der PMN

und von *P. gingivalis,* wird gestört und somit ist in der Folge auch die physiologische Kontrolle der Kathepsin B-Aktivität aufgehoben[5]. Diese und die Inaktivierung des α_1-Proteinaseinhibitormoleküls[294] führen gleichermaßen zu einem Verlust der Wirtskontrolle über seine Cysteinproteinasen wie auch über seine neutrophile Elastase[185], was zu einer überbordenen, endogenen, proteolytischen Aktivität innerhalb parodontaler Läsionen führt. Peptide und aufgespaltenes Kollagen würden zu Substrat für Periodontain und Tpr Proteinase werden. Die Tpr Proteinase würde dann bei einem Mangel an Peptiden initial stark hochreguliert werden[243], was in Nährstoffmangelphasen zu einer gesteigerten proteolytischen Effektivität führen würde.
Um ein vollständiges Bild „entfesselter" Wirtsenzyme und deren Beitrag zur Nährstoffgewinnung von *P. gingivalis* zeichnen zu können, muss auch die Herkunft der Substrate für diese Proteolyse betrachtet werden, da auch hier die Cysteinproteinasen eine Rolle spielen können. Mitte der 90iger Jahre konnte gezeigt werden, dass Rgp´s und Kgp die Generierung des Vaskularpermeabilitätssteigerungsfaktors Bradykinin entweder durch direkte Beeinflussung von Kinin oder durch die Aktivierung von Präkallikrein verursachen können[171, 375, 79].
Verbunden mit der Inaktivierung der Blutgerinnung durch Fibrinogen[173] würden die aufgeführten Eigenschaften zu einem angehobenen Plasmaproteinspiegel innerhalb der parodontalen Tasche führen. In der Konsequenz dessen scheint es unwahrscheinlich, das die Verfügbarkeit von Proteinen für die Proteolyse ein limitierender Faktor in der Erzeugung von Stickstoff-, Kohlenstoff- und Mikronährstoffquellen ist, welche in die parodontale Tasche durch Plasma Carrier Proteine eingebracht werden. Es gibt jedoch noch keine direkte Evidenz dafür, dass diese *in vitro* Proteinaseaktivitäten *in vivo* eine klare klinische Relevanz hätten. All diese wahrscheinlichen Ergebnisse proteolytischer Einflüsse wie die Zunahme der Rekrutierung der Neutrophilen Granulozyten, der Zunahme der Sulkusflüssigkeitsfließrate und der Blutungsneigung sind gut dokumentierte Charakteristika von sich durch Parodontitis verändernden Parodontien[79, 441].
Während die genauere Rolle der Cysteinproteinasen von *P. gingivalis* bei der Akquisition von Quellen für die Kohlenstoff- und Stickstoffversorgung wenig verstanden ist, hat es beim Verständnis der Verquickung dieser Enzyme bei der Häminaquisition schon größere Fortschritte gegeben. Dieser Mikronährstoff ist verantwortlich für die glänzende, schwarze Morphologie der Bakterienkolonien auf Blutagarplatten, da er auf der Zelloberfläche als µ-oxo dimeres Eisen Protoporphyrin IX[403], vom Hämoglobin abstammend, akkumuliert wird. Für diesen Prozess ist das Kgp von entscheidender Bedeutung. Es konnte für verschiedene Typstämme nachgewiesen werden, dass nach Inaktivierung durch Insertion Mutationen von *P. gingivalis* nicht mehr auf Blutkulturen pigmentierten[318, 234]. Die Fähigkeit von Gingipain K Hämoglobin, Haptoglobin und Hämopexin zu spalten, bietet dieser Spezies eine brauchbare Hämquelle für das eigene Wachstum und trägt somit zur eigenen Proliferation innerhalb parodontaler Taschen bei, wo es an Erythrozyten nicht mangelt[416].
Neben dem lysinspezifischen Gingipain ist aber wohl auch das RgpA oder sind RgpA und RgpB zusammen notwendig, damit die Zelle µ-oxo dimeres Eisen aus Hämoglobin synthetisieren kann[405]. Wird Oxyhämoglobin mit HRgpA inkubiert, entsteht Methämoglobin. Oxyhämoglobin zusammen mit Kgp führt wiederum zur Bildung von Hämoglobin Hämichrom. Die R-Gingipain Aktivität scheint wichtig für die Konvertierung von Oxyhämoglobin zu Methämoglobin zu sein, einer Form, die empfindlicher gegenüber der Degradation durch Kgp und einer möglichen Freisetzung von Eisen(III)protoporphyrin IX und der Synthese von µ-oxo dimeren Eisen ist. Es scheint sich zu bestätigen, dass beide, die R- und die K-Gingipaine für die Pigmentproduktion aus Oxyhämoglobin erforderlich sind[406, 407].
Eine weitere Arbeitsgruppe beschrieb, dass der Verlust der Pigmentierung oder veränderte Umweltbedingungen bezüglich der Eisenverfügbarkeit es *P. gingivalis* ermöglichen, Eisen einzulagern, welches dann für die Aufrechterhaltung des Wachstums und der Virulenz verbraucht werden kann[208].
Es handelt sich dabei wohl um mehrere Eigenschaften von Kgp, die zum Vorgang der Hämin-akquisition beitragen. Ist keine Kgp-Funktion vorhanden, ist auch die Menge an zellassoziierter und vesikelgebundener hämolytischer Aktivität reduziert. Die Wiederherstellung eines intakten *kgp* bewirkt auch eine Wiederherstellung des hämolytischen Phänotyps, dass heißt, dass funktionierendes Kgp für eine maximale Erythrozytenlyse notwendig ist[235]. Darüber hinaus wurde vorgeschlagen, dass ein 19-kDa-Peptid, aus der internen Region der Adhäsin/Hämagglutinin Domäne des Kgp stammend, als Hämoglobinrezeptor fungiert, um die Bindung dieses Carrierproteins an die Zelloberfläche der Bakterien zu erleichtern. Obwohl die gleiche Sequenz innerhalb von *rgpA* und *hagA* codiert ist, scheint für seine optimale Synthese ein funktionierendes Kgp notwendig zu sein[289]. Dagegen wird von einer anderen Arbeitsgruppe der katalytischen Domäne des Lys-Gingipains die Eigenschaft eines hämoglobinbindenen Proteins zugeschrieben[224].
In jedem Fall gilt Kgp als eine sehr effektive Hämoglobinase, denn es scheint durch Proteolyse der Lysinreste in der α- und der β-Kette des Hämoglobins Hämin vom Trägerprotein loslösen zu können[235, 79].

Man kann also resümieren, dass das Kgp mehrere Funktionen bei der Häminakquisition inne hat, von der Erythrozytenlyse bis hin zur Hämoglobinanbindung, der Bindung des Proteincarriers an die Bakterienzelloberfläche und den proteolytischen Abbau des freigesetzten Hämins[79].
Als weitere Eisenquelle fungiert das schon erwähnte Transferrin, wobei auch hier Kgp potenter als Arg-Gingipain ist[54]. Vermutlich verfügt *P. gingivalis* auch über verschiedene Eisenaufnahme- und Einlagerungsmechanismen, die sich spezifisch für die unterschiedlichen eisenhaltigen Proteine des Wirtes wie Hämin, Hämoglobin und Transferrin entwickelt haben[161]. Das aufgenommene Eisen wird als Ferritin eingelagert und wird in Phasen des Eisenmangels wieder verfügbar bemacht. Andere Spezies können sich mit dem eingelagerten Ferritin gegen oxidativen Stress schützen oder es wird während der Wachstumsprozesse verbraucht. Das „nicht Häm-Eisen“ enthaltenden Ferritin von *P. gingivalis* wird zumindest nicht als Antioxidanz eingesetzt[358], der funktionelle Beitrag des Ferritins für *P. gingivalis in vivo* scheint gegenwärtig noch nicht exakt belegt zu sein[161].
Darüber hinaus existieren sogenannte Rubrerythine, „nicht-Hämeisen“-Proteine, die Bakterien gegen oxidativen Stress unter anaeroben Umweltbedingungen schützen. *P. gingivalis* produziert ein Rubrerythin-like Protein. Vor einigen Jahren erzeugte eine Arbeitsgruppe *P. gingivalis*-Mutationen, denen das kodierende Gen *rbr* fehlte. Daraufhin beobachtete man eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber molekularen Sauerstoff und Peroxiden. *P. gingivalis* verfügt zwar über eine Superoxiddismutase aber es fehlen Katalase oder Hämperoxidasen. Daraus wurde gefolgert, dass das Rubrerythin durch katalytische Reduktion von intrazellulärem Wasserstoffperoxid einen Schutzmechanismus gegen oxidativen Stress liefert[424]. Dieses konnte später bestätigt werden und führte zu der Erkenntnis, dass unglücklicherweise eben dieser Schutzmechanismus die mit ihrem oxidativem Burst entfesselten reaktiven oxigenen Immunzellen dazu bringt, beträchtliche Kollateralschäden beim Wirtsgewebe anzurichten. Diese PMN-Antwort scheint sogar für die Exazerbation der Erkrankung verantwortlich zu sein, einhergehend mit den Gewebeschädigungen erleichtert sie das Wachstum von *P. gingivalis* sowie die systemische Dissemination des Pathogens[280].
Einzelne Untersuchungen könnten einigen Proteinasen eine weitere Rolle zuweisen, der Beteiligung an der Prozessierung anderer Zelloberflächenmoleküle. Beispielsweise sorgen Mutationen des *rgpA*- und *rgpB*-Gens in *P. gingivalis* ATCC33277 für eine Unterbrechung der richtigen Fimbrillin-Prozessierung. Gleichsam wird in Abwesenheit von Rgp´s die Weiterverarbeitung eines immunogenen 75-kDa OMP´s (Outer-membrane protein) gestoppt[197]. Ebenso ist die proteolytische Reifung von Kgp ohne *rgpA/rgpB* verändert[2].
Mit der Erkenntnis, dass es sich mit *P. gingivalis* um einen möglichen Bestandteil des pathogenen Biofilms handelt, ist der Verdacht gewachsen, dass seine metabolischen Aktivitäten an die Nährstoffresourcen des Biofilms angepasst sind. Ebenso wird auch diese Spezies anderen Mitgliedern des Biofilms von Nutzen sein können.
P. gingivalis bevorzugt für seinen Nährstofferwerb respektive für seine Zellbestandteile Peptide statt freier Aminosäuren. Die Forschung der letzten Jahre ergab, dass Dipeptide sehr effektiv genutzt werden, um große Mengen von Ammoniak und organischen Säuren (wie Propionat oder Butyrat) zu produzieren. Ein Teil dieser Stoffwechselendprodukte kann von anderen Spezies der subgingivalen Biofilms genutzt werden, toxisch auf Wirtszellen wirken oder negative Effekte auf das Immunsystem beziehungsweise auf die Zytokinaktivitäten haben[428]. Die Moleküle, die aus dem Abbau von Dipeptiden entstehen, untergraben die orale Mukosa und ermöglichen der Spezies eine bessere Penetration des Biofilms und steuern so zu den Gewebedestruktionen bei der Parodontitis bei[161].
Über Synergismen mit anderen Spezies im oralen Biofilm und das damit einhergehende quorum sensing scheint auch im Bezug auf den eigenen Nährstofferwerb und den Gingipainen von *P. gingivalis* immer noch kaum etwas bekannt zu sein (siehe unten).
Es ist gibt Gründe, die dafür sprechen, dass die von *P. gingivalis* praktizierten Strategien zur Sicherung der Stabilität, der Widerstandsfähigkeit und der Effektivität der Cysteinproteinasen in einer feindseligen, entzündlichen und hyperimmunen Umwelt Parallelen dazu haben können, wie andere Spezies diese Ziele für ihre extrazellulären Produkte erreichen[79].
Weiterhin scheint nicht nur die Bindungsfähigkeit von *P. gingivalis* zu Epithelzellen, Laminin und Fibronektin, sondern auch die zur Spezies *Actinomyces naeslundii 2* (*Actinomyces viscosus*) mit den Gingipainen in Zusammenhang zu stehen[57]. *P. gingivalis* koaggregiert zwar auch mit weiteren Spezies wie *Streptococcus gordonii* und *Streptococcus mitis*[161, 214], *Fusobacterium* nucleatum[51] oder *Prevotella intermedia*[201], *rgpA*-Mutationen können aber auch wieder Koaggregationseigenschaften missen lassen[161]. Die Gingipaine scheinen darüber hinaus ebenso ein kritischer Faktor für die Koaggregation zwischen *P. gingivalis* und *Treponema medium* zu sein[446].
So wurde auch für die Vesikel von *P. gingivalis* der Nachweis erbracht, dass sie mit zahlreichen Bakterien wie *Streptococcus* spp., *F. nucleatum* und *A. naeslundii* aggregieren können. Diese Vesikel haben dazu die Fähigkeit zum „bridging“ mit nichtaggregierenden Spezies, so dass man sagen kann,

dass die Bindungsfähigkeit von *P. gingivalis* für die Interaktionen zwischen den verschiedenen Spezies einen sehr zuträglichen Einfluss hat[161].

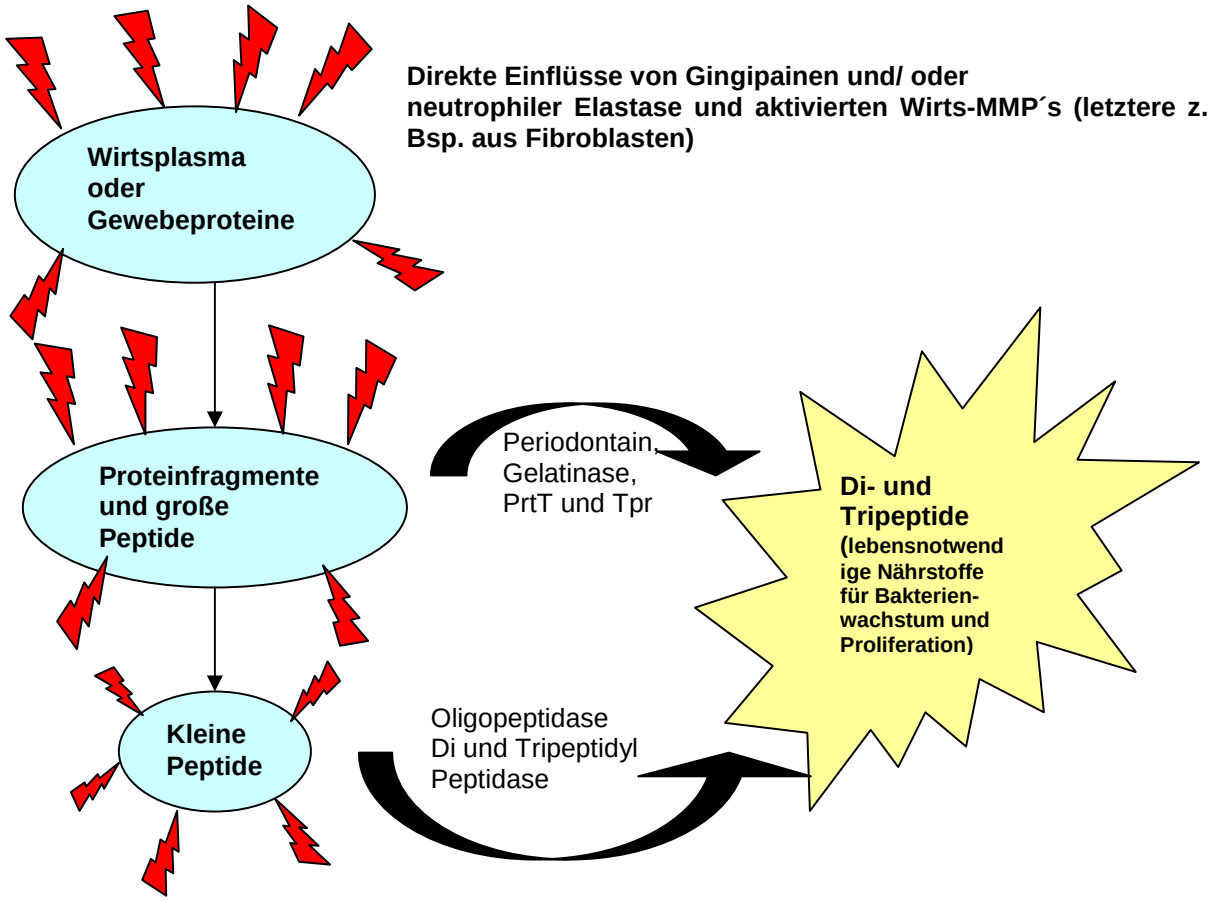

Abb. 9: Die Rolle des proteolytischen Systems von *P. gingivalis* bei der eigenen Nährstoffbeschaffung (MMP´s: Matrixmetalloproteinasen (modifiziert nach Potempa et al. 2000)[347].

3.3.2 Gingipainreifung und die Steuerung des intrazellulären Haushalts von *P. gingivalis*

R-Gingipaine

R-Gingipaine sind an der Steuerung der Weiterverarbeitung einer Vielzahl von Zelloberflächenproteinen beteiligt. Daneben ist die Beteiligung an der Reifung der Hämoglobin-bindungsrezeptorproteindomäne und eine Hämagglutininaktivität des *HagA*-Genproduktes bekannt. Beide R-Gingipaine sind in der Lage, die immunogenen Zelloberflächenproteine Profimbrilin und Pro-Kgp weiter zu verarbeiten. Notwendig für alle diese Reaktionen ist eine Spaltung von Arg-Xaa Peptidbindungen[347]. Verglichen mit *rgpA* hat das *rgpB*-Gen fast den gesamten Abschnitt verloren, der für Hämagglutinin/Adhäsionsdomäne kodiert, ausgenommen eines kleinen C-terminalen Segmentes[425].
Die meisten Proteinasen werden als inaktive Vorläufer synthetisiert. So wird die Synthesemaschinerie der Zelle geschützt und es wird Zeit bis zur Aktivierung gewonnen[269]. Das proteolytische Prozessieren von Progingipainen ist jedoch komplizierter als nur die reine Spaltung von mehreren Peptidbindungen[425]. Es konnte gezeigt werden, dass das rekombinante Pro-RgpB-Protein zu einem vollwertigen, aktiven Enzym über drei sequenzielle autokatalytische Schritte proteolytisch prozessiert wird. Diese ereignen sich am N- und C-terminalen Ende, wobei sich das N-terminale Profragment

anscheinend als intramolekulares Chaperon (multimere Proteinkomplexe, die die Proteinaggregation während der Proteinfaltung hemmen) anbietet[269].
Der Reifungsprozess der Arg-Gingipaine scheint auch zusätzlich mit der Biosynthese der Oberflächenkohlenhydrate verknüpft zu sein, einige Mitglieder der Arg-Gingipainfamilie werden posttranslational mit Glykanketten modifiziert, welche immunologisch und strukturell mit einem Zelloberflächenpolymer von *P. gingivalis* W50 verwandt sind[331].
Eine andere Gruppe beobachtete bei den Vorläuferformen von Fimbrillin und dem 75kDa Protein die Prozessierung durch Arg-Gingipain, was folglich Adhärenz und Invasion von Wirtszellen beeinflusst[391].

Gingipain K

Bei Gingipain K handelt es sich vermutlich um das primäre Enzym, das an der Spaltung der Lys-Pro-Peptidbindung des Hämoglobinrezeptors involviert ist[347]. Die C-terminalen Hämagglutinin/Adhäsionsdomänen des Kgp sind nicht nur essentiell für die volle Expression der Gingipainaktivität, sondern auch für die korrekte Prozessierung der „multiprotein complex assembly“ auf der äußeren Membran von *P. gingivalis*. Ein weiterer Bestandteil von Kgp, die IgG-like Subdomäne (IgSF), ist wiederum unentbehrlich für die richtige Faltung wie auch für die Expression der Gingipaine[425]. Kgp scheint darüber hinaus die C-terminale Sequenz von RgpB modifizieren zu können[347].

Alle Gingipaine führen die Prozessierung der Tpr Proteinase wie auch von Periodontain durch, beides Cysteinproteinasen von *P. gingivalis*[347]. Ebenso ist bekannt, dass die Struktur von Pro-RgpA und Pro-Kgp komplizierter ist als die von Pro-RgpB und folglich es mehrerer proteolytischer Ereignisse bedarf, damit sich ausgereifte Proteine entwickeln können. Bei der Analyse der mit der äußeren Membran assoziierten Proteine konnte gezeigt werden, dass abgesehen vom C-terminalen Ende des entstehenden Polyproteins, jede funktionelle Domäne von Kgp und RgpA zusätzlich durch Kgp am C-terminalen Ende gekürzt wird, gefolgt von der anschließenden Entfernung des C-terminalen Restes durch Lys/Arg-spezifischen Carboxypeptidasen[457].
Als extrazelluläre Proteine müssen die Gingipaine bei ihrem sekretorischen Weg die innere zytoplasmatische Membran, den periplasmatischen Raum und die äußere Membran durchqueren. Anscheinend durchqueren sie die innere Membran mit Hilfe des Sec-Apparates[350], wie sie aber die äußere Membran passieren, ist noch reine Spekulation[425] und stützt sich in erster Linie auf Beobachtungen bei anderen Spezies. Ein Teil einer vermutlich autotransporterspezifischen, C-terminal lokalisierten Signatursequenz wurde nahe dem C-terminalem Ende von RgpA und Kgp in Form eines amphipathischen Aminosäuresequenzmotivs nachgewiesen[317].

3.3.3 Regulation der Proteinaseexpression von *P. gingivalis*

P. gingivalis muss sich im Laufe seines Lebenszyklus den sich immer wieder ändernden Umweltbedingungen anpassen: wie bei der primären Besiedelung des Wirtes, der Kolonisation der Zieloberfläche, beim Erwerb von Nährstoffen, bei der Vermehrung auf der Oberfläche, unter bestimmten Umständen bei der Invasion von Zellen des Wirts und beim Verlassen des Wirts mit einer anschließenden Weiterverbreitung über einen neuen Wirt[79]. Die Zelle ist dadurch verschiedenen Stressfaktoren ausgesetzt und muss deshalb über eine Reihe von Antworten auf diese Herausforderungen verfügen. Die Variabilität der Herausforderungen ergibt sich beispielsweise aus der lokalen inflammatorischen Reaktionslage, dem Immunstatus und der Präsenz oder Abwesenheit kompetetiver Spezies und dem damit verbundenen quorum sensing. Folglich sind die Cysteinproteinasen von *P. gingivalis* einer Umweltregulation unterworfen[79].
Ein Überangebot von Hämin führt zu einer gesteigerten Benzoyl-L-Arginin-p-nitroanilid-Hydrolyseaktivität, welche auf die Expression von R Gingipainen zurückzuführen ist. Dabei nimmt im Gegenzug die kollagenolytische Aktivität der Spezies ab. Das Hämin reguliert nicht nur die Gesamtmenge an exprimierten R Gingipainen, sondern auch die Aufteilung zwischen zellgebundenen, löslichen und vesikelassoziierten Formen, letztere nehmen bei Häminmangel erheblich zu[261, 259, 252, 62].
Welches der beiden Gingipain R Gene durch Hämin reguliert wird ist ebenso unklar wie die Regulation der *kgp* Genexpression.
So führt auch direkter Eisenmangel zu einer gesteigerten Expression des *rgpA*–Gens bei gleichzeitiger Supprimierung von PrtT und spiegelt die Eisenabhängigkeit der Proteinasesynthese

wieder[438]. Um die Genregulation besser zu verstehen, wurden die Startpunkte für die Transkription für *kgp,rgpA, rgpB, fetB* und das *mcmAB*-Operon bestimmt[189]. Es wurde dabei eine Konsensussequenz identifiziert, die einen Promoter repräsentieren könnte. Um die spezifischen Mechanismen der Häminverwertung und des Eisentransportes nachzuvollziehen, wurde ein TonB-abhängiger Hämoglobin-Hämin Rezeptor (HmuR) für die Hämoglobinbindung und den Eisentransport identifiziert[393, 394]. Eine Inaktivierung des *hmuR*-Gens resultierte in einer Abnahme der Bindungsfähigkeit für Hämoglobin und einer reduzierten Wachstumsrate bei Hämoglobin oder bei Hämin als alleiniger Eisenquelle. In diesem Sinne wurde ebenfalls über *P. gingivalis* berichtet, dass es zwei zusätzliche, mutmaßliche TonB-abhängige häminregulierte Gene besitzt. *HemR,* codiert für ein 48-kDa Membranprotein, welches nur unter häminrestriktiven Bedingungen exprimiert wird[206] und über Sequenzhomologien mit HmuR verfügt. HmuR interagiert mit Kgp und HRgpA Proteinasen um Hämoglobin zu binden und abzubauen[404, 321]. Das Fehlen von Kgp und/oder HRgpA wirkt sich auf die Fähigkeit der Spezies, Eisen zu erwerben nachteilig aus und führt zu einer signifikanten Abnahme ihrer Virulenz[82, 307]. Eine mögliche regulatorische Funktion des Proteins HmuY bei der Verwertung des Hämins durch das Bakterium ist wahrscheinlich[322]. Aus den genetischen Ergebnissen ergibt sich die Feststellung, dass die Kgp-Proteinase für die Verwertung des Hämoglobins essentiell erforderlich ist[392]. Diese extrazelluläre, lysinspezifische Cysteinproteinase spielt wohl auch eine Rolle bei der Hämin- und Hämoglobinbindung als auch deren Abbau, sobald *P. gingivalis* auch auf Eisen aus Hämopexin, Haptoglobin und Transferrin zugreift[85, 235]. Auf ähnliche Weise erkennt die HA_2- Domäne (Hämagglutinin) des HRgpA das Häm über einen porphyrinvermittelten Mechanismus[330]. Eine andere Arbeitsgruppe identifizierte ein 19-kDa Hämoglobinrezeptorprotein (HbR) auf der Zelloberfläche von *P. gingivalis* als eine der Hauptkomponenten der Hämoglobinnutzung. Diese ist intragenetisch (HGP15 Domäne) durch die Gene *rgpA, kgp* und *hagA* kodiert. Es wird von einer engen Beziehung zwischen der HGP15 Produktion, der Hämoglobinadsorption und der Hämakkumulation von *P. gingivalis* ausgegangen[289].

Gleichermaßen bekannt sind die pH-Abhängigkeiten der kollagenolytischen Aktivität wie auch der Gingipainaktivität. Die kollagenolytische Aktivität hat ihr Optimum bei einem natürlichen pH-Wert, die Gingipainaktivität nimmt dagegen bei leicht steigendem pH-Wert zu, sie ist optimal bei einem pH-Wert von 8,0[347].

Gleichfalls existiert eine Abhängigkeit der Proteinasesynthese von der Temperatur. Die Rgp- als auch die Kgp-Aktivität nehmen bei einer Temperaturzunahme von 37°C auf 41°C kontinuierlich ab. Interessanterweise konnte der Spezies nun auch die Fähigkeit zugesprochen werden, auf Hitze und oxidativem Stress mit genaktivierten Reparaturmechanismen zu reagieren, die die denaturierten Proteine reparieren respektive eliminieren. Unter anderen Genen werden auch solche durch Sauerstoff oder Erwärmung aktiviert, die in den Transport und die Synthese von Komponenten involviert sind, die zu einem Lipopolysaccharidsyntheseweg beitragen, der wiederum für die Verankerung von Arg-Gingipainen verantwortlich gemacht wird[386]. HtrA, eine periplasmatische Serinproteinase, scheint zur Resistenz gegenüber Wasserstoffperoxid beizutragen. Dazu kommt, dass die Arg-Gingipainaktivität nach Temperaturerhöhungen ohne HtrA stark nachlässt und es sich bei dieser Proteinase wohl um einen der gesuchten Regulationsmechanismen der Gingipaine handelt[363]. Zu diesem Ergebnis scheint auch die Beobachtung zu passen, dass Temperaturstress zu einer Aufwärtsregulation der Transkription auch des *rgp-1* Gens führt[385].

Geringere R Gingipain-Aktivität geht einher mit einem reduzierten Level an HRgpA und korreliert mit einer verschlechterten Hämagglutininaktivität, was wiederum zu einer Verminderung der Immunreaktivität monoklonaler Antikörper führt[337]. Da in entzündeten parodontalen Taschen pH-Wert und Temperatur deutlich ansteigen, scheint dieser Mechanismus eine Antwort von *P. gingivalis* auf die umweltbedingten Herausforderungen zu sein und könnte die zyklische Natur der Parodontitis-progression mit erklären[410].

Curtis et al. beschrieben, gestützt auf mehrere Studien anderer Arbeitsgruppen, einen möglichen weiteren Weg der Regulation von Proteinasegenen[79]. Sequenzanalysen des *P. gingivalis* Genoms konnten multiple Kopien potentiell mobiler Elemente, so genannte Insertionssequenzen nachweisen: IS1126[248, 249, 94, 497, 392], IS195[234, 235], PGIS2[498] und IS1598, welches identisch ist mit ISPg4[499, 79]. Kopien von IS1126 sind mit *rgpA* und *kgp* assoziiert[234] und der *rgpB* Locus ist von IS1126- und IS1598-Kopien umgeben. Abhängig unter anderem von einer notwendigen Aktivierung verfügt der Organismus dank dieser Sequenzen mittels verschiedener Wege über die Möglichkeit, die normale Genfunktion zum Erliegen zu bringen, jedoch ist der Initiierungsmechanismus dieser Vorgänge noch unbekannt[79].

3.3.4 Gingipaine als bakterielle Hämagglutinine, Adhäsine und hämoglobinbindende Proteine

Die Hämagglutininadhäsionsfähigkeit, von HRgpA und Kgp vermittelt, präsent auf der Zelloberfläche von *P. gingivalis*, ist eine grundlegende Voraussetzung für die Kolonisation von Wirtsgewebe. Die sogenannte Hämagglutinin/Adhäsions-Domäne ist an der Hämoglobinbindung beteiligt und daraus resultierend bei der Hämakquisition aus Erythrozyten involviert. Konsequenz daraus ist eine durch Gingipaine vermittelte Erythrozytenagglutination[347].
P. gingivalis bindet mit der Unterstützung seiner Gingipaine spezifisch und mit hoher Affinität an Komponenten des Bindegewebes respektive der extrazellulärer Matrixkomponenten, einschließlich von Fibronektin und von Fibrinogen[347, 229-232, 332] (s.o. und Abb. 6) und degradiert diese[347, 229-232]. Daraus ergibt sich, dass Gingipaine direkt an der Kolonisation von parodontalen Taschen und/oder dem gingivalen Sulkus beteiligt sind[347].
Das Immunsystem des Wirtes schaut alledem nicht einfach nur zu, sondern es findet eine ausgeprägte B-zellvermittelte Antikörperantwort (IgG), hervorgerufen durch die Epitope der Hämagglutinin/Adhäsions-Domäne, statt, sozusagen als Lockvogelfunktion. Daraufhin kommt es zu einer nur noch sehr abgeschwächten Antikörperantwort gegen die katalytische Domäne[347]. Die nichtproteolytische Domäne von Gingipainen sorgt also für die immunogene Wirtsreaktion, eine gezielte Immunisierung von Primaten mit *P. gingivalis*–Zellen beschleunigt sogar noch die künstlich induzierte Parodontitis[99].
Die Hämagglutinin/Adhäsions-Domäne scheint summa summarum bei der Kolonisation, der Umgehung der Wirtsimmunabwehr und dem Wachstum von *P. gingivalis* eine Rolle mit entscheidender Wichtigkeit zu spielen[347].

3.3.5 Proteinasegenmutationen bei *P. gingivalis* und ihre enzymatische Aktivität

Ende der 90iger Jahre des vorangegangenen Jahrhunderts beleuchtete eine Studie das spontane Auftreten nichtpigmentierter Mutationen bei *P. gingivalis*. Die Charakterisierung mehrerer Typstämme dieser Mutationen führte zu der Erkenntnis, dass eine spontan auftretende Deletion im *kgp*-Gen in diesem Pigmentierungsverlust resultiert. In der Konsequenz haben diese Mutationen ein Defizit bei der Fähigkeit, Hämoglobin zu binden[67]. An der unten stehenden Tabelle Nr. 5 von Curtis et al. kann man die Quintessenz aus den Analysen der isogenen Proteinasemutationen bei *P. gingivalis* erkennen, mögliche Funktionen der Enzyme sind verdeutlicht und die nomenklatorische Validierung der Gingipaine zusammengefasst[79].
Bei den isogenen *P. gingivalis rgpA*-Mutationen ist verglichen mit der Elterngeneration die gesamte Arg-X-Proteinaseaktivität um bis zu 50% vermindert, im Übrigen wie auch bei phänotypischer Identität mit dem Wildtyp[109, 353, 438]. Ein *rgpB*-Mutant von *P. gingivalis* verfügt zum Beispiel über nur noch eine 50%ige Arg-X-Aktivität[353].
Mit Hilfe von Deletionsmutationen wurde kürzlich der Einfluss des OMP Pgm6/7 auf die Zelloberfläche von *P. gingivalis* morphologisch durch Elektronenmikroskopie untersucht. Bei jeder der OMP-Mutationen trat eine um das 5-10fach gesteigerte Gesamtgingipainaktivität auf, was den wichtigen Stellenwert dieser OMP, den Erhalt der OM betreffend, unterstreicht[188].

Tabelle Nr. 5: Eigenschaften von *P. gingivalis* Gingipain Mutationen modifiziert nach Curtis et al. 2001[79]

Typstämme	***rgpA***	***rgpB***	***rgpArgpB***	***kgp***
W50 Rangarajan et al. 1997a Aduse-Opoku et al. 1998 Curtis et al. 1999b Aduse-Opoku et al. 2000	50% Reduktion der gesamten Arg-X Aktivität Kein Effekt auf Kgp, sondern nur RgpA	50% Reduktion der gesamten Arg-X Aktivität Verlust von Kohlenhydraten Kein Effekt auf Kgp	Keine Arg-X Aktivität Kein Effekt auf Kgp Arg-X Aktivität	100%ige Reduktion der gesamten Lys-Aktivität Kein Effekt auf Proteasen Beiger Phänotyp Unfähig auf definiertem Medium zu wachsen
ATCC 33277 (Nakayama et al. 1995) Nakayama et al. 1996 Kadowaki et al. 1998 Okamoto et al. 1998 Shi et al. 1999	70-90%ige Reduktion der gesamten Arg-X Aktivität	75-90%ige Reduktion der gesamten Arg-X Aktivität	Keine Arg-X Aktivität Reduzierte Fimbriation/Expression von Fimbrillin Reduzierte Hämagglutination Falsche Verarbeitung des 75-kDa Antigens Unfähigkeit den bakteriziden Effekt der PMN zu stören Reduzierte Kgp Aktivität	100%ige Reduktion der gesamten Lys-Aktivität Kein Effekt auf Rgp Aktivität Unfähig auf definiertem Medium zu wachsen Beiger Phänotyp/ verschlechterte Fähigkeit der Hämoglobinbindung
W12 Barkocy-Gallagher et al. 1999				90-95%ige Reduktion der gesamten Lys-Aktivität 50%ige Reduktion der Hämagglutination Beiger Phänotyp Reduzierte Kollagenaseaktivität
W83 Fletcher et al. 1995 Lewis and Macrina 1998 Lewis et al. 1999	50%ige Reduktion der gesamten Arg-X Aktivität Abgeschwächte Virulenz im Mausmodell			80-85%ige Reduktion der gesamten Lys-Aktivität Beiger Phänotyp Abgeschwächte Virulenz im Mausmodell Reduzierte Hämagglutination Kein Effekt auf Rgp Aktivität
381 Tokuda et al. 1998a Tokuda et al. 1998b	Reduzierte Expression von *kgp* Reduzierte Adhärenz an Typ-I-Kollagen Verlängerte Aggregationszeit Reduzierte Fimbriation/Expression von Fimbrillin	Reduzierte Bindung zu Epithelzellen Reduzierte Adhärenz an *S. gordonii* Reduzierte Fimbriation/Expression von Fimbrien		

3.4 Gingipaine und systemische Effekte

Die Bakterien der dentalen Plaque oder des sulkären Biofilms können sich in den Blutkreislauf hinein ausbreiten, wenn es zu Verletzungen oder Destruktionen des parodontalen Gewebes infolge von Entzündungen, chirurgischen Eingriffen oder Hygienemaßnahmen kommt. So wie einige epidemiologische Studien Zusammenhänge zwischen der Parodontitis und kardiovaskulären Erkrankungen erkannten[258, 35, 195, 276], gibt es genauso gut welche, die dieses Zusammenhang negieren[168, 166].
Es ist dennoch eine Evidenz aus Studien der letzten Zeit dafür vorhanden, dass es einen Zusammenhang zwischen der Parodontitis und einem erhöhtem Risiko für Atherosklerose und kardiovaskulären respektive cerebrovaskulären Ereignissen beim Menschen gibt[282, 432, 170]. *P. gingivalis* konnte schließlich sogar direkt in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden[70, 221].
In einem Mausmodell zur Atherosklerose mit Apolipoprotein E-defizienten Mäusen kam es nach intravenöser und oraler Inokulation mit *P. gingivalis* zu einer beschleunigten Progression der atherogenen Plaquebildung[236] beziehungsweise zu einer gesteigerten vaskulären Aktivierung[225]. 2002 wurde, durch Rgp und Kgp vermittelt, die Störung der Zytokinantwort in infizierten humanen Endothelzellen der vena umbilicalis beschrieben. Auch für einen möglichen Verlust der Lebensfähigkeit dieser Endothelzellen konnten diese Gingipaine verantwortlich gemacht werden. Die Expression von IL-8 und dem monozyte chemoattractant protein-1 mRNA in den Endothelzellen wurde deutlich durch den *P. gingivalis* Wildstamm induziert. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass *P. gingivalis*, dank der konzertierten Aktion von Rgp und Kgp, die Zytokinantwort innerhalb der Wirtszellen moduliert, die Adhäsionsaktivität und die Lebensfähigkeit stört und folglich zur Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen beitragen kann[24]. RgpA steigert dazu die Responsivität von Endothelzellen gegenüber den LPS von *P. gingivalis* wie auch gegenüber den Bakterienzellen insgesamt, was sich in einer gesteigerten IL-8 Produktion, über PAR und Phopholipase C gamma kommuniziert, wiederspiegelt. Zugleich führt dies auf gleichem Wege zu einer exozytotischen Freisetzung von vasoaktiven Substanzen enthaltenen WPBs (Weibel Palade bodys). Das darin enthaltene Angiopoietin-2 vermittelt vermutlich die vom RgpA induzierte gesteigerte Zellresponsivität des Endothels[184]. Eine weitere Arbeitsgruppe brachte die voran besprochene Anoikis in einen möglichen Zusammenhang mit pathologischen Prozessen wie kardiovaskulären Erkrankungsformen[383].
Die Beobachtung, dass durch *P. gingivalis* stimulierte Makrophagen in der Gegenwart von LDL (low-density lipoproteins) Schaumzellen ausbildeten, führte dazu, die Interaktionen zwischen LDL und *P. gingivalis* näher zu untersuchen. Das LDL aggregiert dosisabhängig mit *P. gingivalis* respektive seinen OMV´s und ein Abbau des Apo B-100 Proteins konnte direkt nachgewiesen werden[271]. Dieser Abbau von Apo B-100 durch Rgp scheint eine Schlüsselrolle bei der Förderung der Artherosklerosis durch *P. gingivalis* inne zu haben[156]. Des Weiteren nimmt die Mobilität des LDL´s in der Gegenwart dieser Spezies zu. Das LDL wird an spezifische Proteine des Bakteriums gebunden, so dass vermutet wird, dass diese Proteine eine Rolle bei der Aggregation spielen. Da Proteinaseinhibitoren einige dieser Effekte auch wieder abschwächen können, sind auch hier Zusammenhänge zwischen Parodontitis und Atherosklerosis vorstellbar[271].
Es ist jedoch zu betonen, dass die Signifikanz der Ätiologie von *P. gingivalis* bei kardiovaskulären Erkrankungen noch völlig unklar ist[282].
Allgemeiner wird formuliert, dass Gingipaine R die Gerinnungskaskade triggern und dadurch zur Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen beitragen können[347, 180].
Da auch der Typ 2 Diabetes als wichtiger Risikofaktor für die Parodontitis angesehen wird, wurde jüngst Mäusen, mit dieser ihnen angezüchteten Erkrankung, einmal *P. gingivalis* ATCC 33277 und einmal ein mutierter, *rgpA rgpB kgp* defizienter Typstamm injiziert. Die Tiere reagierten interessanterweise ohne signifikanten Unterschied gleich ungünstig mit schwerer Inflammation auf die beiden Typstämme[186]. Gingipaine scheinen in diesem Modell anscheinend nicht von ausschlaggebender Bedeutung zu sein.
Über möglicherweise ungünstige Interaktionen zwischen einer Parodontitis respektive von Gingipainen und der Möglichkeit der gesteigerten Anfälligkeit von oralen Keratinozyten für HIV wird momentan aufgrund der dünnen Datenlage nur sehr vorsichtig spekuliert. Belegt ist eine durch Gingipaine provozierte Expression eines R5-spezifischen Korezeptors CCR5, der normalerweise von den Keratinozyten nicht exprimiert wird[125], eine andere Untersuchung deutet eher das Gegenteil an[469], dass heißt, weitere Studien sind diesbezüglich noch abzuwarten.
Gleiches gilt für den beobachteten negativen Einfluss der Gingipaine auf das regenerative Potential von Enamel Matrix Derivaten (EMD), die in den letzten Jahren zunehmend gerne in der zahnärztlichen Chirurgie aufgrund ihrer mitogenen respektive regenerativen Eigenschaften eingesetzt werden (meist

mit Guided Tissue Regeneration, (GTR) gleichgesetzt). Die PDL-Zellen (periodontal ligament cells) reagieren in Anwesenheit von Gingipainen und ihren kooperativen Effekten offensichtlich deutlich verschlechtert auf die eigentlich von EMD positiv beeinflussten Wundheilungsabläufe[182].

3.5 Synergismen mit anderen Spezies und quorum sensing

Gramnegative Bakterien bilden sogenannte Outer membrane vesicles, in denen zahlreiche Enzyme enthalten sind, die in der periplasmatischen Region der Zelle auftauchen. Diese beinhalten Phospholipase C, Proesterasen, Alkalische Phosphatase, Hämolysine und Autolysine. Es existiert eine gewisse Evidenz dafür, dass diese Vesikel in der Lage sind, mit der Outer membrane von anderen Spezies zu fusionieren, was zu einer Schädigung der Zielzellen führt[198, 161].
Obwohl Synergismen zwischen verschiedenen Spezies im so genannten Murin-Abszessmodell anscheinend sehr gehäuft anzutreffen sind, sind die zwischen *T. forsythia* und *P. gingivalis* von einer besonderen Qualität, da ihr additiver Effekt auf die Abszessbildung beeindruckt. Dieser synergistische Charakter kann seitens der uns hier interessierenden Spezies explizit den Gingipainen zugeordnet werden[479]. Eine darauf aufbauende Studie konnte aufzeigen, dass ein Produkt oder eine Komponente der Spezies *T. forsythia* das Wachstum von *P. gingivalis* unter Nährstoff limitierten Bedingungen stimuliert. Die Gingipaine stehen dabei in Verdacht, bei der Verwertung oder der Aufnahme dieses wachstumsfördernden Faktors eine wichtige Komponente zu sein[480]. Seit längerem wird *T. forsythia* eine trypsin-like activity zugesprochen, einhergehend mit hämolytisch wirkenden prtH Protease[347]. Synergismen sind sicherlich auch hieraus denkbar. Es scheint sich langsam das Wissen um die anscheinend enge synergistische Verflechtung dieser beiden Spezies zu verdichten.
Im Zusammenleben der beiden Parodontalpathogenen *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* ist bezogen auf die Gingipaine bekannt, dass diese die Konkurrenz zwischen beiden Spezies fördern. Man weiß, dass der proteolytische Abbau von Leukotoxin der Spezies *A. actinomycetemcomitans* durch *P. gingivalis* nachweislich von der Aktivität der R- und K-Gingipaine abhängt[193]. Aber auch *A. actinomycetemcomitans* verfügt über eine trypsin-like activity und die Fähigkeit, Typ I Kollagen und Fibronektin zu degradieren. Wobei hier offenbleiben muss, ob die Gingipaine ebenso Typ I Kollagen spalten oder nicht, denn die vorliegenden Ergebnisse hierzu sind eher wiedersprüchlich[30, 37, 196, 165, 347].
So ist zumindest für die Spaltung des Fibronektins ein Synergismus zwischen diesen beiden Spezies vorstellbar.
Der gleiche Synergismus bezüglich des Fibronektins ist auch mit der Spezies *P. intermedia* vorstellbar, auch von dieser Spezies ist der Abbau dieses Moleküls bekannt. *P. intermedia* spaltet weiter auch verschiedene Immunglobuline, Plasmaproteine, Elastin, Cystatin C und es zeigt eine Glycylprolylpeptidaseaktivität. Auch hier tauchen deckungsgleiche Aktivitätsmuster zwischen Gingipainen und Eigenschaften von *P. intermedia* wie beim Cystatin C[61] auf vielleicht auch bei der Hydrolyse von Immunglobulinen[485, 267, 492, 477, 347].
Auch hier ist interessant, dass *P. gingivalis* das durch andere Spezies induzierte IL-1α der Monozyten durch seine Proteinasen respektive der R- u. K-Gingipaine und LPS in seiner Wirkung wieder aufheben kann. Dieses beeinträchtigt infolge der Reduktion des proinflammatorischen Zytokinspiegels die Fähigkeit des Wirts, die Infektion zu bekämpfen[50].
Auch mit *T. denticola* sind diverse Synergismen vorstellbar, aber bezüglich der Gingipaineffekte schlicht und ergreifend nicht untersucht. *T. denticola* verfügt ebenso wie *P. gingivalis* über ein komplexes proteolytisches System. Bekannte Effekte sind zytopathische Einflüsse auf epitheliale Zellen wie der Verlust von Zellkontakten und der Degradation von perizellulärem Fibronektin durch Trepolisin. Trepolisin aktiviert auch eine IL-1β-Vorstufe, welche Entzündungen stimuliert, es fördert die Migration von *T. denticola* durch die Basalmembran hindurch, einhergehend mit den Degradationen ihrer Hauptkomponenten und der extrazellulären Matrixproteine einschließlich von Fibronektin, Laminin und Typ IV Kollagen. Es aktiviert latente MMP´s (auch MMP-8, MMP-9 von PMN) und könnte somit Bindegewebeschäden begünstigen. Weiterhin spaltet es IgA, IgG, Fibrinogen, Transferrin, α-Proteinaseinhibitor, Substanz P und Angiotensin. Hinzu gesellen sich prolylspezifische Proteinasen (Prolin Iminopeptidase, Prolyl Dipeptidyl Peptidase, Prolyl Oligopeptidase). Deren konzertierte Aktion steuert zur Dysregulation des Entzündungsprozesses im Parodontium mit bei[347]. Viele dieser Charakteristika werden entweder auch den Gingipainen zugesprochen oder könnten den Wachstumsbedürfnissen von *P. gingivalis* wunderbar dienlich sein, man bekommt fast den Eindruck, beide Spezies, *P. gingivalis* und *T. denticola* könnten kaum ohne einander existieren.

2002 wurde ungewöhnlicher Weise einmal in einer Studie die Fragestellung untersucht, ob quorum sensing bei der Regulation von Rgp und Kgp eine Rolle spielt. Dafür fokussierte man sich auf das Signalmolekül *LuxS*-abhängigen AI-2 (Autoinducer-2). *P. gingivalis LusS*-Mutation produzierte rund 45% weniger Rgp und 30% weniger Kgp-Aktivität als der nicht mutierte elterliche Wildtyp W50. Gleichsam fiel ein um das Vierfache reduzierter Hämagglutinintiter auf. Diese Virulenzreduktion der *LuxS*-Mutation reichte aber nicht aus, um im Murin-Infektionsmodell nach Kesavalu eine *P. gingivalis* Infektion abzuschwächen[58].
Abschließend lässt sich sagen, dass viele Synergismen mit anderen Spezies existieren könnten, ja auf der Hand liegen, jedoch wie die konkurrierenden Eigenschaften oder wie die Mechanismen des quorum sensing nicht oder nur wenig untersucht sind.

3.6 Hemmstoffe der Gingipaine

> "Thus, it should only be a question of time before inhibitors to this enzyme (Rgp) will be developed and, hopefully, be used to reduce the pathologies associated with the development of periodontitis and/or eliminate the disease altogether." (J. Travis, A. Banbula, J. Potempa 2000)[442]

Wir sind auch neun Jahre nach dieser optimistischen Prognose noch weit davon entfernt, einen Hemmstoff entwickelt zu haben. Man kann zurzeit lediglich einen Überblick über die vorhandenen Einzelarbeiten geben, was einem Sammelsurium diverser inhibierender Moleküle entspricht.
Beginnen wir mit Histatin 5. Es ist als körpereigener Hemmstoff von Gingipainen, auch von MMP-2 und MMP-9, bekannt. Das Enzym ist im Speichel gelöst und Bestandteil der angeborenen Immunabwehr. Die Arg-Gingipaine inhibiert es kompetetiv, die Lys-Gingipaine werden bei geringeren Histatin 5 Konzentrationen nichtkompetetiv inhibiert. Folglich kann Histatin 5 als bedeutender Faktor zum Schutz der oralen Gewebe betrachtet werden[147].
2002 wurden weitere Hemmstoffe für HRgpA und RgpB beschrieben. Bestimmte Benzamidinderivate (am optimalsten, wenn die beiden aromatischen Ringe über Harnstoff miteinander verbunden sind), lassen sich in ihrer Effektivität um das 2-3fache in Anwesenheit von niedrig konzentriertem Zink steigern und man hält es für vorstellbar, Zinkinhibitorkomplexe in der Therapie von Gingivitis und Parodontitis zu nutzen[222]. Ein Jahr später beurteilte ein weiteres Team diese Effekte anhand zweier Typstämme, gewonnen von Patienten mit schwerer Parodontitis. Pentamidin und Bis-Benzamidinderivate mit Pentamidin verwandten Strukturen zeigten die deutlichsten Effekte bei der Reduktion der amidolytischen Aktivität von 35%, der Wachstumsinhibition und der Reduzierung der Hämagglutination. Die Phagozytosekapazitäten der Granulozyten nahmen in der Folge zu. Jedoch sind auch dieses lediglich *in vitro* Ergebnisse[101], klinische *in vivo* Studien stehen zurzeit noch aus.
Als potente Proteinasehemmstoffe sind auch seit längerem Tetracycline, insbesondere Doxycyclin und ihre chemisch modifizierten Derivate ohne antimikrobielle Eigenschaften (CMT´s)[129] bekannt. Doxycyclin als auch einige CMT´s inhibieren Arg- und Lys-Gingipain sowie die kollagenolytische Aktivität von *P. gingivalis*[139, 176]. Selbst subletale Dosen von verschiedenen Antibiotika der Tetracyclinfamilie können potentiell die Physiologie der Spezies beeinflussen, auch wird deren Proteinaselevel beträchtlich reduziert, was anscheinend jedoch nicht gleichbedeutend mit einer Reduktion der Aktivität von OM-vesikelassoziierten Arg- und Lys-Gingipainen ist[140].

Eine neuere Hemmstoffgruppe sind Polyphenolfraktionen aus Cranberrys. Diese können die synergistische Biofilmbildung von *P. gingivalis* und *Fusobacterium nucleatum* ebenso inhibieren wie die Arg- und Lys-Gingipainaktivität der Typstämme *P. gingivalis* ATCC 33277 und FDC 381[474]. Eine andere Gruppe schrieb den Cranberrypolyphenolen das zusätzliche Potential zu, auch einer Proliferationshemmung von *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* in der parodontalen Tasche förderlich zu sein[46].
Eine andere Strategie der Hemmstoffentwicklung ist es, auf der Basis der Röntgenstrukturanalyse von RgpB einen strukturbasierten Liganden zur Inhibition von RgpB und Kgp zu designen. Als brauchbare Liganden wurden Chloromethylketone entwickelt mit spezifischer Affinität zu der Zinn-bindenden Region der beiden Proteinasen. Den Autoren zufolge steht damit ein bedeutendes Strukturelement für die Entwicklung spezifischer Gingipaininhibitoren zu Verfügung[43].
Andere potente Inhibitoren von Rgp und Kgp sind Carbobenzoxy-Lys-Arg-CO-Lys-N-$(CH_3)_2$ (KYT-1) und Carbobenzoxy-Glu(NHN(CH_3)Ph)-Lys-CO-NHCH$_2$Ph (KYT-36). Auch sie zeigen eine nur geringe

bis gar keine Tendenz zur Hemmung von Säugetierproteinasen wie Trypsin oder Kathepsin B, L oder H. Die Kombination beider Inhibitoren (KYT-1 und KYT-36) führt zu einer ausgeprägten Hemmung des Abbaus einer Vielzahl von Wirtsproteinen wie Typ I Kollagen, Immunglobulinen, Fibronektin und Fibrinogen, wie auch die Störung der bakteriziden Aktivität der PMN und die gesteigerte Gefäßpermeabilität deutlich gemindert sind. KYT-1, allein angewandt, wirkt sich sehr günstig auf die Lebensfähigkeit humaner Fibroblasten aus, die Adhäsion und die Hämagglutination von *P. gingivalis* werden stark gestört, so dass diese Stoffe weiter untersucht werden sollten[200].
Ein weiterer Hemmstoff ist das Leupeptin, dass auch dafür bekannt ist, dass es die Penetrationsfähigkeit der Spezies *P. gingivalis* durch Gewebe hindurch reduziert[19]. Es gilt, wie auch das Arginin, als Inhibitor sämtlicher Arg-Gingipaine und hemmt daneben auch die Thrombozytenaggregation[338]. Im Tierversuch mit Ratten wurde experimentell eine *P. gingivalis* induzierte Gingivitis erzeugt, die sich explizit den Rgp und Kgp Einflüssen zuordnen ließ. Das als Hemmstoff eingesetzte Leupeptin zeigte vor allem in der späten Phase der Gingivitis einen ausgeprägten inhibitorischen Effekt[212].
Ein anderes hemmendes Agens, das z-VAD-FMK wurde verwendet, um die Kgp-Aktivität zu inhibieren, und wiederum das Leupeptin, um die Rgp-Aktivität von *P. gingivalis* W83 Gingipainaktiven Extrakten sowie eine mögliche synergistische Rolle unter den Gingipainen zu untersuchen. z-VAD-FMK oder Leupeptin verzögern, hemmen aber nicht den Zelladhäsionsverlust des Endothels, auch nicht bei gereinigten Gingipainen. Die teilweise Aufspaltung von N-Cadherin und die Spaltung von VE-Cadherin wurden überhaupt nicht inhibiert. Ein Abbau von Integrin β1 wurde nur in Gegenwart von z-VAD-FMK inhibiert[384].
Auch einige Catechinderivate des grünen Tees zeigen inhibitorische Aktivität gegen Gingipaine, vor allem gegen Rgp, in etwas geringerem Ausmaß auch gegen Kgp. Für die Autoren gab dies Anlass zu der Hoffnung, dass diese Stoffe durchaus das Potential hätten, einen parodontalen „breakdown“ reduzieren zu können[319].
In jüngster Zeit ist es gelungen, ein Peptid zu synthetisieren, das die Hämagglutination hemmen kann. Dank diesem Peptid kommt es zu keiner Interaktion mehr mit Glykophorin A, dem Angriffspunkt auf der Erythrozytenmembran[367]. Grundsätzlich scheinen auch bestimmte virale Hemmmechanismen zu existieren, welche für Caspaseinhibitoren stehen, die unter anderem auch Gingipainaktivitäten regulieren können[408]. Die Möglichkeiten, die sich aus diesem noch sehr fragmentarischen Wissen ergeben könnten, müssen leider noch geduldig abgewartet werden.

Hemmstoffe die spezifisch für Arg-Gingipaine sind:

Jüngst stellte sich heraus, dass DX-9065a, eigentlich ein selektiver Faktor X-Inhibitor, auch ein Hemmstoff der amidolytischen Aktivität von RgpA und RgpB ist, daneben aber auch die Trypsin-like Aktivität von *P. gingivalis* in der Sulkusflüssigkeit inhibiert, so dass dieser Stoff eventuell für eine zukünftige Therapie der Parodontitis von Nutzen sein könnte[257]. Weitere bekannte Inhibitoren sind daneben Phosphoramidon, E-64 und TPCK[316].
Von kultivierten Streptomyces Spezies FA-70 wurde FA70C1 gewonnen, ein „Antipain“, analog zusammengesetzt zu Phenylalanyl-ureido-citrullinyl-valinyl-cycloarginal ($C_{27}H_{43}N_9O_7$). Es hat wenig bis keinen Effekt auf das Lys-Gingipain. Es vermag *in vivo* Gefäßpermeabilitätssteigerung zu inhibieren, das Wachstum der Spezies wird dazu dosisabhängig supprimiert. FA70C1 verhindert die PMN-Funktionsstörung und wirkt sich postinfectionem positiv auf die Lebensfähigkeit von Fibroblasten und humanem Endothel der vena umbilicalis aus. Die Autoren betrachteten FA70C1 als brauchbares Instrument, um die Virulenz von *P. gingivalis* abzuschwächen[199].
RgpA und RgpB werden außerdem durch p-Hydroxymercuribenzoat, Tosyl-L-Lysin Chloromethylketon (TLCK), N-Ethylmaleimid, EDTA, Leupeptin, L-trans-Epoxy-Succinylleucylamido-(4-guanidino)butan sowie durch Antipain inhibiert[116]. Auch das Molekül Marabaricon C, isoliert aus der Muskatnuss (*Myristica fragrans*), inhibiert Arg-Gingipain irreversibel und unterdrückt in der Folge dessen das Wachstum von *P. gingivalis*[389].
Das angeführte TLCK inhibiert oder verzögert signifikant den Verlust der Zelladhäsion im Endothel, da die Aufspaltungen von N-und VE-Cadherin wie auch von Integrin β1, ansonsten durch die Gingipaine von *P. gingivalis* W83 ausgelöst, reduziert sind. Daraus folgt auch ein entsprechend selteneres Auftreten apoptotischer Ereignisse im Endothel[383], so dass auch hier positive Ansätze erkennbar sind.

Hemmstoffe die spezifisch für Lys-Gingipaine sind:

Aus Versuchsreihen mit verschiedenen gingipaindefizienten Mutationen des Typstammes *P. gingivalis* W50 kristallisierte sich Kgp, bedingt durch seine Rolle bei der Ernährung und der Virulenz der Spezies, als das lohnenswerteste Ziel einer möglichen medikamentösen Therapie heraus. Dem Hemmstoff A71561 (entspricht 1-(3-phenylpropionyl)piperidine-3(*R,S*)-carboxylic acid-[4-amino-1(*S*)-(benzothiazole-2-carbonyl)butyl] amid) wird potentielles therapeutisches Potential hinsichtlich einer möglichen und anstrebenswerten Kontrolle der *P. gingivalis* Infektionen zugesprochen. A71561 vermindert die Virulenz, stört die Pigmentbildung und das Wachstumsvermögen dieser Organismen ohne dabei, soweit dies bekannt ist, Sägetierproteinasen zu hemmen[80].
Die Natur ist aber auch noch für Überraschungen gut. Zwei bei einer Haispezies vorkommende Antigenrezeptoren, die an die Kgp-Adhesindomäne binden, konnten rekombinant in *Escherichia coli* synthetisiert werden, ohne jedoch die Adhesinaktivität zu inhibieren[302, 303]. Dieser Ansatz sollte auch noch zukünftig Gegenstand weiterer Bemühungen zu sein, es liegen aber bis dato keine weiteren Publikationen diesbezüglich vor.
Neueren Datums ist die Entdeckung, dass Derivate der so genannten „Aza-Peptid Michael Akzeptoren“ (Aza-Lys und Aza-Orn) unter anderem Gingipain K irreversibel inhibieren. Diese Akzeptoren sind potente und spezifische Inhibitoren der Familie der CD Cysteinproteinasen. In der Untersuchung sind auch keinerlei Kreuzreaktivitäten gegen Papain, Kathepsin B oder Calpain aufgetreten, andererseits wird jedoch noch an einer Verbesserung der Spezifität gearbeitet[104].
Als weitere Inhibitionsmoleküle des Kgp gelten noch p-Hydroxymercuribenzoat, N-Ethylmaleimide und TLCK[116] und finden hier nur noch der Vollständigkeit halber Erwähnung.

3.7 Immunisierung gegen Gingipaine

Schon 1997 untersuchte ein Team einen monoklonalen Antikörper, der hämagglutinierende Proteinase erkennt und folglich die Hämagglutination von humanen Erythrozyten experimentell verhindert. Die blockierte Adhäsion von *P. gingivalis* an die Erythrozyten wurde als möglicher Weg erachtet, eine Rekolonisation durch die Bakterien zu unterbinden[47].
Eine Studie an nichthumanen Primaten, *Macacae fascicularis*, konnte schon 1998 die aktive Immunisierung gegen Cysteinproteinasen (Porphypain-2) demonstrieren. Der IgG Antikörperspiegel konnte um das 194-fache angehoben werden, woraus ein Schutz gegen *P. gingivalis* induzierten Knochenverlust resultierte[275]. Das Auftreten dieser Spezies wurde dadurch aber leider nicht reduziert, was zum einen an den schlechten opsonierenden Eigenschaften dieser Antikörper liegen kann und zum anderen daran, dass das markierte Antigen nur mäßig relevant war für die Kolonisierung von *P. gingivalis*. In einer späteren Arbeit wurden Mäuse subkutan mit RgpA oder RgpB immunisiert, mit der Quintessenz, dass nur die mit RgpA geimpften Tiere vor Knochenverlust geschützt waren[127]. Die IgG-Antworten richten sich direkt gegen Gingipain R1 und Gingipain K, mit starker Reaktion gegen die Hämagglutinindomänen dieser Proteinasen. Eine Reaktion ist auch gegen die katalytische Domäne von Gingipain R1 zu finden. Einem japanischen Team gelang es vor einigen Jahren im Tierversuch, ein *rgpA* DNA Vakzin zu konstruieren und damit bei Mäusen eine Immunreaktion gegen *P. gingivalis* W50 zu erzeugen. Das Serum dieser immunisierten Tiere vermochte es, die proteolytische Aktivität der Arg-Gingipaine zu reduzieren, die Bindung der Spezies an Typ I Kollagen zu inhibieren und die Hämagglutininaktivität von RgpA effektiv zu drosseln. Im Murin-Abszeß-Modell waren die Mäuse daraufhin resistent gegenüber einer invasiven *P. gingivalis* W50 Herausforderung[481]. In einer darauf aufbauenden Studie konnte eine Reduktion der Letalität gegenüber letalen Dosen von *P. gingivalis* W50 bei den in gleicher Weise immunisierten Mäusen dargestellt werden. Danach wurde bei diesen Tieren ein angehobener Spiegel an IL-2, IL-4, IL-5 und IL-12 sowie ein vermindertes Niveau an Interferon γ (IFN-γ) gefunden. Der Regulation der Letzteren wurde von den Autoren, wohl hervorgerufen durch die Immunisierung, eine signifikante Rolle im Schutz gegen die *P. gingivalis* Infektion bei Mäusen nachgesagt[482]. Unter zur Hilfenahme der Spezies *Lactobacillus paracasei* konnten funktionelle Antikörper entwickelt werden, die gegen RgpA gerichtet sind. Die Autoren erhofften sich über diesen Weg die Möglichkeit der Therapie als auch der Prävention der Parodontitis[250].
Eine Immunisierung von Mäusen mit R-Gingipainen schützt diese nachweisbar vor einer Herausforderung durch *P. gingivalis*. Hinzu kommt, dass eine Immunisierung mit einem Peptid, dass

dem N-terminalen Ende der katalytischen Domäne von Gingipain R1 entspricht, zu einer Immunreaktion führt, die den Mäusen einen Schutz vor der Infektion mit dieser Spezies bieten kann[123, 304]. Ein anderes Team konnte dieses Ergebnis im Mäusemodell zum Teil bestätigen. Die dort erzielte IgG-Immunisierung schützte die Tiere vor durch von *P. gingivalis* induziertem, oralem Knochenabbau, wobei sich dieses Resultat explizit auf eine RgpA stimulierte, hämagglutininspezifische Antikörperproduktion zurückführen ließ[127]. Ein anderes Team sieht speziell HRgpA und Kgp als potentielle Kandidaten für ein „Anti-*P. gingivalis* Vakzin". Sie untersuchten im Tierversuch, ob diese Enzyme über opsonierbare und zugängliche Zielregionen bei intakten *P. gingivalis*-Zellen verfügen. IgG wurde dafür aus vorher immunisierten Kaninchen gewonnen und die funktionellen Charakteristika hinsichtlich der Opsonierung der Zielzellen, der Phagozytose und des Abtötens von intakten Zellen seitens der PMN anhand von vier Serotypen der Spezies (33277 Serotyp A, A7A1-28 Serotyp B, W50 Serotyp C, 381 Serotyp D) beurteilt. HRgpA als auch Kgp zeigen opsonierbare Zielregionen, provozieren folglich auch hohe IgG-Titer und eine Steigerung der „Todesfallrate" durch PMN bei allen vier Serotypen[284]. Die Gingipaine (RgpA und Kgp) könnten nach Aussage dieser Arbeitsgruppe potentielle Kandidaten für die Vakzinentwicklung sein, in der Konsequenz hilfreich für die Prävention der durch *P. gingivalis* provozierten Parodontitis[285].
Eine weitere Untersuchung bescheinigt im Tierversuch der B Untereinheit des Choleratoxins einen potenzierenden Effekt, wenn eine Immunantwort auf die rekombinante Hämagglutinin/Adhäsin Domäne von Kgp provoziert wird. Die Autoren erhoffen sich von rekombinanten Domänen zukünftig die Möglichkeit der Impfstoffentwicklung[493]. Gegenwärtig werden die molekularen Mechanismen, die auf rekombinante Impfstoffe erfolgen, weiter analysiert[494].
Ein Team untersuchte vor kurzem die Antikörperantwort von IgG_1 und IgG_2 auf unter anderem auch Proteine von *P. gingivalis*. IgG_1 und IgG_2 machen immerhin annähernd 90% des Gesamtaufkommens an IgG im Serum aus. Das Antigen, welches am häufigsten von beiden Globulinen erkannt wurde, hatte ein Molekulargewicht von 47kDa und die Autoren vermuteten, dass es sich hierbei um Arg-Gingipain handelt[48].
Studien mit RgpA-Kgp Proteinase-Adhäsinkomplexen unterstreichen diese Beobachtungen im Rattenmodell mit hohen IgG_{2a} Serumtiterantworten, wie sie auch in Tierversuchen auftreten, in denen mit intakten aber abgetöteten *P. gingivalis* Zellen gearbeitet wird[382]. Wird ein RgpA-Kgp-Komplex, ein funktionell bindendes Motiv oder „active site"-Peptide als Vakzine verwendet, wird eine Th_2-Antwort induziert, die die RgpA-Kgp-Komplexe blockiert[309]. Bei der humanen adulten Form der Parodontitis konnte eine IgG-Antwort gegen die RgpA-Kgp-Komplexe mit folgender Verteilung beschrieben werden: $IgG_4 > IgG_2 > IgG_3 = IgG_1$[305]. Auch Patienten mit einer generalisierten aggressiven Parodontitis haben angehobene Levels an *P. gingivalis*- und gingipainspezifischem IgG. Die Gingipainantikörper fördern nachgewiesenermaßen die Aufnahme von *P. gingivalis* durch die PMN[128].
Im Rattenmodell wurden hohe IgG_{2a} Antikörpertiter gegen solche RgpA-Kgp-Komplexe induziert, die einen restriktiven Effekt auf die *P. gingivalis* Kolonisation sowie den parodontalen Knochenverlust bei den Tieren hervorrief[352]. Eine interessante Rolle kommt wohl der beobachteten Glykosylierung von $RgpA_{cat}$ zu, bei der es sich unglücklicherweise um das Hauptangriffsziel von IgG zu handeln scheint. Diese Glykosylierung protektiert offensichtlich die Primärstruktur der Proteinase vor einer Erkennung durch das Immunsystem und repräsentiert damit eine geschickte Strategie des Unterlaufens des humanen Abwehrsystems[397].
Reife Gingipaine werden häufig als membrangebundener, glykosylierter Proteinaseadhäsinkomplex präsentiert, der aus multiplen Adhäsindomänen (HA_1-HA_4) sowie einer katalytischen Domäne besteht. Patienten mit einer chronischen Parodontitis produzieren deutlich mehr IgG, welches mit Gingipaindomänen reagiert. Die Autoren glauben, dass geboostete Antikörpertiter gegen die HA_2 Domäne gerichtet, welche für die Hämoglobinbindung und der Akquisition von essentiellem Porphyrin wichtig ist, das Potential haben, das Wachstum dieser Spezies zu kontrollieren[295].
Die hämoglobinbindende Domäne (HA_2) bindet Hämoglobin und Hämin. Es konnte festgestellt werden, dass humane, humorale Anti-HA_2-Antikörper im Serum in nur relativ geringem Umfang vorhanden sind und vom Immunglobulin M (IgM) Isotyp dominiert werden. Die Menge an *P. gingivalis* in der Plaque stand in dieser Untersuchung in direkter Beziehung zu prätherapeutischen Anti-HA_2 IgG Spiegeln und es gab ebenso eine signifikante Beziehung zwischen dem prä- und posttherapeutischen Anti-HA_2 Titer. Die posttherapeutischen Anti-HA_2 IgG Antikörpertiter bezogen sich direkt auf die Fähigkeit der Serum-IgG-Fraktion, die Hämoglobinbindung durch Kgp zu neutralisieren. War diese neutralisierende Aktivität wiederum gering, konnte dies verstärkt mit Patienten mit schwerer Parodontitis in Zusammenhang gebracht werden. Hieraus ließ sich folgern, dass die Anti-HA_2 IgG Antikörper in direktem Zusammenhang mit parodontaler Gesundheit stehen[86, 87]. Hierbei zeigte sich, ebenso bei Ratten, dass durch die Immunisierung mit rHA_2 gleichsam die IgG_2 Antwort sich steigerte und dazu die Th_2/TH_1-gesteuerte Antwort relativ gemäßigt ausfiel, was klinisch ausreichte, um einen Schutz gegenüber der Parodontitis zu erzeugen[86]. Beim humanen Serum von Parodontitispatienten zeigten sich ebenso erhöhte IgG_2 Titer gegen die Hämagglutinindomäne, jedoch nicht gegen die

katalytische Domäne[183]. Dies könnte dadurch verursacht worden sein, dass die katalytische Domäne nicht auf der Oberfläche des Gingipainkomplexes dargestellt wird. Daraus entstand die Theorie, dass Antikörper gegen die Hämagglutinindomäne keinerlei protektive Immunität vermitteln. Man kann also feststellen, dass Teile der Antikörper, die gegen die Hämagglutinindomäne gerichtet sind, schützen, während es andere Teile wiederum nicht tun[382].
Eine Humanstudie berichtete, dass die Antikörperspiegel gegen die katalytischen Untereinheiten von RgpA und RgpB bei Parodontitispatienten nicht angehoben seien[183]. Eventuell sei die Schwäche solcher Patienten, ausreichend Antikörper gegen die katalytische Untereinheit der Gingipaine herzustellen, ein ätiologischer Faktor für die Parodontitis und somit wären diese Antikörper von entsprechender Bedeutung für die präventiven Strategien gegen diese Erkrankung. Gegen Ende der 90iger Jahre versuchte man erfolgreich mit einem synthetischen Aminosäurepeptid, dass das N-terminale Ende der RgpA-katalytischen Domäne repräsentierte (RgpA45), gekoppelt an Oligolysin, die IgG Antwort zu forcieren und somit vor *P. gingivalis* zu schützen[122]. Andere Arbeiten bestätigten, dass bei Parodontitispatienten eine nur sehr schwache IgG-Antwort gegen die katalytischen Domänen der Gingipaine (r-Rgp_{cat} und r-Kgp_{cat}), dagegen eine sehr ausgeprägte gegenüber rekombinanten Fragmenten von Hämagglutinindomänen (r-Rgp44 und r-Rgps 15-27) gefunden wurde, verglichen mit gesunden Patienten. Die Autoren sahen in der dünnen Responsivität gegenüber den katalytischen Domänen einen Schlüsselfaktor in der Infektion durch diese Spezies[183]. Es wurde sogar klar empfohlen, RgpA44 als Kandidaten für eine Impfstoffentwicklung anzusehen[476]. Weitere Ergebnisse aus ähnlichen Arbeiten sind, dass Peptide der katalytischen Domänen von RgpA und Kgp besser gegen den Angriff dieser Spezies schützen würden als solche von Hämagglutinindomänen[304]. Des Weiteren, dass ein DNA-Vakzin, das die katalytischen Untereinheiten von RgpA und Kgp kodiert, ebenso gegen diese Bakterienart schützt könne[224] und das die Verwendung von peptidspezifischen Antikörpern gegen adhäsinbindende Motive von *P. gingivalis* im Murin-Parodontitismodell Schutz vor parodontalen Knochenverlust bietet und die Bindung des RgpA-Kgp-Komplexes an Fibrinogen, Fibronektin, Typ V Kollagen und Hämoglobin inhibiert[309]. In jüngster Zeit konnte anhand eines weiteren Mäusemodells bestätigt werden, dass sich diese Tiere mit Hilfe von *rgpA* DNA Vakzinen, transnasal appliziert, gegen durch *P.* gingivalis induzierten Knochenverlust immunisieren lassen[272]. Auch konnte mit Serum von Mäusen, die vorab mit der DNA von *P. gingivalis* immunisiert wurde, welche wiederum spezifisch für die katalytische und die Adhäsionsdomäne von HRgpA war, der Abbau von humanen Fibronektin inhibiert werden[448]. Summa summarum wird hiermit die Bedeutung der gegen die katalytischen Domänen gerichteten Antikörper bezüglich der Herausforderung durch diese Organismen entsprechend deutlich[382].
Nun kann sich der geneigte Leser fragen, warum es denn dann noch keinen Impfstoff gibt? Nun, eines der Hauptprobleme ist, dass die chronische Parodontitis polymikrobieller und vor allem multifaktorieller Genese ist. Es bedarf eines Vakzins, das auf den wahrscheinlichsten pathogenen Mikroorganismus des erkrankten Wirts abzielt. Aber ein Vakzin würde keineswegs bei jedem Individuum immer auch seine gewünschte volle Wirkung entfalten. Diese Schwierigkeit resultiert aus der Vielfältigkeit der Serotypen respektive der Genotypen der Spezies. Daneben lassen sich die vielen tierexperimentellen Studien nur eingeschränkt auf den Menschen übertragen. Die Unterschiede ergeben sich aus der Andersartigkeit des mikrobiellen Ökosystems, den histologischen Bestandteilen der jeweiligen parodontalen Läsion, den Immunreaktionen und den Regulationsmechanismen der Immunklassen und Subklassen und ihren Reaktionen im Falle von nichthumanen Primaten[130]. Des Weiteren handelt es sich bei den protektiven Ergebnissen um Kurzzeitbeobachtungen. In wie weit das Immunsystem einen Memoryeffekt gegen zukünftige Reinfektionen aufbaut bleibt ebenso unklar wie die Fähigkeit, eine T-Zell getriggerte Immunreaktion zu erzielen. Dazu kommt, dass die funktionellen Unterschiede zwischen den Antikörpern, die im infizierten Wirt zu denjenigen, die infolge einer Immunisierung hergestellt werden noch nicht ganz klar sind, außer der Erkenntnis, dass die eigenen Antikörper des infizierten Wirts nicht in der Lage sind, die Erkrankung zu besiegen. Mit der Verwendung von Vakzinuntereinheiten statt ganzer Zellen sind zwar toxische Reaktionen unwahrscheinlich, aber die induzierte Immunogenizität hat ein nur geringes Niveau und die Präparation ist hinsichtlich möglicher Verunreinigungen technisch sehr aufwendig. Folglich wären vielleicht ganze Vakzincocktails für multiple bakterielle Antigene anzustreben. Vakzine könnten sich nicht nur gegen die spezifischen Parodontalpathogene richten, sondern auch gegen deren Vorläufer[382]. Wobei dafür das quorum sensing und die Mitglieder dieser „Gesellschaft“ im Biofilm erst einmal bekannt sein müssten. Gegenwärtig wird ja sogar noch über so grundlegende Fragen diskutiert, ob nicht die subgingivalen Mikroorganismen nicht ihren eigenen supragingivalen Biofilm erzeugen oder unterhalten oder ob der supragingivale Biofilm tatsächlich immer und bei jedem erkrankten Individuum ursächlich für den subgingivalen Biofilm ist[449]. Vielleicht liegt auch in einem solchen Weg die Zukunft, bei dem technisch nichtpathogene Mikroorganismen erzeugt werden, welche kompetetiv und irreversibel von Epitopen des Biofilms adsorbiert werden können. So könnte vielleicht die Koaggregation und die Maturation des Biofilms unterbunden werden. Studien dazu stehen jedoch noch aus. Eventuell eröffnet auch die

Nanotechnologie über so genannte „Nanospheres“ und Liposome für eine kontrollierte Freisetzung von Proteinen oder Nukleinsäuren für die präzise Applikation von Vakzinen in adäquater Menge neue Horizonte. Applikationswege, wie Nasensprays, Hautpflaster, Lutschbonbons, subkutan oder intramuskuläre Injektionen stehen schließlich verschiedenster Art zu Verfügung. Denkbar ist auch eine topische Applikation in den gingivalen Sulkus hinein[382].
Trotz einzelner ermutigender Ergebnisse gibt es bis dato kein alleinig und immer wirkendes Vakzin gegen die Parodontitis, zumindest nicht für die Anwendung bei unseren Artgenossen. Immerhin ist aber für unsere tierischen Freunde bereits ein kommerziell erhältliches Vakzin vorhanden. Die Modulation der humanen Immunantwort, die Einführung von genetisch veränderten Mikroorganismen mit strukturellen Epitopen von Zielantigenen für eine Vielzahl möglicher Parodontalpathogene, einschließlich denen von Viren während der Etablierung von normalen Kommensalen in der Mundhöhle von Neugeborenen könnten theoretisch entwickelt werden, um die Etablierung der Parodontalpathogene im späteren Lebensalter zu verhindern. Eine aktive Immunisierung, auch wenn sie optimal wäre, ist in naher Zukunft sicherlich nicht zu erwarten[382].

4. Zusammenfassung

Gingipaine sind Cysteinproteinasen des wohl in Ätiologie und Pathogenese der chronischen Erwachsenenparodontitis bedeutsamsten bakteriellen Erregers und zugleich die wichtigsten Virulenzfaktoren der Spezies *Porphyromonas gingivalis*. Die für diese extrazellulären Produkte kodierenden Gene sind *rgpA*, *rgpB* und *kgp*. Deren Produkte sind entsprechend HRgpA, RgpB und Kgp. HRgpA und RgpB verursachen eine Steigerung der Gefäßpermeabilität durch die Aktivierung des Kallikrein/Kinin-Systems und aktivieren die Blutgerinnung, welche potentiell mit der Synthese der Sulkusflüssigkeit und dem Fortschreiten der Entzündung bis hin zum Verlust des alveolären Knochens assoziiert sind. Offenbar wird dieses durch die Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen begünstigt. Kgp ist von den dreien die potenteste fibrinogen-und fibrinabbauende Proteinase und bei der Blutungsneigung der erkrankten Stellen involviert. HRgpA aktiviert besonders Blutgerinnungsfaktoren. Gingipaine stören das Komplementsystem und manipulieren den Zytokinhaushalt der Entzündungskaskaden. Die Gingipaine unterstützen die Kolonisierung von *P. gingivalis* durch die Bindung zu anderen Bakterien des subgingivalen Biofilms und der Bindung zu epithelialen Zellen. Sie vermögen an Laminin, Fibrinogen, Fibronektin, Hämoglobin und an manchen Typen von Kollagen zu binden. Alle können den Rezeptor CD14 auf Makrophagen abbauen und so die Leukozytenaktivierung hemmen. Sie regulieren die Infektionsintensität, den Bakterienhaushalt, die Aminosäurenaufnahme aus Wirtsproteinen und die Fimbrienreifung. Die Genetik, die Chemie und die virulenzverursachenden Eigenschaften der Gingipaine stehen seit Mitte der 90iger Jahre des letzten Jahrhunderts im Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Aufgrund ihrer Schlüsselrolle bei der Pathogenese der Parodontitis und der mikrobiellen Infektion sind die Gingipaine Ziele für die mögliche Entwicklung von Hemmstoffen respektive für Immunisierungsstrategien gegen die chronische Parodontitis.

Schlüsselwörter
Gingipaine, Cysteinproteinasen, Parodontitis/Therapie, *Porphyromonas gingivalis*, Virulenz, Vakzine

Summary:

Gingipains are cysteine proteases of the probably most important bacterial pathogen of the adult periodontitis in the field of etiology as well as pathology. At the time, they are the most important virulence factors of the species *Porphyromonas gingivalis*. The encoding genes of this extracellular products are *rgpA*, *rgpB* and *kgp*. Their products are corresponding HRgpA, RgpB and Kgp. HRgpA and RgpB induce vascular permeability enhancement through activation of the kallikrein/kinin system and activate the blood coagulation, processes potentially associated with gingival crevicular fluid synthesis and progression of inflammation which ultimately can lead to alveolar bone loss. Obviously, this will be favoured by matrix metalloproteinases. Kgp is the most potent fibrinogen/fibrin degrading enzyme of the three gingipains involved in the bleeding tendency at the diseased sites. HRgpA especially activates coagulation factors. Gingipains disturb the complement system and manipulate the cytokine network of the inflammation cascades. Gingipains support colonizing of *P. gingivalis* due to their connection to other bacteria of the subgingival biofilm and to epithelial cells. They are able to bind to laminin, fibrinogen, fibronectin, hemoglobin and some types of collagen. All of them are able to degrade macrophage CD14 receptor, thus preventing activation of the leukocytes. They regulate the intensity of infection and the bacterial housekeeping, including amino acid uptake from host proteins and fimbriae maturation. Genetics, chemistry and the virulence inducing properties of gingipains are the focus of scientific attention since the middle of the nineties of the last century.
Due to their key role in pathogenesis of periodontitis and microbial infection the gingipains are targets for the possible development of inhibitory substances, respectively for immunization strategies against chronic periodontitis.

Key Words
Gingipains, cysteine proteinase, periodontitis/therapy, *Porphyromonas gingivalis*, virulence, vaccine

Dr. Uwe Swaneburg
Westenhellweg 10
59494 Soest

5. Literaturverzeichnis

1. Abaibou, H., Z. Chen, G.J. Olango, Y. Liu, J. Edwards, H.M. Fletcher. 2001. *vimA* gene downstream of *recA* is involved in virulence modulation in *Porphyromonas gingivalis* W83. Infect. Immun. 69: 325-335.

2. Abe, N., T. Kadowaki, K. Okamoto, K. Nakayama, M. Ohishi, K. Yamamoto. 1998. Biochemical and functional properties of lysine-specific cysteine proteinase (Lys-gingipain) as a virulence factor of *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease. J. Biochem. 123: 305-312.

3. Abe, N., A. Baba, R. Takii, K. Nakayama, A. Kamaguchi, Y. Shibata, Y. Abiko, K. Okamoto, T. Kadowaki, K. Yamamoto. 2004. Roles of Arg- and Lys-gingipains in coaggregation of *Porphyromonas gingivalis*: identification of its responsible molecules in translation products of *rgpA, kgp*, and *hagA* genes. Biol. Chem. 385: 1041-1047.

4. Abraham, L.A., C. Chinni, A.L. Jenkins, A. Lourbakos, N. Ally, R.N. Pike, E.J. Mackie. 2000. Expression of protease-activated receptor-2 by osteoblasts. Bone. 26: 7-14.

5. Abrahamson, M., M. Wikstrom, J. Potempa, S. Renvert, A. Hall. 1997. Modification by cystatin C activity by bacterial proteinases and neutrophil elastase in periodontitis. Mol. Pathol. 50: 291-297.

6. Aduse-Opoku, J., J. Muir, J.M. Slaney, M. Rangarajan, M.A. Curtis. 1995. Characterization, genetic analysis, and expression of a protease antigen (PrpRI) of *Porphyromonas gingivalis* W50. Infect. Immun. 63: 4744-4754.

7. Aduse-Opoku, J., J.M. Slaney, M. Rangarajan, J. Muir, K.A. Young, M.A. Curtis. 1997. The T1a protein of *Porphyromonas gingivalis* W50: a homolog of the RI protease precursor (PrpRI) is an outer membrane receptor required for growth on low levels of hemin. J. Bacteriol. 179: 4778-4788.

8. Aduse-Opoku, J., M. Rangarajan, K.A. Young, M.A. Curtis. 1998. Maturation of the arginine-specific proteases of *Porphyromonas gingivalis* W50 is dependent on functional *prR2* protease gene. Infect. Immun. 66: 1594-1600.

9. Aduse-Opoku, J., N.N. Davies, A. Gallagher, A. Hashim, H.E.A. Evans, M. Rangarajan, J.M. Slaney, M.A. Curtis. 2000. Generation of Lys-gingipain protease activity in *Porphyromonas gingivalis* W50 is independent of Arg-gingipain protease activities. Microbiology 146: 1933-1940.

10. Aduse-Opoku, J., J.M. Slaney, A. Hashim, A. Gallagher, R.P. Gallagher, M. Rangarajan, K. Boutaga, M.L. Laine, A.J. Van Winkelhoff, M.A. Curtis. 2006. Identification and characterization of the capsular polysaccharide (K-antigen) locus of *Porphyromonas gingivalis*. Infect. Immun. 74: 449-460.

11. Albandar, J.M., I. Olsen, P. Gjermo. 1990. Association between six DNA-probe-detected periodontal bacteria and alveolar bone loss and other clinical signs of periodontitis. 48: 415-423.

12. Albandar, J.M., L.J. Brown, H. Loe. 1997. Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontits. J. Periodontol. 68: 973-981.

13. Albandar, J.M., A. Kingman. 1999. Gingival Recession, Gingival Bleeding, and Dental Calculus in Adults 30 Years of Age and Older in the United States, 1988-1994. J. Periodontol. 70: 30-43.

14. Allaker, R.P., J. Aduse-Opoku, J.E. Batten, M.A. Curtis. 1997. Natural variation within the arginine-specific protease gene, prpR1, of *Porphyromonas gingivalis*. Oral Microbiol. Immunol. 12: 298-302.

15. Ally, N., J.C. Whisstock, M. Sieprwaska-Lupa, J. Potempa, B.F. Le Bonniec, J. Travis, R.N. Pike. 2003. Characterization of the specificity of arginine-specific gingipains from *Porphyromonas gingivalis* reveals active site differences between different forms of the enzymes. Biochemistry. 42: 11693-11700.

16. Amano, A., S. Shizukuishi, H. Tamagawa, K. Iwakura, S. Tsunasawa, A. Tsunemitsu. 1990. Characterization of Superoxide Dismutases Purified from Either Anaerobically Maintained or Aerated *Bacteroides gingivalis*. J. Bacteriol. 172: 1457-1463.

17. Amano, A., T. Ishimoto, H. Tamagawa, S. Shizukuishi. 1992. Role of Superoxide Dismutase in Resistance of *Porphyromonas gingivalis* to Killing by Polymorphonuclear Leukocytes. Infect. Immun. 60: 712-714.

18. Amano, A., M. Kuboniwa, I. Nakagawa, S. Akiyama, I. Morisaki, S. Hamada. 2000. Prevalence of Specific Genotypes of *Porphyromonas gingivalis* fimA and Periodontal Health Status. J. Dent. Res. 79: 1664-1668.

19. Andrian, E., D. Grenier, M. Rouabhia. 2004. In vitro models of tissue penetration and destruction by *Porphyromonas gingivalis*. Infect. Immun. 72: 4689-4698.

20. Andrian, E., D. Grenier, M. Rouabhia. 2006. Porphyromonas gingivalis gingipains mediate the shedding of syndecan-1 from the surface of gingival epithelial cells. Oral Microbiol. Immunol. 21: 123-128.

21. Andrian, E., Y. Mostefaoui, M. Rouabhia, D. Grenier. 2007. Regulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by *Porphyromonas gingivalis* in an engineerd human oral mucosa model. J. Cell. Physiol. 211: 56-62.

22. Armitage, G.C. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann. Periodontol. 4: 1-6.

23. Baba, A., N. Abe, T. Kadowaki, H. Nakanishi, M. Ohishi, T. Asao, K. Yamamoto. 2001. Arg-gingipain is responsible for the degradation of cell adhesion molecules of human gingival fibroblasts and their death induced by *Porphyromonas gingivalis*. Biol. Chem. 382: 817-824.

24. Baba, A., T. Kadowaki, T. Asao, K. Yamamoto. 2002. Roles for Arg- and Lys-gingipains in the disruption of cytokine responses and loss of viability of human endothelial cells by Porphyromonas gingivalis infection. Biol. Chem. 383: 1223-1230.

25. Baehni, P., C.C. Tsai, W.P. McArthur, B.F. Hammond, N.S. Taichman. 1979. Interaction of Inflammatory Cells and Oral Microorganisms. VIII. Detection of Leukotoxic activity of a Plaque-Derived Gram-Negative Microorganism. Infect. Immun. 24: 233-243.

26. Baker, P.J., M. Dixon, R.T. Evans, D.C. Roopenian. 2000. Heterogeneity of *Porphyromonas gingivalis* strains in the induction of alveolar bone loss in mice. Oral Microbiol. Immunol. 15: 27-32.

27. Banbula, A., J. Potempa, J. Travis, W. Bode, F.-J. Medrano. 1998. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of gingipain R2 from *Porphyromonas gingivalis* in complex with H-D-Phe-Phe-Arg-chloromethylketone. Protein Science. 7: 1259-1261.

28. Banbula, A., M. Bugno, A. Kuster, P.C. Heinrich, J. Travis, J. Potempa. 1999. Rapid and efficient inactivatin of IL-6 by lysine and arginine specific proteinases (gingipains) from *Porphyromonas gingivalis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 261: 598- 602.

29. Barkocy-Gallagher, G.A., N. Han, J.M. Patti, J. Whitlock, A. Progulske-Fox, M.S. Lantz. 1996. Analysis of the *prtP* gene encoding porphypain, a cysteine proteinase of *Porphyromonas gingivalis*. J. Bacteriol. 178: 2734-2741.

30. Barkocy-Gallagher, G.A., J.W. Foley, M.S. Lantz. 1999. Activities of the *Porphyromonas gingivalis* PrtP proteinase determined by construction of prtP-deficient mutants and expression of the gene in *Bacteroides* species. J. Bacteriol. 181: 246-255.

31. Bar-Shavit, R., A. Kahn, J.W.II. Fenton, G.D. Wilner. 1983. Monocyte chemotaxis: Stimulation by specific exosite region in thrombin. Science. 220: 728-730.

32. Barua, P.K., D.W. Dyer, M.E. Neiders. 1990. Effect of iron limitation on *Bacteroides gingivalis*. Oral Microbiol. Immunol. 5: 263-268.

33. Beck, J.D., G.G. Koch, R.G. Rozier, G.E. Tudor. 1990. Prevalence and Risk Indicators for Periodontal Attachment Loss in a Population of Older Community-Dwelling Blacks and Whites. J. Periodontol. 61: 521-528.

34. Beck, J.D., G.G. Koch, J.J. Zambon, R.J. Genco, G.E. Tudor. 1992. Evaluation of Oral Bacteria as Risk Indicators for Periodontitis in Older Adults. J. Periodontol. 63: 93-99.

35. Beck, J.D., R. Garcia, G. Heiss, P.S. Vokanas, S. Offenbacher. 1996. Periodontal disease and cardiovascular disease. J. Periodonol. 67: 1123-1137.

36. Beck, J.D., L. Cusmano, W. Grenn-Helms, G.G. Koch, S. Offenbacher. 1997. A 5-year study of attachment loss in community-dwelling older adults: incidence density. J. Periodotal. Res. 32: 506-515.

37. Bedi, G.S., T. Williams. 1994. Purification and characterization of a collagen-degrading protease from *Porphyromonas gingivalis*. J. Biological Chemistry. 269: 599-606.

38. Beikler, T., U. Peters, B. Ehmke, T.F. Flemmig. 2003. Sequence analysis of *kgp* in *Porphyromonas gingivalis* isolates from periodontitis patients. Oral Microbiol. Immunol. 18:393-397.

39. Beikler, T., U. Peters, S. Prajaneh, K. Prior, B. Ehmke, T.F. Flemmig. 2003. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in Caucasians. Eur. J. Oral Sci. 111: 390-394.

40. Beikler, T., U. Peters, K. Prior, B. Ehmke, T.F. Flemmig. 2005. Sequence variations in *rgpA* and *rgpB* of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis. J. Periodont. Res. 40: 193-198.

41. Belibasakis, G.N., N. Bostanci, A. Hashim, A. Johansson, J. Aduse-Opoku, M.A. Curtis, F.J. Hughes. 2007. Regulation of RANKL and OPG gene expression in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells by *Porphyromonas gingivalis*: a putative role of arg-gingipains. Microbial Pathogenesis. 43: 46-53.

42. Berglundh, T., L. Krok, B. Liljenberg, E. Westfelt, G. Serino, J. Lindhe. 1998. The use of metronidazole and amoxicillin in the treatment of advanced periodontal disease. A prospective, controlled clinical trial. J. Clin. Periodontol. 25: 354-362.

43. Bialas, A., J. Grembecka, D. Krowarsch, J. Otlewski, J. Potempa, A. Mucha. 2006. Exploring the Sn binding pockets in gingipains in newly developed inhibitors: structure-based design, chemistry, and activity. J. Med. Chem. 49: 1744-1753.

44. Bizios, R., L. Lai, J.W.II. Fenton, A.B. Malik. 1986. Thrombin-induced chemotaxis and aggregation of neutrophils. J. Cell. Physiol. 128: 485-490.

45. Bodet, C., F. Chandad, D. Grenier. 2005. Modulation of cytokine production by *Porphyromonas gingivalis* in a macrophage and epithelial cell co-culture model. Microbes and Infection. 7: 448-456.

46. Bodet, C., M. Piché, F. Chandad, D. Grenier. 2006. Inhibition of periodontopathogen-derived proteolytic enzymes by a high-molecular-weight fraction isolated from cranberry. J. Antimicrobial Chemother. 57: 685-690.

47. Booth, V., T. Lehner. 1997. Characterization of the *Porphyromonas gingivalis* antigen recognized by a monoclonal antibody which prevents colonization by the organism. J. Periodont. Res. 32: 54-60.

48. Booth, V., Ö. Solakoglu, N. Bavisha, M.A. Curtis. 2006. Serum IgG1 and IgG2 antibody responses to *Porphyromonas gingivalis* in patients with periodontitis. Oral Microbiol. Immunol. 21: 93-99.

49. Bosshardt, D.D., N.P. Lang. 2005. The junctional epithelium: from health to disease. J. Dent. Res. 84: 9-20.

50. Bostanci, N., R. Allaker, U. Johansson, M. Rangarajan, M.A. Curtis, F.J. Hughes, I.J. McKay. 2007. Interleukin-1alpha stimulation in monocytes by periodontal bacteria: antagonistic effects of *Porphyromonas gingivalis*. Oral Microbiol. Immunol. 22: 52-60.

51. Bradshaw, D.J., P.D. Marsh, G.K. Watson, C. Allison. 1998. Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. Infect. Immun. 66: 4729-4732.

52. Bragd, L., G. Dahlén, M. Wikström, J. Slots. 1987. The capability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans, Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* to indicate progressive periodontitis; a retrospective study. J. Clin. Periodontol. 14: 95-99.

53. Bramanti, T.E., S.C. Holt. 1990. Iron-regulated Outer Membrane Proteins in the Periodontopathic Bacterium, *Bacteroides gingivalis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 166: 1146-1154.

54. Brochu, V., D. Grenier, K. Nakayama, D. Mayrand. 2001. Acquisition of iron from human transferrin by *Porphyromonas gingivalis*: a role for Arg- and Lys-gingipain activities. Oral Microbiol. Immunol. 16: 79-87.

55. Brown, L.J., R.C. Oliver, H. Loe. 1990. Evaluating periodontal status of US employed adults. J. Am. Dent. Assoc. 121: 226-232.

56. Brown, L.J., J.M. Albandar, J.A. Brunelle, H. Loe. 1996. Early-Onset Periodontitis: Progression of Attachment Loss During 6 Years. J. Periodontol. 67: 968-975.

57. Budu, C.E., J. Luengpailin, G. Reyes, R.J. Doyle, M.M. Cowan. 2003. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis* are modified by polyphenol oxidase and asparaginase. Oral Microbiol. Immunol. 18: 313-317.

58. Burgess, N.A., D.F. Kirke, P. Williams, K. Winzer, K.R. Hardie, N.L. Meyers, J. Aduse-Opoku, M.A. Curtis, M. Cámara. 2002. LuxS-dependent quorum sensing in

Porphyromonas gingivalis modulates protease and haemagglutinin activities but is not essential for virulence. Microbiol. 148: 763-772.

59. Burkhardt, F. 1992. Mikrobiologische Diagnostik. In: Burkhardt, F. (Hrsg). Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1. Aufl., S. 200-201.

60. Calkins, C.C., K. Platt, J. Potempa, J. Travis. 1998. Inactivation of tumor necrosis factor by proteinases (gingipains) from the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. Implications for immune evasion. J. Biol. Chem. 273: 6611-6614.

61. Carlsson, J., B.F. Herrmann, J.F. Hofling, G.K. Sundqvist. 1984. Degradation of the human proteinase inhibitors alpha-1-antitrypsin and alpha-2-makroglobulin by *Bacteroides gingivalis*. Infect. Immun. 43: 644-648.

62. Carman, R., M.D. Ramakrishnan, F.H. Harper. 1990. Hemin levels in culture medium of *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* regulate both hemin binding and trypsin-like enzyme production. Infect. Immun. 58: 4016-4019.

63. Ceri, H., M.E. Olson, C. Stremick, R.R. Read, D. Morck, A. Buret. 1999. The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Suspectibilities of Bacterial Biofilms. J. Clin. Microbiol. 37: 1771-1776.

64. Chaves, E.S., M.K. Jeffcoat, C.C. Ryerson, B. Snyder. 2000. Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. J Clin Periodontol 27: 897-903.

65. Chen, C.C., J.F. Chang, J.S. Huang, C.C. Tsai. 1997. Correlation of interleukin-1 beta, interleukin-6, and periodontitis. Kaohsiung J. Med. Sci. 13: 609-617.

66. Chen, T., K. Nakayama, L. Belliveau, M.J. Duncan. 2001. *Porphyromonas gingivalis* gingipains and adhesion to epithelial cells. Infect. Immun. 69: 3048-3056.

67. Chen, W., H.K. Kuramitsu. 1999. Molecular mechanism for the spontaneous generation of pigmentless *Porphyromonas gingivalis* mutants. Infect. Immun. 67: 4926-4930.

68. Chen, Z., J. Potempa, A. Polanowski, M. Wikstrom, J. Travis. 1992. Purification and characterization of a 50-kDa cysteine proteinase (gingipain) from *Porphyromonas gingivalis*. J. Biol. Chem. 267: 18896-18901.

69. Chen, Z., C.A. Casiano, H.M. Fletcher. 2001. Protease-active extracellular protein preparations from *Porphyromonas gingivalis* W83 induce N-cadherin proteolysis, loss of cell adhesion, and apoptosis in human epithelial cells. J. Periodontol. 72: 641-650.

70. Chiu, B. 1999. Mutiple infections in carotid atherosclerotic plaques. Am. Heart J. 138: 534-536.

71. Chung, W., S.R. Hansen, D. Rao, B.A. Dale. 2004. Protease-activated receptor signaling increases epithelial antimicrobial peptide expression. J. Immunol. 173: 5165-5170.

72. Costerton, J.W., Z. Lewandowski, D.E. Caldwell, D.E. Korber, H.M. Lappin-Scott. 1995. Microbial biofilms. Annu. Rev. Microbiol. 49: 711.

73. Costerton, J.W., Z. Lewandowski, D. deBeer, D.E. Caldwell, D.E. Korber, G. James. 1994. Biofilms, the customized microniche. J. Bacteriol. 176: 2137.

74. Costerton, J.W., P.S. Stewart, E.P. Greenberg. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 284: 1318.

75. Curtis, M.A., J.A.C. Sterne, S.J. Price, G.S. Griffiths, S.K. Coulthurst, J.M. Wilton, N.W. Johnson. 1990. The protein composition of gingival crevicular fluid sampled from male adolescents with no destructive periodontitis: baseline data of a longitudinal study. 25: 6-16.

76. Curtis, M.A., J. Aduse-Opoku, J.M. Slaney, M. Rangarajan, V. Booth, J. Cridland, P. Shepherd. 1996. Characterization of an adherence and antigenic determinant of the ArgI protease of *Porphyromonas gingivalis* which is present on multiple gene products. Infect. Immun. 64: 2532-2539.

77. Curtis, M.A., H.K. Kuramitsu, M. Lantz, F.L. Macrina, K. Nakayama, J. Potempa, E.D. Raynolds, J. Aduse-Opoku. 1999a. Molecular genetics and nomenclature of proteases of *Porphyromonas gingivalis*. J Periodontal Res 34:464-472.

78. Curtis, M.A., A. Thickett, J.M. Slaney, M. Rangarajan, J. Aduse-Opoku, P. Shepherd, N. Paramonov, E. Hounsell. 1999b. Variable carbohydrate modification to the catalytic chains of the rgpA and rgpB proteases of *Porphyromonas gingivalis* W50. Infect. Immun. 67: 3816-3823.

79. Curtis, M.A., J. Aduse-Opoku, M. Rangarajan. 2001. Cysteine proteinases of *Porphyromonas gingivalis*. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 12: 192-216.

80. Curtis, M.A., J. Aduse-Opoku, M. Rangarajan, A. Gallagher, J.A.C. Sterne, C.R. Reid, H.E.A. Evans, B. Samuelsson. 2002. Attenuation of the virulence of *Porphyromonas gingivalis* by using a specific synthetic Kgp protease inhibitor. Infect. Immun. 70: 6968-6975.

81. Darveau, R.P., C.M. Belton, R.A. Reife, R.J. Lamont. 1998. Local Chemokine Paralysis, a Novel Pathogenic Mechanism for *Porphyromonas gingivalis*. Infection and Immunity. 66: 1660-1665.

82. Dashper, S.G., K.J. Cross, N. Slakeski, P. Lissel, P. Aulakh, C. Moore, E.C. Reynolds. 2004. Hemoglobin hydrolysis and heme acquisition by *Porphyromonas gingivalis*. Oral Microbiol. Immunol. 19: 50-56.

83. DeCarlo, A.A., L.J. Windsor, M.K. Bodden, G.J. Harber, B. Birkedal-Hansen, H. Birkedal-Hansen. 1997. Activation and novel processing of matrix metalloproteinases by a thiol-proteinase from the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. J. Dent. Res. 76: 1260-1270.

84. DeCarlo, A.A., H.E. Grenett, G.J. Harber, L.J. Windsor, M.K. Bodden, B. Birkedal-Hansen, H. Birkedal-Hansen. 1998. Induction of matrix metalloproteinases and a collagen-degrading phenotype in fibroblasts and epithelial cells by secreted Porphyromonas gingivalis proteinase. J Periodontal Res. 1998 Oct;33(7):408-20.

85. DeCarlo, A.A., M. Paramaesvaran, P.L. Yun, C. Collyer, N. Hunter. 1999. Porphyrin-mediated binding to hemoglobin by the HA2 domain of cysteine proteases (gingipains) and hemagglutinins from the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. J. Bacteriol. 181: 3784-3791.

86. DeCarlo, A.A., Y. Huang, C.A. Collyer, D.B. Langley, J. Katz. 2003. Feasibility of an HA2 domain-based periodontitis vaccine. Infect. Immun. 71: 562-566.

87. DeCarlo, A.A., M. Nadkarni, M. Paramaesvaran, P.W. Yun, C.A. Collyer, N. Hunter. 2004. Serum antibodies against the hemoglobin-binding domain (HA2) of Porphyromonas gingivalis. J. Periodont. Res. 39: 228-235.

88. Deinzer, R. 2004. Stress und Parodontitis: Neue Erkenntnisse zu einer alten Vermutung. IDZ-Information 2/2004.

89. DeMichele, M.A.A., D.G. Moon, J.W.II. Fenton, F.L. Minnear. 1990. Thrombin`s enzymatic activity increases permeability of endothelian cell monolayers. J. Appl. Physiol. 69: 1599-1606.

90. Deshpande, R.G., M.B. Khan. 1999. Purification and characterization of hemolysin from *Porphyromonas gingivalis A7436*. FEMS Microbiol. Lett. 176: 387-394.

91. Desta, T., D.T. Graves. 2007. Fibroblast apoptosis induced by Porphyromonas gingivalis is stimulated by a gingipain and caspase-independent pathway that involves apoptosis-inducing factor. Cell. Microbiol. 9: 2667-2675.

92. Discipio, R.G., P.J. Daffern, M. Kawahara, R. Pike, J. Travis, T.E. Hugli. 1996. Cleavage of human complement component C5 by cysteine proteinases from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. Prior oxidation of C5 augments proteinase digestion of C5. Immunol. 87. 660-667.

93. Dommisch, H., W.O. Chung, M.G. Rohani, D. Williams, M. Rangarajan, M.A. Curtis, B.A. Dale. 2007. Protease-activated receptor 2 mediates human beta defensin-2 and cc chemokine ligand 20 mRNA expression in response to proteases secreted by *Porphyromonas gingivalis*. Infect. Immun. 75: 4326-4333.

94. Dong, H., T. Chen, F.E. Dewhirst, R.D. Fleischmann, C.M. Fraser, M.J. Duncan. 1999. Genomic loci of the *Porphyromonas gingivalis* insertion element IS1126. Infect. Immun. 67: 3416-3423.

95. Donlan, R.M., J.W. Costerton. 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. Clin. Microbiol. Rev. 15: 167-193.

96. Duncan, L.., M. Yoshioka, F. Chandad, D. Grenier. 2004. Loss of lipopolysaccharide receptor CD14 from the surface of human macrophage-like cells mediated by *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles. Microbial Pathogen. 36: 319-325.

97. Duncan, M.J., S. Nakao, Z. Skobe, H. Xie. 1993. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. 61: 2260-2265.

98. Dzink, J.L., R.J. Gibbons, W.C.3rd Childs, S.S. Socransky. 1989. The predominant cultivable microbiota of crevicular epithelial cells. Oral Microbiol.Immunol. 4(1): 1-5.

99. Ebersole, J.L., M. Brunsvold, B. Steffensen, R. Wood, S.C. Holt. 1991. Effects of immunization with *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* on progression of ligature-induced periodontitis in the nonhuman primate *Macacae fascicularis*. Infect. Immun. 59: 3351-3359.

100. Eichinger, A., H.-G. Beisel, U. Jacob, R. Huber, F.-J. Medrano, A. Banbula, J. Potempa, J. Travis, W. Bode. 1999. Crystal structure of gingipain R: an Arg-specific bacterial cysteine proteinase with a caspase-like fold. EMBO J. 18: 5453-5460.

101. Eick, S., W. Pfister, U. Stürzebecher, S. Jarema, J. Stürzebecher. 2003. Inhibitors of benzamidine type influence the virulence properties of *Porphyromonas gingivalis* strains. Acta Biochim. Pol. 50: 725-734.

102. Eick, S., W. Pfister. 2004. Efficacy of antibiotics against periodontopathogenic bacteria within epithelial cells: an in vitro study. J. Periodontol. 75: 1327-1334.

103. Eick, S., A. Reißmann, J. Rödel, K-H. Schmidt, W. Pfister. 2006. *Porphyromonas gingivalis* survives within KB cells and modulates inflammatory response. Oral Microbiol. Immunol. 21: 231-237.

104. Ekici, Ö.D., M.G. Götz, K.E. James, Z.Z. Li, B.J. Rukamp, J.L. Asgian, C.R. Caffrey, E. Hansell, J. Dvorák, J.H. McKerrow, J. Potempa, J. Travis, J. Mikolajczyk, G.S. Salvesen, J.C. Powers. 2004. Aza-peptide Michael acceptors: a new class of inhibitors specific for caspases and other clan CD cysteine proteases. J. Med. Chem. 47: 1889-1892.

105. Eley, B.M., S.W. Cox. 1996. Correlation between gingivain/gingipain and bacterial dipeptidyl peptidase activity in gingival crevicular fluid and periodontal attachment loss in chronic periodontitis patients. A 2-year longitudinal study. J. Periodontol. 67: 703-716.

106. Ellen, R.P., G. Lépine, P.-M. Nghiem. 1997. *In vitro* models that support adhesion specificity in biofilms of oral bacteria. Adv. Dent. Res. 11: 33-42.

107. Feres, M., A.D. Haffajee, C. Goncales. 1999. Systemic doxycycline administration in the treatment of periodontal infections. (I). Effect on the subgingival microbiota. J. Clin. Periodontol.. 26: 775-783.

108. Flemmig, T.F. 1999. Periodontitis. Ann. Periodontol. 4: 32-38.

109. Fletcher, H.M., H.A. Schenkein, R.M. Morgan, K.A. Bailey, C.R. Berry, F.L. Macrina. 1995. Virulence of a *Porphyromonas gingivalis* W83 mutant defective in the *prtH* gene. Infect. Immun. 63: 1521-1528.

110. Fletcher, J., K. Reddi, S. Poole, S. Nair, B. Henderson, P. Tabona, M. Wilson. 1997. Interactions between periodontopathogenic bacteria and cytokines. J. Periodontal Res. 32: 200-205.

111. Fletcher, J., S. Nair, S. Poole, B. Henderson, M. Wilson. 1998. Cytokine Degradation by Biofilms of *Porphyromonas gingivalis*. Current Microbiology. 36: 216-219.

112. Folwaczny, M., R. Hickel. 2003. Biofilm - Problem oder Perspektive? Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift. 58: 648-666.

113. Forng, R.Y., C. Champagne, W. Simpson, C.A. Genco. 2000. Environmental cues and gene expression in *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Oral Dis. 6:351-365.

114. Frias, J., E. Olle, M. Alsina. 2001. Periodontal Pathogens Produce Quorum Sensing Signal Molecules. Infect. Immun. 69: 3431-3434.

115. Frisch, S.M., H. Francis. 1994. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. J. Cell Biol. 124: 619-626.

116. Fujimura, S., K. Hirai, Y. Shibata, K. Nakayama, T. Nakamura. 1998. Comparative properties of envelope-associated arginine-gingipains and lysine-gingipain of *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Microbiol. Lett. 163: 173-179.

117. Fuqua, C., E.P. Greenberg. 1998. Cell-to cell communication in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: They may be talking, but who's listening? Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 6571-6572.

118. Gallagher, A., Aduse-Opoku, J., M. Rangarajan, J.M. Slaney, M.A. Curtis. 2003. Glycosylation of the Arg-gingipains of *Porphyromonas gingivalis* and comparison with glycoconjugate structure and synthesis in other bacteria. Curr. Protein Pept. Sci. 4: 427-441.

119. Gamonal, J., A. Bascones, A. Acevedo, E. Blanco, A. Silva. 2001. Apoptosis in chronic adult periodontitis analyzed by in situ DNA breaks, electron microscopy, and immunohistochemistry. J. Periodontol. 72: 517-525.

120. Gemmell, E., K. Yamazaki, G.J. Seymour. 2007. The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity. Periodontology 2000. 43: 14-40.

121. Genco, C.A., C.W. Cutler, D. Kapczynski, K. Maloney, R.R. Arnold. 1991. A novel mouse model to study the virulence of and host response to *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. Infect. Immun. 59: 1255-1263.

122. Genco, C.A., B.M. Odusanya, J. Mikolajczyk-Pawlinska, J. Potempa, J. Travis. 1998. A peptide domain on gingipain R which confers immunity against *Porphyromonas gingivalis* infection in mice. Infect. Immun. 66: 4108-4114.

123. Genco, C.A., J. Potempa, J. Mikolajczyk-Pawlinska, J. Travis. 1999. Role of gingipains R in the pathogenesis of *Porphyromonas gingivalis*-mediated periodontal disease. Clin. Infect. Dis. 28: 456-465.

124. Genco, R.J., A.W. Ho, S.G. Grossi, R.G. Dunford, L.A. Tedesco. 1999. Relationship of stress, distress and inadequate coping behaviors to periodontal disease. J. Periodontol. 70: 711-723.

125. Giacaman, R.A., A.H. Nobbs, K.F. Ross, M.C. Herzberg. 2007. *Porphyromonas gingivalis* selectively up-regulates the HIV-1 coreceptor CCR5 in oral keratinocytes. J. Immunol. 179: 2542-2550.

126. Gibbons, R.J. 1989. Bacterial adhesion to oral tissues: A model for infectious diseases. J. Dent. Res. 68: 750-760.

127. Gibson, F.C.III, C.A. Genco. 2001. Prevention of *Porphyromonas gingivalis*-induced oral bone loss following immunization with gingipain R1. Infect. Immun. 69: 7959-7963.

128. Gibson, F.C., J. Savelli, T.E. Van Dyke, C.A. Genco. 2005. Gingipain-specific IgG in the sera of patients with periodontal disease is necessary for opsonophagocytosis of *Porphyromonas gingivalis*. J. Periodontol. 76: 1629-1636.

129. Golub, L.M., T.F. McNamara, G. D'Angelo, R.A. Greenwald, N.S. Ramamurthy. 1987. A non-antibacterial chemically modified tetracycline inhibits mammalian collagenase activity. J. Dent. Res. 66: 1310-1314.

130. Gonzales, D., A.O. Tzianabos, C.A. Genco, F.C. Gibson. 2003. Immunization with *Porphyromonas gingivalis* capsular polysaccharide prevents *Porphyromonas gingivalis* elicited oral bone loss in a murine model. Infect. Immun. 71: 2283-2287.

131. Goulet, V., B. Britigan, K. Nakayama, D. Grenier. 2004. Cleavage of human transferrin by *Porphyromonas gingivalis* gingipains promotes growth and formation of hydroxyl radicals. Infect. Immun. 72: 4351-4356.

132. Graves, D.T., M. Oskoui, S. Volejnikova, G. Naguib, S. Cai, T. Desta, A. Kakouras, Y. Jiang. 2001. Tumor necrosis factor modulates fibroblast apoptosis, PMN recruitment, and osteoblast formation in response to *P. gingivalis* infection. J. Dent. Res. 80: 1875-1879.

133. Grayson, R., C.W.I. Douglas, J. Heath, A. Rawlinson, G.S. Evans. 2003. Activation of human matrix metalloproteinase 2 by gingival crevicular fluid and *Porphyromonas gingivalis*. J. Clin. Periodontol. 30: 542-550.

134. Grenier, D., D. Mayrand. 1987. Selected characteristics of pathogenic and nonpathogenic strains of *Bacteroides gingivalis*. J. Clin. Microbiol. 25: 738-740.

135. Grenier, D. 1996. Degradation of host protease inhibitors and activation of plasminogen by proteolytic enzymes from *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*. Microbiology. 142: 955-961.

136. Grenier, D., D. Mayrand. 2001. Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) by *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Microbiol. Lett. 203: 161-164.

137. Grenier, D., S. Imbeault, P. Plamondon, G. Grenier, K. Nakayama, D. Mayrand. 2001a. Role of gingipains in growth of *Porphyromonas gingivalis* in presence of human serum albumin. Infect. Immun. 69: 5166-5172.

138. Grenier, D., P. Gauthier, P. Plamondon, K. Nakayama, D. Mayrand. 2001b. Studies on the aminopeptidase activities of *Porphyromonas gingivalis*. Oral Microbiol. Immunol. 16: 212-217.

139. Grenier, D., P. Plamondon, T. Sorsa, H.M. Lee, T. McNamara, N.S. Ramamurthy, L.M. Golub, O. Teronen, D. Mayrand. 2002. Inhibition of proteolytic, serpinolytic, and progelatinase-b activation activities of periodontopathogens by doxycycline and the non-antimicrobial chemically modified tetracycline derivatives. J. Periodontol. 73: 79-85.

140. Grenier, D., E. Roy, D. Mayrand. 2003. Modulation of *Porphyromonas gingivalis* proteinase activity by suboptimal doses of antimicrobial agents. J. Periodontol. 74: 1316-1319.

141. Grenier, D., E. Roy, F. Chandad, P. Plamondon, M. Yoshioka, K. Nakayama, D. Mayrand. 2003a. Effect of inactivation of the arg- and/or lys-gingipain gene on selected virulence and physiological properties of *Porphyromonas gingivalis.* Infect. Immun. 71: 4742-4748.

142. Griffen, A.L., S.R. Lyons, M.R. Becker, M.L. Moeschberger, E.J. Leys. 1999. *Porphyromonas gingivalis* Strain Variability and Periodontitis. J. Clin. Microbiol. 37: 4028-4033.

143. Grøn, H., R. Pike, J. Potempa. 1997. The potential role of α_2-macroglobulin in the control of cysteine proteinases (gingipains) from *Porphyromonas gingivalis*. J. Periodont. Res. 32: 61-68.

144. Grossi, S.G., J.J. Zambon, A.W. Ho, G. Koch, R.G. Dunford, E.E. Machtei, O.M. Norderyd, R.J. Genco. 1994. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. J. Periodontol. 65: 260-267.

145. Grossi, S.G., R.J. Genco, E.E. Machtei, A.W. Ho, G. Koch, R. Dunford, J.J. Zambon, E. Hausmann. 1995. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. J. Periodontol. 66: 23-29.

146. Grossi, S.G., J.M. Goodson, J.C. Gunsolley, J. Otomo-Corgel, P.S. Bland, F. Doherty, J. Comiskey. 1998. Mechanical therapy with adjunctive minocycline microspheres reduces red-complex bacteria in smokers. 78: 1741-1750.

147. Gusman, H., J. Travis, E.J. Helmerhorst, J. Potempa, R.F. Troxler, F.G. Oppenheim. 2001. Salivary histatin 5 is an inhibitor of both host and bacterial enzymes implicated in periodontal disease. Infect. Immun. 69: 1402-1408.

148. Guzik, K., M. Bzowska, J. Smagur, O. Krupa, M. Sleprawska, J. Travis, J. Potempa. 2007. A new insight into phagocytosis of apoptotic cells: proteolytic enzymes divert the

recognition and clearance of polymorphonuclear leucocytes by macrophages. Cell Death Differ. 14: 171-182.

149. Guzik, K., J. Potempa. 2007a. Friendly fire against neutrophils: Proteolytic enzymes confuse the recognition of apoptotic cells by macrophages. Biochimie. 22: [Epub ahead of print].

150. Haffajee, A.D., J.L. Dzink, S.S. Socransky. 1988. Effect of modified Widman flap surgery and systemic tetracycline on the subgingival microbiota of periodontal lesions. J. Clin. Periodontol. 15: 255-262.

151. Haffajee, A.D., S.S. Socransky, J.M. Goodson. 1992. Subgingival temperature (I). Relation to baseline clinical parameters. J. Clin. Periodontol. 19: 401-408.

152. Haffajee, A.D., S.S. Socransky. 1994. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontology 2000. 5: 78-111.

153. Haffajee, A.D., M.A. Cugini, A. Tanner, R.P. Pollack, C. Smith, R.L.Jr. Kent, S.S. Socransky. 1998. Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. J. Clin. Periodontol. 25: 346-353.

154. Hall-Stoodley, L., P. Stoodley. 2002. Development regulation of microbial biofilms. Curr. Opin. Biotechnol. 13: 228.

155. Hasegawa, Y., S. Nishiyama, K. Nishikawa, T. Kadowaki, K. Yamamoto, T. Noguchi, F. Yoshimura. 2003. A novel type of two-component regulatory system affecting gingipains in *Porphyromonas gingivalis*. Microbiol. Immunol. 47: 849-858.

156. Hashimoto, M., T. Kadowaki, T. Tsukuba, K. Yamamoto. 2006. Selective proteolysis of apolipoprotein B-100 by Arg-gingipain mediates atherosclerosis progression accelerated by bacterial exposure. J. Biochem. (Tokyo). 140: 713-723.

157. Hinode, D., A. Nagata, S. Ichimiya, H. Hayashi, M. Morioka, R. Nakamura. 1992. Generation of plasma kinin by three types of protease isolated from *Porphyromonas gingivalis* 381.Arch. Oral Biol. 37: 859-868.

158. Hintermann, E., S. Kinder Haake, U. Christen, A. Sharabi, V. Quaranta. 2002. Discrete proteolysis of focal contact and adherens junction components in *Porphyromonas gingivalis*-infected oral keratinocytes: a strategy for cell adhesion and migration disabling. Infect. Immun. 70: 5846-5856.

159. Hoffmann, O., K. Klaushofer, K. Koller, M. Peterlik, T. Mavreas, P. Stern. 1986. Indomethacin inhibits thrombin, but not thyroxin-stimulated resorption of fetal rat limb bones. Prostaglandins 31: 601-608.

160. Holt, S.C., L. Kesavalu, S. Walker, C.A. Genco. 1999. Virulence factors of *P. gingivalis*. Periodontol. 2000. 20: 168-238.

161. Holt, S.C., J.L. Ebersole. 2005. *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola,* and *Tannerella forsythia*: the “red complex”, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. Periodontology 2000. 38: 72-122.

162. Holzhausen, M., L.C. Spolidorio, N. Vergnolle. 2005. Role of protease-activated receptor-2 in inflammation, and its possible implications as a putative mediator of periodontitis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 100: Suppl. I. 177-180.

163. Holzhausen, M., L.C. Spolidorio, R.P. Ellen, M.-C. Jobin, M. Steinhoff, P. Andrade-Gordon, N. Vergnolle. 2006. Protease-activated receptor-2 activation. A major role in the pathogenesis of *Porphyromonas gingivalis* infection. Am. J. Pathol. 168: 1189-1199.

164. Hosotaki, K., T. Imamura, J. Potempa, N. Kitamura, J. Travis. 1999. Activation of protein C by arginine-specific cysteine proteinases (gingipains-R) from *Porphyromonas gingivalis*. Biol. Chem. 380: 75-80.

165. Houle, M.-A., Grenier, D., P. Plamondon, K. Nakayama. 2003. The collagenase activity of *Porphyromonas gingivalis* is due to Arg-gingipain. FEMS. Microbiol. Lett. 221: 181-185.

166. Howell, T.H., P.M. Ridker, U.A. Ajani, C.H. Hennekens, W.G. Christen. 2001. Periodontal disease and risk of subsequent cardiovascular disease in US male physicians. J. Am. Coll. Cardiol. 37: 445-450.

167. Huang, G.T.-J., D. Kim, J.K.-H. Lee, H.K. Kuramitsu, S.K. Haake. 2001. Interleukin-8 and intercellular adhesion molecule 1 regulation in oral epithelial cells by selected periodontal bacteria: multiple effects of *Porphyromonas gingivalis* via antagonistic mechanisms. Infect. Immun. 69: 1364-1372.

168. Hujoel, P.P., M. Drangholt, C. Spiekerman, T.A. DeRouen. 2000. Periodontal disease and coronary heart disease risk. JAMA. 284: 1406-1410.

169. Ibelgaufts, H. 1992. Lexikon Zytokine. München: Medikon Verlag.

170. Iida, Y., K. Honda, T. Suzuki, S. Matsukawa, T. Kawai, T. Shimahara, H. Chiba. 2004. Brain abscess in which *Porphyromonas gingivalis* was detected in cerebrospinal fluid. Br. J. Oral Maxillofac. Surg. 42: 180.

171. Imamura, T., R.N. Pike, J: Potempa, J. Travis. 1994. Pathogenesis of Periodontitis: A major arginine-specific cysteine proteinase from *Porphyromonas gingivalis* induces vascular permeability enhancement through activation of the kallikrein/kinin pathway. J. Clin. Invest. 94: 361-367.

172. Imamura, T., R.N. Pike, J: Potempa, J. Travis. 1995a. Dependence of vascular permeability enhancement on cysteine proteinases in vesicles of *Porphyromonas gingivalis*. Infect. Immun. 63: 1999-2003.

173. Imamura, T., J: Potempa, R.N: Pike, J.N. Moore, M.H. Barton, J. Travis. 1995b. Effect of free and vesicle-bound cysteine proteinases of *Porphyromonas gingivalis* on plasma clot formation: implications for bleeding tendency at periodontitis sites. Infect Immun. 63: 4877-4882.

174. Imamura, T., J: Potempa, S. Tanase, J. Travis. 1997. Activation of blood coagulation factor X by arginine-specific cysteine proteases (gingipain-Rs) from *Porphyromonas gingivalis*. J. Biol. Chem. 353: 16062-16067.

175. Imamura, T., J: Potempa, J. Travis. 2000. Dependence of pathogenic properties between two types of arginine-specific cysteine proteinases (gingipains R) from *Porphyromonas gingivalis*. Microb. Pathog. 29: 155-163.

176. Imamura, T., K. Matsushita, J. Travis, J. Potempa. 2001a. Inhibition of trypsin-like cysteine proteinases (gingipains) from *Porphyromonas gingivalis* by tetracycline and its analogues. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 2871-2876.

177. Imamura, T., S. Tanase, T. Hamamoto, J. Potempa, J. Travis. 2001. Activation of blood coagulation factor IX by gingipains R, arginine-specific cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis*. Biochem. J. 353: 325-331.

178. Imamura, T., A. Banbula, P.J.B. Pereira, J. Travis, J. Potempa. 2001. Activation of human prothrombin by arginine-specific cysteine proteases (gingipains R) from *Porphyromonas gingivalis*. J. Biol. Chem. 276: 18984-18991.

179. Imamura, T. 2003. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. J. Periodontol. 74: 111-118.

180. Imamura, T., J. Travis, J. Potempa. 2003b. The biphasic virulence activities of gingipains: activation and inactivation of host proteins. Curr. Protein Pept. Sci.. 4: 443-450.

181. Imamura, T., J. Potempa, J. Travis. 2004. Activation of the kallikrein-kinin system and release of new kinins through alternative cleavage of kininogens by microbial and human cells proteinases. Biol. Chem. 385: 989-996.

182. Inaba, H., S. Kawai, K. Nakayama, N. Okahashi, A. Amano. 2004. Effect of enamel matrix derivative on periodontal ligament cells in vitro is diminished by *Porphyromonas gingivalis*. J. Periodontol. 75: 858-865.

183. Inagaki, S., K. Ishihara, Y. Yasaki, S. Yamada, K. Okuda. 2003. Antibody responses of periodontitis patients to gingipains of *Porphyromonas gingivalis*. J. Periodontol. 74: 1432-1439.

184. Inomata, M., T. Into, Y. Ishihara, M. Nakashima, T. Noguchi, K. Matsushita. 2007. Arginine-specific gingipain A from *Porphyromonas gingivalis* induces Weibel-Palade body exocytosis and enhanced activation of vascular endothelial cells through protease-activated receptors. Microbes Infect. 9: 1500-1506. [Epub]. Abstract.

185. Into, T., M. Inomata, Y. Kanno, T. Matsuyama, M. Machigashira, Y. Izumi, T. Imamura, M. Nakashima, T. Nogushi, K. Matsushita. 2006. Arginine-specific gingipains from *Porphyromonas gingivalis* deprive protective functions of secretory leucocyte protease inhibitor in periodontal tissue. Clin. Exp. Immunol. 145: 545-554.

186. Ishihara, Y., H. Anan, M. Yoneda, K. Maeda, T. Hirofuji. 2007. Susceptibility of type 2 diabetic mice to low-virulence bacterial infection: induction of abscess formation by gingipain-deficient *Porphyromonas gingivalis*. J. Periodont. Res. 42: 253-258.

187. Ishimi, Y., C. Miyaura, C.H. Jin, T. Akatsu, E. Abe, Y. Nakamura, A. Yamaguchi, S. Yoshiki, T. Matsuda, T. Hirano. 1990. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. J. Immunol. 145: 3297-3303.

188. Iwami, J., Y. Murakami, K. Nagano, H. Nakamura, F. Yoshimura. 2007. Further evidence that major outer membrane proteins homologous to OmpA in *Porphyromonas gingivalis* stabilize bacterial cells. Oral Microbiol. Immunol. 22: 356-360.

189. Jackson, C.A., B. Hoffmann, N. Slakeski, S. Cleal, A.J. Hendtlass, E.C. Reynolds. 2000. A consensus *Porphyromonas gingivalis* promoter sequence. FEMS Microbiol. Lett. 186: 133-138.

190. Jagels, M.A., J. Travis, J. Potempa, R. Pike, R.E. Hugli. 1996. Proteolytic inactivation of the leukocyte C5a receptor by proteinases derived from *Porphyromonas gingivalis*. Infect. Immun. 64:1984-1991.

191. Jagels, M.A., J.A. Ember, J. Travis, J. Potempa, R. Pike, T.E. Hugli. 1996. Cleavage of the human C5A receptor by proteinases derived from *Porphyromonas gingivalis*: cleavage of leukocyte C5a receptor. Adv. Exp. Med. Biol. 389: 155-164.

192. Johansson, A., S. Kalfas. 1998. Characterization of the proteinase-dependent cytotoxicity of *Porphyromonas gingivalis*. Eur. J. Oral Sci. 106: 863-871.

193. Johansson, A., L. Hänström, S. Kalfas. 2000. Inhibition of *Actinobacillus actinomycetem-comitans* leukotoxicity by bacteria from the subgingival flora. Oral Microbiol. Immunol. 15: 218-225.

194. Jones, A., C.L. Geczy. 1990. Thrombin and factor Xa enhance the production of interleukin-1. Immunology 71: 236-241.

195. Joshipura, K.J., E.B. Rimm, C.W. Douglass, D. Trichopoulos, A. Asherio, W.C. Willett. 1996. Poor oral health and coronary heart disease. J. Dent. Res. 75: 1631-1636.

196. Kadowaki, T., M. Yoneda, K. Okamoto, K. Maeda, K. Yamamoto. 1994. Purification and characterization of a novel arginine-specific cysteine proteinase/argingipain) involved in the pathogenesis of periodontal disease from the culture supernatant of *Porphyromonas gingivalis*. J. Biol. Chem. 269: 21371-21378.

197. Kadowaki, T., K. Nakayama, F. Yoshimura, K. Okamoto, N. Abe, K. Yamamoto. 1998. Arg-gingipain acts as a major processing enzyme for various cell surface proteins in *Porphyromonas gingivalis*. J. Biol. Chem. 273: 29072-29076.

198. Kadowaki, T., K. Nakayama, K. Okamoto, N. Abe, A. Baba, Y. Shi, D.B. Ratnayake, K. Yamamoto. 2000. Porphyromonas gingivalis proteinases as virulence determinants in progression of periodontal diseases. J. Biochem. (Tokyo). 128: 153-159.

199. Kadowaki, T., S. Kitano, A. Baba, R. Takii, M. Hashimoto, N. Katunuma, K. Yamamoto. 2003. Isolation and characterization of a novel and potent inhibitor of Arg-gingipain from Streptomyces sp. strain FA-70. Biol. Chem. 384: 911-920.

200. Kadowaki, T., A. Baba, N. Abe, R. Takii, M. Hashimoto, T. Tsukuba, S. Okazaki, Y. Suda, T. Asao, K. Yamamoto. 2004. Suppression of pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis* by newly developed gingipain inhibitors. Mol. Pharmacol. 66: 1599-1606.

201. Kamaguchi, A., K. Nakayama, T. Ohyama, T. Watanabe, M. Okamoto, H. Baba. 2001. Coaggregation of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia.* Microbiol. Immunol. 45: 649-656.

202. Kamaguchi, A., T. Ohyama, E. Sakai, R. Nakamura, T. Watanabe, H. Baba, K. Nakayama. 2003. Adhesins encoded by the gingipain genes of *Porphyromonas gingivalis* are responsible for co-aggregation with *Prevotella intermedia*. Microbiol. 149: 1257-1264.

203. Kamaguchi, A., M. Nakano, M. Shoji, R. Nakamura, Y. Sagane, M. Okamoto, T. Watanabe, T. Ohyama, M. Ohta, K. Nakayama. 2004. Autolysis of *Porphyromonas gingivalis* is accomanied by an increase in several periodontal pathogenic factors in the supernatant. Microbiol. Immunol. 48: 541-545.

204. Kaminishi, H., T. Cho, T. Itoh, A. Iwata, K. Kawasaki, Y. Hagihara, H. Maeda. 1993. Vascular permeability enhancing activity of *Porphyromonas gingivalis* protease in guinea pigs. FEMS Microbiol. Lett. 114: 109-114.

205. Kantarci, A., T.E. Van Dyke. 2002. Neutrophil-mediated host response to *Porphyromonas gingivalis*. Int. Acad. Periodontol. 4/4: 119-125.

206. Karunakaran, T., T. Madden, H. Kuramitsu. 1997. Isolation and characterization of a hemin-regulated gene, *hemR*, from *Porphyromonas gingivalis*. J. Bacteriol. 179: 1898-1908.

207. Katz, J., Q.P. Yang, P. Zhang, J. Potempa, J. Travis, S.M. Michalek, D.F. Balkovetz. 2002. Hydrolysis of epithelial junctional proteins by *Porphyromonas gingivalis* gingipains. Infect. Immun. 70: 2512-2518.

208. Kesavalu, L., S.C. Holt, J.L. Ebersole. 2003. In vitro environmental regulation of *Porphyromonas gingivalis* growth and virulence. Oral Microbiol. Immunol. 18: 226-233.

209. Kinniment, S.L., J.W. Wimpenny. 1992. Measurements of the distribution of adenylate concentrations and adenylate energy charge across *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1629.

210. Kishimoto, M., A. Yoshimura, M. Naito, K. Okamoto, K. Yamamoto, D.T. Golenbock, Y. Hara, K. Nakayama. 2006. Gingipains inactivate a cell surface ligand on *Porphyromonas gingivalis* that induces TLR-2- and TLR-4-independent signaling. Microbiol. Immunol. 50: 315-325.

211. Kitamura, Y., S. Matono, Y. Aida, T. Hirofuji, K. Maeda. 2002. Gingipains in the culture supernatant of Porphyromonas gingivalis cleave CD4 and CD8 on human T cells. J. Periodontal Res. 37: 464-468.

212. Kitano, S., K. Irimura, T. Sasaki, N. Abe, A. Baba, Y. Miyake, N. Katunuma, K. Yamamoto. 2001. Suppression of gingival inflammation induced by *Porphyromonas gingivalis* in rats by leupeptin. Jpn. J. Pharmacol. 85: 84-91.

213. Kobayashi-Sakamoto, M., E. Isogai, K. Hirose. 2003. *Porphyromonas gingivalis* modulates the production of interleukin 8 and monocyte chemotactic protein 1 in human vascular endothelial cells. Curr. Microbiol. 46: 109-124.

214. Kolenbrander, P.E., J. London. 1993. Adhere today, here tomorrow: oral bacteria adherence. J. Bacteriol. 175: 3247-3252.

215. Kolenbrander, P.E., N. Ganeshkumar, F.J. Cassels, C.V. Hughes. 1993. Coaggregation: specific adherence among human oral plaque bacteria. FASEB J. 7: 406-413.

216. Kolenbrander, P.E. 2000. Oral Microbial Communities: Biofilms, Interactions, and Genetic Systems. Annu. Rev. Microbiol. 54: 413-437.

217. Kolenbrander, P.E., R.N. Andersen, D.S. Blehert, P.G. Egland, J.S. Foster, R.J. Palmer Jr. 2002. Communication among Oral Bacteria. Microbiol Molecul Biology Reviews. 66: 486-505.

218. Kontani, M., H. Ono, H. Shibata, Y. Okamura, T. Tanaka, T. Fujiwara, S. Kimura, S. Hamada. 1996. Cysteine protease of *Porphyromonas gingivalis* 381 enhances binding of fimbriae to cultured human fibroblasts and matrix proteins. Infect. Immun. 64: 756-762.

219. Kontani, M., S. Kimura, I. Nakagawa, S. Hamada. 1997. Adherence of *Porphyromonas gingivalis* to matrix proteins via a fimbrial cryptic receptor exposed by its own arginine-specific protease. Mol. Microbiol. 24: 1179-1187.

220. Koulouri, O., D.F. Lappin, M. Radvar, D.F. Kinane. 1999. Cell division, synthetic capacity and apoptosis in periodontal lesions analysed by in situ hybridization and immunohistochemistry. J. Clin. Periodontol. 26: 552-559.

221. Kozarov, E.V., B.R. Dorn, C.E. Shelburne, W.A. Dunn Jr., A. Progulske-Fox. 2005. Human atherosclerotic plaque contains viable invasive *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 25: e17-e18.

222. Krauser, J.A., J. Potempa, J. Travis, J.C. Powers. 2002. Inhibition of arginine gingipains (RgpB and HrgpA) with benzamidine inhibitors: zinc increases inhibitory potency. Biol. Chem. 383: 1193-1198.

223. Kubinowa, M., A. Amano, S. Shizukuishi. 1998. Hemoglobin-binding protein purified from *Porphyromonas gingivalis* is identical to lysine-specific cysteine proteinase (Lys-Gingipain). Biochem. Biophys. Res. Commun. 249: 38-43.

224. Kubinowa, M., A. Amano, S. Shizukuishi, I. Nakagawa, S. Hamada. 2001. Specific antibodies to *Porphyromonas gingivalis* Lys-gingipain by DNA vaccination inhibit bacterial binding to hemoglobin and protect mice from infection. Infect. Immun. 69: 2972-2979.

225. Lalla, E., I.B. Lamster, M.A. Hofmann, L. Bucciarelli, A.P. Jerud, S. Tucker, et al. 2003. Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23: 1405-1411.

226. Lamont, R.J., A. Chan, C.M. Belton, K.T. Izutsu, D. Vasel, A. Weinberg. 1995. *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. Infect. Immun. 63: 3878-3885.

227. Lamont, R.J., H.F. Jenkinson. 1998. Life Below the Gum Line: Pathogenic Mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 1244-1263.

228. Lamont, R.J., O. Yilmaz. 2002. In or out: the invasiveness of oral bacteria. Periodonol. 2000. 30: 61-69.

229. Lantz, M.S., R.W. Rowland, L.M. Switalski, M. Hook. 1986. Interactions of *Bacteroides gingivalis* with fibrinogen. Infect. Immun. 54: 654-658.

230. Lantz, M.S., R.D. Allen, L.W. Duck, J.L. Blume, L.M. Switalski, M. Hook. 1991a. Identification of *Porphyromonas gingivalis* components that mediate its interactions with fibronectin. J. Bacteriol. 173: 4263-4270.

231. Lantz, M.S., R.D. Allen,L.W. Duck, J. L. Blume, L.M. Switalski, M. Hook.1991b. *Porphyromonas gingivalis* surface components bind and degrade connective-tissue proteins. J. Periodontal Res. 26: 283-285.

232. Lantz, M.S., R.D. Allen, T.A. Vail, M. Hook.1991c. Specific cell components of *Bacteroides gingivalis* mediate binding and degradation of human fibrinogen. J. Bacteriol. 173: 495-504.

233. Lerner, U.H. 1994. Regulation of bone metabolism by the kallikrein-kinin system, the coagulation cascade, and the acute-phase reactants. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. 78: 481-493.

234. Lewis, J.P., F.L. Macrina. 1998. IS195, an insertion sequence-like element associated with protease genes in *Porphyromonas gingivalis*. Infect. Immun. 66: 3035-3042.

235. Lewis, J.P., J.A. Dawson, J.C. Hannis, D. Muddiman, F.L. Macrina. 1999. Hemoglobinase activity of the lysine gingipain protease (Kgp) of *Porphyromonas gingivalis*. J. Bacteriol. 181: 4905-4913.

236. Li, L., E. Messas, E.L. Batista, Jr., R.A. Levine, S. Amar. 2002. *Porphyromonas gingivalis* infection accelerates the progression of atherosclerosis in a heterozygous apolipoprotein E-defizient murine model. Circulation. 105: 861-867.

237. Lindhe, J., S.E. Hamp, H. Löe. 1975. Plaque induced periodontal disease in beagle dogs. A 4-year clinical, roentgenographical and histometric study. J. Periodont. Res. 10: 243-253.

238. Löffler, G. 1999. Basiswissen Biochemie. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.

239. Lopez, N.J. 2000. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia* in Progressive Adult Periodontitis. J. Periodontol. 71: 948-954.

240. Lourbakos, A., C. Chinni, P. Thompson, J. Potempa, J. Travis, E.J. Mackie, R.N. Pike. 1998. Cleavage and activation of proteinase-activated receptor-2 on human neutrophils by gingipain-R from *Porphyromonas gingivalis*. FEBS. Lett. 435: 45-48.

241. Lourbakos, A., J. Potempa, J. Travis, M.R. D`Andrea, P. Andrade-Gordon, R. Santulli, E.J. Mackie, R.N. Pike. 2001. Arginine-specific protease from *Porphyromonas gingivalis* activates protease-activated receptors on human oral epithelial cells. Infect. Immun. 69: 5121-5130.

242. Lourbakos, A., Y.P. Yuan, A.L. Jenkins, J. Travis, P. Andrade-Gordon, R. Santulli, J. Potempa, R.N. Pike. 2001b. Activation of protease-activated receptors by gingipains from *Porphyromonas gingivalis* leads to platelet aggregation: a new trait in microbial pathogenicity. Blood. 97: 3790-3797.

243. Lu, B., B.C. McBride. 1998. Expression of the tpr protease gene of *Porphyromonas gingivalis* is regulated by peptide nutrients. Infect. Immunol. 66: 5147-5156.

244. Machtei, E.E., M.I. Cho, R. Dunford, J. Norderyd, J.J. Zambon, R.J. Genco. 1994. Clinical, microbiological, and histological factors which influence the success of regenerative periodontal therapy. J. Periodontol. 65: 154-161.

245. Madianos, P.N., P.N. Papapanou, U. Nannmark, G. Dahlen, J. Sandros. 1996. *Porphyromonas gingivalis* FDC 381 multiplies and persists within human oral epithelial cells in vitro. Infect. Immun. 64: 660-664.

246. Madianos, P.N., P.N. Papapanou, J. Sandros. 1997. *Porphyromonas gingivalis* infection of oral epithelium inhibits neutrophil transepithelial migration. Infect. Immun. 65: 3983-3990.

247. Mäkelä, M., E. Söderling, K. Paunio, J. Hyyppä. 1991. Protein composition of crevicular fluid before and after treatment. Scand. J. Dent. Res. 99: 413-423.

248. Maley, J., N.B. Shoemaker, I.S. Roberts. 1992. The introduction of colonic-*Bacteroides* shuttle plasmids into *Porphyromonas gingivalis*: identification of a putative *P. gingivalis* insertion-sequence element. FEMS Microbiol. Letts. 72: 75-81.

249. Maley, J., I.S. Roberts. 1994. Characterization od IS1126 from *Porphyromonas gingivalis* W83: a new member of the IS4 family of insertion sequence elements. FEMS Microbiol. Letts. 123: 219-224.

250. Marcotte, H., P. Koll-Klais, A. Hultberg, Y. Zhao, R. Gmür, R. Mändar, M. Mikelsaar, L. Hammarström. 2006. Expression of single-chain antibody against RgpA protease of Porphyromonas gingivalis in *Lactobacillus.* J. Appl. Microbiol. 100: 256-263.

251. Marsh, P.D., A.S. McKee, A.S. McDermid, A.B. Dowsett. 1989. Ultrastructure and enzyme activities of a virulent and an avirulent variant of *Bacteroides gingivalis W50*. FEMS Microbiol. Lett. 50: 181-185.

252. Marsh, P.D., A.S. McDermid, A.S. McKee, A. Baskerville. 1994. The effect of growth rate and haemin on the virulence oand proteolytic activity of *Porphyromonas gingivalis* W50. Microbiology 140: 861-865.

253. Marsh, P., M.V. Martin. 2003. Orale Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart. 1. Aufl. S.33,49.

254. Masada, M.P., R. Persson, J.S. Kennedy, S.W. Lee, R.C. Page, A.C. Allison. 1990. Measurement of interleukin-1α and -1β in gingival crevicular fluid: Implications for the pathogenesis of periodontal disease. J. Periodont. Res. 25: 156-163.

255. Masuda, K., M. Yoshioka, D. Hinode, R. Nakamura. 2002. Purification and characterization of arginine carboxypeptidase produced by *Porphyromonas gingivalis.* Infect. Immun. 70: 1807-1815.

256. Masuda, K., Y. Murakami, T. Noguchi, F. Yoshimura. 2006. Effects of various growth conditions in a chemostat on expression of virulence factors in *Porphyromonas gingivalis*. Appl. Environ. Microbiol. 72: 3458-3467.

257. Matsushita, K., T. Imamura, M. Tomikawa. 2006. Selective inhibition of *Porphyromonas gingivalis* growth by a factor Xa inhibitor, DX-9065a. J. Periodont. Res. 41: 171-176.

258. Mattila K.J., V.V. Valtonen, M. Nieminen, J.K. Huttunen. 1995. Dental infection and the risk of new coronary events: prospektive study of patiens with documented coronary artery diseases. Clin. Infect. Dis. 20: 588-592.

259. McDermid, A.S., A..S. McKee, P.D. Marsh. 1988. Effect of environmental pH on enzyme activity and growth of *Bacteroides gingivalis* W50. Infect. Immun. 56: 1096-1100.

260. McGee, J.M., M.A. Tucci, T.P. Edmundson, C.L. Serio, R.B. Johnson. 1998. The relationsship between concentrations of proinflammatory cytokines within gingiva and the adjacent sulcular depth. J. Periodontol. 69: 865-871.

261. McKee, A.S., A.S. McDermid, A. Baskerville, A.B. Dowsett, D.C. Ellwood, P.D. Marsh. 1986. Effect of Hemin on the Physiology and Virulence of *Bacteroides gingivalis W50*. Infect. Immun. 52: 349-355.

262. McKee, A.S., A.S. McDermid, R. Wait, A. Baskerville, P.D. Marsh. 1988. Isolation of colonial variants of *Bacteroides gingivalis* W50 with a reduced virulence. J. Med. Microbiol. 27: 59-64.

263. Mezyk-Kopec, R., M. Bzowska, J. Potempa, M. Bzowska, N. Jura, A. Sroka, R.A. Black, J. Bereta. 2005. Inactivation of membrane tumor necrosis factor alpha by gingipains from *Porphyromonas gingivalis*. Infect. Immun. 73: 1506-1514.

264. Micheelis, W., U. Schiffner. 2006. Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV). Neue Ergebnisse zu oralen Erkrankungsprävalenzen, Risikogruppen und zum zahnärztlichen Versorgungsgrad in Deutschland 2005. Institut der Deutschen Zahnärzte (IDZ). IDZ - Materialienband 31.

265. Michel, J.B. 2003. Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23: 2146-2154.

266. Mihara, J., T. Yoneda, S.C. Holt. 1993. Role of *Porphyromonas gingivalis*-derived fibrobast-activating factor in bone resorption. Infect. Immun. 61: 3562-3564.

267. Mikolajczyk-Pawlinska, J., T. Kordula, N. Pavloff, P.A. Pemberton, W.C. Chen, J. Travis, J. Potempa. 1998a. Genetic variation of *Porphyromonas gingivalis* genes encoding gingipains, cystein proteinases with arginine or lysine specificity. Biol. Chem. 379: 205-211.

268. Mikolajczyk-Pawlinska, J., J. Travis, J. Potempa. 1998b. Modulation of interleukin-8 activity by gingipains from *Porphyromonas gingivalis*: implications for pathogenicity of periodontal disease. FEBS Lett. 440: 282-286.

269. Mikolajczyk, J., K.M. Boatright, H.R. Stennicke, T. Nazif, J. Potempa, M. Bogyo, G.S. Salvesen. 2003. Sequential autolytic processing activates the zymogen of Arg-gingipain. J. Biol. Chem. 278: 10458-10464.

270. Miura, M., T. Hamachi, O. Fujise, K. Maeda. 2005. The prevalence and pathogenic differences of Porphyromonas gingivalis fimA genotypes in patients with aggressive periodontitis. J. Periodont. Res. 40: 147-152.

271. Miyakawa, H., K. Honma, M. Qi, H.K. Kuramitsu. 2004. Interaction of Porphyromonas gingivalis with low-density lipoproteins: implications for a role for periodontitis in atherosclerosis. J. Periodont. Res. 39: 1-9.

272. Miyashi, K., K. Ishihara, R. Kimizuka, K. Okuda. 2007. Arg-Gingipain a DNA vaccine prevents alveolar bone loss in mice. J. Dent. Res. 86: 446-450.

273. Mombelli, A., B. Schmid, A. Rutar, N.P. Lang. 2000. Persistence Patterns of *Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* After Mechanical Therapy of Periodontal Disease. J. Periodontol. 71: 14-21.

274. Morioka, M., D. Hinode, A. Nagata, H. Hayashi, S. Ichimiya, M. Ueda, R. Kido, R. Nakamura. 1993. Cytotoxicity of *Porphyromonas gingivalis* toward cultured human gingival fibroblasts. Oral Microbiol. Immunol. 8: 203-207.

275. Moritz, J.A., D. Capelli, M.S. Lanz, S.C. Holt, J.L. Ebersole. 1998. Immunization with *Porphyromonas gingivalis* cysteine proteinase: Effect on experimental gingivitis and ligature-induced periodontitis in *Macacae fascilularis*. J. Periodontol. 69: 686-697.

276. Morrison, H.I., L.F. Ellison, G.W. Taylor. 1999. Periodontal disease and risk of fatal coronary heart and cerebrovascular diseases. J. Cardiovasc. Risk. 6: 7-11.

277. Mukherjee, S. 1985. The role of crevicular fluid iron in periodontal disease. J. Periodontol. 56 (Suppl.): 22-27.

278. Murakami, Y., M. Imai, Y. Mukai, S. Ichihara, H. Nakamura, F. Yoshimura. 2004. Effects of various culture environments on expression of major outer membrane proteins from *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Microbiol. Lett. 230: 159-165.

279. Murakami, Y., T. Masuda, M. Imai, J. Iwami, H. Nakamura, T. Nogushi, F. Yoshimura. 2004. Analysis of major virulence factors in *Porphyromonas gingivalis* under various culture temperatures using specific antibodies. Microbiol. Immunol. 48: 561-569.

280. Mydel, P., Y. Takahashi, H. Yumoto, M. Sztukowska, M. Kubica, F.C. Gibson III, D.M. Kurtz Jr., J. Travis, L.V. Collins, K-A. Nguyen, C.A. Genco, J. Potempa. 2006. Roles of the host oxidative immune response and bacterial antioxidant rubrerythrin during *Porphyromonas gingivalis* infection. PLOS Pathog. 2: e76: 712-725.

281. Nadkarni, M., K.-A. Ngyen, C.C. Chapple, A.A. DeCarlo, N.A. Jacques, N. Hunter. 2004. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* biotypes defined by alleles of the *kgp* (Lys-Gingipain) gene. J. Clin. Microbiol. 42: 3873-3876.

282. Naito, M. E. Sakai, Y. Shi, H. Ideguchi, M. Shoji, N. Ohara, K. Yamamoto, K. Nakayama. 2006. Porphyromonas gingivalis-induced platelet aggregation in plasma depends on Hgp44 adhesin but not Rgp proteinase. Mol. Microbiol. 59: 152-167.

283. Nakagawa, I., H. Inaba, T. Yamamura, T. Kato, S. Kawai, T. Ooshima, A. Amano. 2006. Invasion of epithelial cells and proteolysis of cellular focal adhesion components by distinct types of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. Infect. Immun. 74: 3773-3782.

284. Nakagawa, T., T. Sims, Q. Fan, J. Potempa, J. Travis, L. Houston, R.C. Page. 2001. Functional characteristics of antibodies induced by Arg-gingipain (HRgpA) and Lys-gingipain (Kgp) from Porphyromonas gingivalis. Oral Microbiol. Immunol. 16: 202-211.

285. Nakagawa, T., A. Saito, Y. Hosaka, K. Ishihara. 2003. Gingipains as candidate antigens for Porphyromonas gingivalis vaccine. Keio J. Med. 52: 158–162.

286. Nakayama K., T. Kadowaki, K. Okamoto, K. Yamamoto. 1995. Construction and characterization of arginine-specific cysteine proteinase (arg-gingipain)-deficient mutants of *Porphyromonas gingivalis*. J. Biol. Chem. 270: 23619-23626.

287. Nakayama K., F. Yoshimura, T. Kadowaki, K. Yamamoto. 1996. Involvement of arginine-specific cysteine proteinase (arg-gingipain) in fimbriation of *Porphyromonas gingivalis*. J. Bacteriol. 178: 2818-2824.

288. Nakayama K. 1997. Domain-specific rearrangement between the two Arg-gingipain-encoding genes in *Porphyromonas gingivalis*: possible involvement of nonreciprokal recombination. Microbiol. Immunol. 41: 185-196.

289. Nakayama, K., D.B. Ratnayake, T. Tsukuba, T. Kadowaki, K. Yamamoto, S, Fujimura. 1998. Haemoglobin receptor protein is intragenically encoded by the cysteine proteinase-encoding genes and the haemagglutinin-encoding gene of *Porphyromonas gingivalis*. Mol. Microbiol. 27: 51-61.

290. Nakayama K. 2003. Molecular genetics of *Porphyromonas gingivalis*: gingipains and other virulence factors. Curr Protein Pept Sci. 4: 389-95.

291. Nassar, H., H.-H. Chou, M. Khlgatian, F. C. Gibson III, T. E. Van Dyke, C. A. Genco. 2002. Role for fimbriae and lysine-specific cysteine proteinase gingipain K in expression of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein in *Porphyromonas gingivalis*-infected endothelial cells. Infect. Immun. 70: 268-276.

292. Neiders, M.E., P.B. Chen, H. Suido, H.S. Reynolds, J.J. Zambon, M. Shlossman, R.J. Genco. 1989. Heterogeneity of virulence among strains of *Bacteroides gingivalis*. J. Periodontol. Res. 24: 192-198.

293. Nelson, D., J. Potempa, T. Kordula, J. Travis. 1999. Purification and characterization of a novel cysteine proteinase (periodontain) from *Porphyromonas gingivalis.* J. Biol. Chem. 274: 12245-12251.

294. Nelson, D., J. Potempa, T. Kordula, J. Travis. 1999. Purification and characterization of a novel cysteine proteinase (periodontain) from *Porphyromonas gingivalis*. Evidence for a role in the inactivation of human α_1-proteinase inhibitor. J. Biol. Chem. 274: 12245-12251.

295. Nguyen, K.-A., A. A. DeCarlo, M. Paramaesvaran, C. A. Collyer, D. B. Langley, N. Hunter. 2004. Humoral responses to *Porphyromonas gingivalis* gingipain adhesin domains in subjects with chronic periodontitis. Infect. Immun. 72: 1374-1382.

296. Nguyen, K.-A., J. Travis, J. Potempa. 2007. 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. 189: 833-843.

297. Nilsson, T., J. Carlsson, G. Sundqvist. 1985. Inactivation of key factors of the plasma proteinase cascade systems by *Bacteroides gingivalis*. Infect. Immun. 50: 467-471.

298. Nisapakultorn, K., K. F. Ross, M.C. Herzberg. 2001. Calprotectin expression in vitro by oral epithelial cells confers resistance to infection by *Porphyromonas gingivalis*. Infect. Immun. 69: 4242-4247.

299. Njoroge, T., R.J. Genco, H.T. Sojar, N. Hamada, C.A. Genco.1997. A Role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* Invasion of Oral Epithelial Cells. Infect. Immun. 65: 1980-1984.

300. Norskov-Lauritsen, N., M. Kilian. 2006. Reclassification of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Haemophilus aphrophilus, Haemophilus paraphrophilus and Haemophilus segnis as Aggregatibacter actinomycetemcomitans gen. nov., comb. nov., Aggregatibacter aphrophilus comb. nov. and Aggregatibacter segnis comb. nov., and emended description of Aggregatibacter aphrophilus to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 2135-2146.

301. Nowzari, H., J. Slots. 1994. Microrganisms in polytetrafluoroethylene barrier membranes for guided tissue regeneration. J. Clin. Periodontol. 21: 203-210.

302. Nuttall, S.D., U.V.Krishnan, M. Hattarki, R. De Gori, R.A. Irving, P.J. Hudson. 2001. Isolation of the new antigen receptor from wobbegong sharks, and use as a scaffold for the display of protein loop libraries. Mol. Immunol. 38:313-26.

303. Nuttall, S.D., U.V. Krishnan, L. Doughty, A. Nathanielsz, N. Ally, R.N. Pike, P.J. Hudson, A.A. Kortt, R.A. Irving. 2002. A naturally occurring NAR variable domain binds the Kgp protease from *Porphyromonas gingivalis*. FEBS. Lett. 516: 80-86.

304. O'Brien-Simpson, N.M., R.A. Paolini, E.C. Reynolds. 2000. RgpA-Kgp peptide-based immunogens provide protection against *Porphyromonas gingivalis* challenge in a murine lesion model. Infect. Immun. 68: 4055-4063.

305. O'Brien-Simpson, N.M.,C.L. Black, P.S. Bhogal, S.M. Cleal, N. Slakeski, T.J. Higgins, E.C. Reynolds. 2000. Serum immunoglobulin G (IgG) and IgG subclass responses to the RgpA-Kgp proteinase-adhesin complex of *Porphyromonas gingivalis* in adult periodontitis. Infect. Immun. 68: 2704-2712.

306. O'Brien-Simpson, N.M., R.A. Paolini, B. Hoffmann, N. Slakeski, S. G. Dashper, E.C. Reynolds. 2001. Role of RgpA, RgpB, and Kgp proteinases in virulence of *Porphyromonas gingivalis* W50 in a murine lesion model. Infect. Immun. 69: 7527-7534.

307. O'Brien-Simpson, N.M., P.D. Veith, S.G. Dashper, E.C. Reynolds. 2003. *Porphyromonas gingivalis* gingipains: the molecular teeth of a microbial vampire. Curr. Protein Pept. Sci. 4: 409-426.

308. O'Brien-Simpson, N.M., P.D. Veith, S.G. Dashper, E.C. Reynolds. 2004. Antigens of bacteria associated with periodontitis. Periodontology 2000. 35: 101-134.

309. O'Brien-Simpson, N.M., R.D. Pathirana, R.A. Paolini, Y.Y. Chen, P.D. Veith, V. Tam, N. Ally, R. N. Pike, E.C. Reynolds. 2005. An immune response directed to proteinase and adhesin functional epitopes protects against *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontal bone loss. J. Immunol. 175: 3980-3989.

310. Oda, H., K. Saiki, Y. Numabe, K. Konishi. 2007. Effect of gamma-immunoglobulin on the asaccharolytic growth of Porphyromonas gingivalis. J. Periodont. Res. 42: 438-442.

311. Offenbacher, S., B.M. Odle, T.E. Van Dyke. 1986. The use of crevicular fluid prostaglandin E_2 level as a predictor of periodontal attachment loss. J. Periodont. Res. 21: 101-112.

312. Ohno, T., N. Okahashi, S. Kawai, T. Kato, H. Inaba, Y. Shibata, I. Morisaki, Y. Abiko, A. Amano. 2006. Proinfammatory gene expression in mouse ST2 cell line in response to infection by *Porphyromonas gingivalis*. Microbes and Infection. 8: 1025-1034.

313. Oido-Mori, M., R. Rezzonico, P.-L. Wang, Y. Kowashi, J.-M. Dayer, P.C. Baehni, C. Chizzolini. 2001. *Porphyromonas gingivalis* gingipain-R enhances interleukin-8 but decreases gamma interferon-inducible protein 10 production by human gingival fibroblasts in response to T-cell contact. Infect. Immun. 69: 4493-4501.

314. Okahashi, N., H. Inaba, I. Nakagawa, T. Yamamura, M. Kuboniwa, K. Nakayama, S. Hamada, A. Amano. 2004. *Porphyromonas gingivalis* induces receptor activator of NF-κB ligand expression in osteoblasts through the activator protein 1 pathway. Infect. Immun. 72: 1706-1714.

315. Okamoto, H., T. Yoneyama, J. Lindhe, A. Haffajee, S. Socransky. 1988. Methods of evaluating periodontal disease data in epidemiological research. J. Clin. Periodontol. 15: 430-439.

316. Okamoto, H., Y. Misumi, T. Kadowaki, M. Yoneda, K. Yamamoto, Y. Ikehara. 1995. Structural characterization of argingipain, a novel arginine-specific cysteine proteinase as a major periodontal pathogenic factor from *Porphyromonas gingivalis*. Arch. Biochem. Biophys. 316: 917-925.

317. Okamoto, H., T. Kadowaki, K. Nakayama, K. Yamamoto. 1996. Cloning and sequencing of the gene encoding a novel lysine-specific cysteine proteinase (Lys-gingipain) in Porphyromonas gingivalis: structural relationship with the arginine-specific cysteine proteinase (Arg-gingipain). J. Biochem. 120: 398-406.

318. Okamoto, H., K. Nakayama, T. Kadowaki, N. Abe, D.B. Ratnayake, K. Yamamoto. 1998. Involvement of a lysine-specific cysteine proteinase in hemoglobin adsorption and heme accumulation by *Porphyromonas gingivalis*. J. Biol. Chem. 273: 21225-21231.

319. Okamoto, H., A. Sugimoto, K-P. Leung, K. Nakayama, A. Kamaguchi, N. Maeda. 2004. Inhibitory effect of green tea catechins on cysteine proteinases in Porphyromonas gingivalis. Oral Microbiol. Immunol. 19: 118-120.

320. Olango, G.J., F. Roy, S.M. Sheets, M.K. Young, H.M. Fletcher. 2003. Gingipain RgpB is excreted as a proenzyme in the *vimA*-defective mutant *Porphyromonas gingivalis* FLL92. Infect. Immun. 71: 3740-3747.

321. Olczak, T., D.W. Dixon, C.A. Genco. 2001. Binding specificity of the *Porphyromonas gingivalis* heme and hemoglobin receptor HmuR, gingipain K, and gingipain R1 for heme, porphyrins, and metalloporphyrins. J. Bacteriol. 183: 5599-5608.

322. Olczak T, K. Siudeja, M. Olczak. 2006. Purification and initial characterization of a novel *Porphyromonas gingivalis* HmuY protein expressed in *Escherichia coli* and insect cells. Protein Expr. Purif. 49: 299-306. Epub 2006 Jun 6.

323. Oleksy, A., A. Banbula, M. Bugno, J. Travis, J. Potempa. 2002. Proteolysis of interleukin-6 receptor (IL-6R) by Porphyromonas gingivalis cysteine proteinases (gingipains) inhibits interleukin-6-mediated cell activation. Microb. Pathog. 32: 173-181.

324. Olsen, I., H.N Shah, S.E. Gharbia. 1999. Taxonomy and biochemical characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis.* Periodontol. 2000. 20: 14-52.

325. Page, R.C., S. Offenbacher, H.E. Schroeder, G.J. Seymour, K.S. Kornman. 1997. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. Periodontol. 2000. 14: 216-248.

326. Park, Y. R.J. Lamont. 1998. Contact-dependent protein secretion in *Porphyromonas gingivalis*. Infect. Immun. 66: 4777-4782.

327. Partridge, N.C., C.J. Hillyard, R.D. Nolan, T.J. Martin. 1985. Regulation of prostaglandin production by osteoblast-rich calvarial cells. Prostaglandins. 30: 527-539.

328. Paster, B.J., F.E. Dewhirst, I. Olsen, G.F. Fraser. 1994. Phylogeny of *Bacteroides, Prevotella*, and *Porphyromonas spp*. and related bacteria. J. Bacteriol. Feb.: 725-732.

329. Paster, B.J., S.K. Boches, J.L. Galvin, R.E. Ericson, C.N. Lau, V.A. Levanos, A. Sahasrabudhe, F.E. Dewhirst. 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. J. Bacteriol. 183: 3770-3783.

330. Paramaesvaran, M., K.A. Nguyen, E. Caldon, J.A. McDonald, S. Najdi, G. Gonzaga, D.B. Langley, A. DeCarlo, M.J. Crossley, N. Hunter, C.A. Collyer. 2003. Porphyrin-mediated cell surface heme capture from hemoglobin by *Porphyromonas gingivalis*. J. Bacteriol. 185: 2528-2537.

331. Paramanov, N., M. Rangarajan, A. Hashim, A. Gallagher, J. Aduse-Opoku, J.M. Slaney, E. Hounsell, M.A. Curtis. 2005. Structural analysis of a novel anionic polysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* strain W50 related to arg-gingipain glycans. Mol. Microbiol. 58: 847-863.

332. Pathirana, R.D., N.M. O´Brien-Simpson, P.D. Veith, P.F. Riley, E.C. Reynolds. 2006. Characterization of proteinase–adhesin complexes of *Porphyromonas gingivalis*. Microbiol. 152: 2381-2394.

333. Pathirana, R.D., N.M. O´Brien-Simpson, G.C. Brammar, N. Slakeski, E.C. Reynolds. 2007a. Kgp and RgpB, but not RgpA, are important for *Porphyromonas gingivalis* virulence in the murine periodontitis model. Infect. Immun. 75: 1436-1442.

334. Pathirana, R.D., N.M. O´Brien-Simpson, K. Visvanathan, J.A. Hamilton, E.C. Reynolds. 2007b. Flow cytometric analysis of adherence of *Porphyromonas gingivalis* to oral epithelial cells. Infect. Immun. 75: 2484-2492.

335. Pavloff, N., J. Potempa, R.N. Pike, V. Prochazka, M.C. Kiefer, J. Travis, P.J. Barr. 1995. Molecular cloning and structural characterization of the Arg-gingipain proteinase of *Porphyromonas gingivalis*. J. Biol. Chem. 270: 1007-1010.

336. Pavloff, N., P.A. Pemberton, J. Potempa. 1997. Molecular cloning and characterization of *Porphyromonas gingivalis* Lys-gingipain. A new member of an emerging family of pathogenic bacterial proteinase. J. Biol. Chem. 272: 1595-1600.

337. Percival, R.S., P.D. Marsh, D.A. Devine, M. Rangarajan, J. Aduse-Opoku, P. Shepherd, M.A. Curtis. 1999. Effect of temperature on growth, hemagglutination, and protease activity of *Porphyromonas gingivalis*. Infect. Immun. 67: 1917-1921.

338. Pham, K., D. Feik, B.F. Hammond, T.E. Rams, E.J. Whitaker. 2002. Aggregation of human platelets by gingipain-R from Porphyromonas gingivalis cells and membrane vesicles. Platelets. 13: 21-30.

339. Pike, R., J. Potempa, W. McGraw, J. Travis. 1994. Lysine- and arginine-specific proteinases from *Porphyromonas gingivalis*. J. Biol. Chem. 269: 406-411.

340. Pike, R.N., J. Potempa, W. McGraw, T.H.T. Coetzer, J. Travis. 1996. Characterization of the binding activities of protease-adhesin complexes from *Porphyromonas gingivalis*. J. Bacteriol. 178: 2876-2882.

341. Popadiak, K., J. Potempa, K. Riesbeck, A.M. Blom. 2007. Biphasic effect of gingipains from Porphyromonas gingivalis on the human complement system. J. Immunol. 178: 7242-7250.

342. Potempa J., N. Pavloff, J. Travis. 1995a. *Porphyromonas gingivalis* a proteinase/gene accounting audit. Trends Microbiol. 3: 420-434.

343. Potempa, J., R. Pike, J. Travis. 1995b. The multiple forms of trypsin-like activity present in various strains of *Porphyromonas gingivalis* are due to the presence of either Arg-gingipain of Lys-gingipain. Infect Immun. 63: 1176-1781.

344. Potempa, J., J. Travis. 1996. *Porphyromonas gingivalis* proteinases in periodontitis, a review. Acta Biochim Pol. 43: 455-65.

345. Potempa, J., R. Pike, J. Travis. 1997. Titration and mapping of the active site of cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis* (gingipains) using peptidyl chloromethanes. Biol. Chem. 378: 223-230.

346. Potempa, J., J. Mikolajczyk-Pawlinska, D. Brassell, D. Nelson, I.B. Thogersen, J.J. Enghild, J. Travis. 1998. Comparative properties of two cysteine proteinases (gingipains R), the products of two related but individual genes of *Porphyromonas gingivalis*. J. Biol. Chem. 273: 21648-21657.

347. Potempa, J., A. Banbula, J. Travis. 2000. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. Periodontol. 2000. 24: 153-192.

348. Potempa, J., A. Sroka, T. Imamura, J. Travis. 2003. Gingipains, the major cysteine proteinases and virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*: structure, function and assembly of multidomain protein complexes. Curr. Protein Pept. Sci. 4: 397-407.

349. Prior, K. 2005. Untersuchungen zur Populationsstruktur und Virulenz von *Porphyromonas gingivalis* anhand intraspezifischer Diversitätsanalysen ausgewählter Virulenzloci. Dissertation.

350. Pugsley, A.P. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. Microbiol. Rev. 57: 50-108.

351. Rahman, S., R.A. Bunning, P.R. Dobson. 1992. Bradykinin stimulates the production of prostaglandin E_2 and interleukin-6 in human osteoblasts-like cells. Biochim. Biophys. Acta. 1135: 97-102.

352. Rajapakse, P.S., N.M. O´Brien-Simpson, N. Slakeski, B. Hoffmann, E.C. Reynolds. 2002. Immunization with the RgpA-Kgp proteinase-adhesin complexes of *Porphyromonas gingivalis* protects against periodontal bone loss in the rat periodontitis model. Infect. Immun. 70: 2480-2486.

353. Rangarajan, M., S.J.M. Smith, M.A. Curtis. 1997a. Biochemical characterization of the arginine-specific proteases of *Porphyromonas gingivalis* W50 suggests a common precursor. Biochem. J. 323: 701-709.

354. Rangarajan, M., J. Aduse-Opoku, J.M. Slaney, K.A. Young, M.A. Curtis. 1997. The *prpR1* and the *prpR2* arginine-specific protease genes of *Porphyromonas gingivalis* W50 produce five biochemically distinct enzymes. Mol. Microbiol. 23: 955-965.

355. Rangarajan, M., M.A. Scragg, M.A. Curtis. 2000. Bait region cleavage and complex formation of human α_2M with a *Porphyromonas gingivalis* protease is not accompanied by enzyme inhibition. Biol. Chem. 381: 57-65.

356. Rangarajan, M., A. Hashim, J. Aduse-Opoku, N. Paramonov, E.F. Hounsell, M.A. Curtis. 2005. Expression of arg-gingipain RgpB is required for correct glycosylation and stability of monomeric arg-gingipain RgpA from *Porphyromonas gingivalis* W50. Infect. Immun. 73: 4864-4878.

357. Ransjö, M., M. Marklund, M. Persson, U.H. Lerner. 1998. Synergistic interactions of bradykinin, thrombin, interleukin-1, and tumor necrosis factor on prostanoid biosynthesis in human periodontal ligament cells. Arch. Oral. Biol. 43: 253-260.

358. Ratnayake, D.B., S.N. Way, Y. Shi, K. Amako, H. Nakayama, K. Nakayama. 2000. Ferritin from the obligate anaerobe *Porphyromonas gingivalis*: purification, gene cloning and mutant studies. Microbiology. 146: 1119-1127.

359. Reich, E., K.A. Hiller. 1993. Reasons for tooth extraction in the western states of Germany. Community Dent. Oral Epidemiol. 21: 379-383.

360. Reinhardt, R.A., J.B. Payne, C.A. Maze, K.D. Patil, S.J. Gallagher, J.S. Mattson. 1999. Influence of Estrogen and Osteopenia/Osteoporosis on Clinical Periodontitis in Postmenopausal Woman. J. Periodontol. 70: 823-828.

361. Ronderos, M., D.R. Jacobs, J.H. Himes, B.L. Pihlstrom. 2000. Associations of periodontal disease with femoral bone mineral density and estrogen replacement therapy: cross-sectional evaluation of US adults from NHANES III. J. Clin. Periodontol. 27: 778-786.

362. Rosan, B., R.J. Lamont. 2000. Dental plaque formation. Microbes Infect. 2: 1599.

363. Roy, F., E. Vanterpool, H.M. Fletcher. 2006. HtrA in *Porphyromonas gingivalis* can regulate growth and gingipain activity under stressful environmental conditions. Microbiology 152: 3391-3398.

364. Rubinstein, I., J. Potempa, J. Travis, X.P. Gao. 2001. Mechanisms mediating *Porphyromonas gingivalis* gingipain RgpA-induced oral mucosa inflammation in vivo. Infect. Immun. 69: 1199-1201.

365. Rudney, J. D., R. Chen, G. J. Sedgewick. 2001. Intracellular *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in Buccal Epithelial Cells Collected from Human Subjects. Infect. Immun. 69: 2700-2707.

366. Saiki, K., K. Konishi. 2007. Identification of a *Porphyromonas gingivalis* novel protein Sov required for the secretion of gingipains. Microbiol. Immunol. 51: 483-491.

367. Sakai, E., M. Naito, K. Sato, H. Hotokezaka, T. Kadowaki, A. Kamaguchi, K. Yamamoto, K. Okamoto, K. Nakayama. 2007. Construction of recombinant hemagglutinin derived from the gingipain-encoding gene of *Porphyromonas gingivalis*, identification of its target protein on erythrocytes, and inhibition of hemagglutination by an interdomain regional peptide. J. Bacteriol. 189: 3977-3986.

368. Sandros, J., P.N. Papapanou, U. Nannmark, G. Dahlén. 1994. *Porphyromonas gingivalis* invades human pocket epithelium in vitro. J. Periodontal Res. 29: 62-69.

369. Sandros, J., C. Karlsson, D.F. Lappin, P.N. Madianos, D.F. Kinane, P.N. Papapanou. 2000. Cytokine Responses of Oral Epithelial Cells to *Porphyromonas gingivalis* Infection. J. Dent. Res. 79: 1808-1814.

370. Sato, K., E. Sakai, P.D. Veith, M. Shoji, Y. Kikuchi, H. Yukitake, N. Ohara, M. Naito, K. Okamoto, E.C. Reynolds, K. Nakayama. 2005. Identification of a new membrane-associated protein that influences transport/maturation of gingipains and adhesins of *Porphyromonas gingivalis.* J. Biol. Chem. 280: 8668-8677.

371. Sauer, K., A.K. Camper, G.D. Ehrlich, J.W. Costerton, D.G. Davies. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. J. Bacteriol. 184: 1140-1154.

372. Sawa, T., F. Nishimura, H. Ohyama, K. Takahashi, S. Takashiba, Y. Murayama. 1999. In vitro induction of activation–induced cell death in lymphocytes from chronic periodontal lesions by exogenous Fas ligand. Infect. Immun. 67: 1450-1454.

373. Schenkein, H.A. 1991. Complement factor D-like activity of *Porphyromonas gingivalis* W83. Oral Microbiol. Immunol. 6: 216-220.

374. Schenkein, H.A. 1991b. The role of complement in periodontal disease. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 2: 65-81.

375. Scott, C.F., E.J. Whitaker, B.F. Hammond, R.W. Colman. 1993. Purification and characterization of a potent 70-kDa thiol lysylproteinase (lys-gingivain) from *Porphyromonas gingivalis* that cleaves kininogen and fibrinogen. J. Biol. Chem. 268: 7935-7942.

376. Scragg, M.A., S.J. Cannon, M. Rangarajan, D.M. Williams, M.A. Curtis. 1999. Targeted disruption of fibronectin-integrin interactions in human gingival fibroblasts by the R1 protease of *Porphyromonas gingivalis* W50. Infect. Immun. 67: 1837-1843.

377. Scragg, M.A., A. Alsam, M. Rangarajan et al. 2002. Nuclear targeting of *Porphyromonas gingivalis* W50 protease in epithelial cells. Infect. Immun. 70: 5740-5750.

378. Seers, C.A., N. Slakeski, P.D. Veith, T. Nikolof, Y.-Y. Chen, S.G. Dashper, E.C. Reynolds. 2006. The RgpB C-terminal domain has a role in attachment of RgpB to the outer membrane and belongs to a novel C-terminal-domain family found in *Porphyromonas gingivalis.* J. Bacteriol. 188: 6376-6386.

379. Seymour, G.F., J.J. Taylor. 2004. Shouts and whispers: an introduction to immunregulation in periodontal disease. Periodontology 2000. 35: 9-13.

380. Shah, H.N., S.E. Gharbia. 1992. Biochemical and chemical studies on strains designated *Prevotella intermedia* and proposal of a new pigmented species, *Prevotella nigrescens sp. nov*. Int. J. Syst. Bacteriol. 42: 542-546.

381. Shah, H.N., S.E. Gharbia, C.M. O´Toole. 1992. Assessment of the relative cytotoxicity of *Porphyromonas gingivalis* cells, products, and components on human epithelial cell lines. J. Periodontol. 63: 44-51.

382. Sharma, D.C., S.B. Prasad, B.V. Karthikeyan. 2007. Vaccination against periodontitis: the saga continues. Expert Rev. Vaccines. 6: 579-590.

383. Sheets, S.M., J. Potempa, J. Travis, C.A. Casiano, H.M. Fletcher. 2005. Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* W83 induce cell adhesion molecule cleavage and apoptosis in endothelial cells. Infect. Immun. 73: 1543-1552.

384. Sheets, S.M., J. Potempa, J. Travis, H.M. Fletcher, C.A. Casiano. 2006. Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* W83 synergistically disrupt endothelial cell adhesion and can induce caspase-independent apoptosis. Infect. Immun. 74: 5667-5678.

385. Shelburne, C.E., R.M. Gleason, G.R. Germaine, L.F. Wolff, B.H. Mullally, W.A. Coulter, D.E. Lopatin. 2002. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis of *Porphyromonas gingivalis* gene expression *in vivo*. J. Microbiol. Methods. 49: 147-156.

386. Shelburne, C.E., R.M. Gleason, W.A. Coulter, M.S. Lantz, D.E. Lopatin. 2005. Differential display analysis of Porphyromonas gingivalis gene activation response to heat and oxidative stress. Oral Microbiol. Immunol. 20: 233-238.

387. Shi, Y., D.B. Ratnayake, K. Okamoto, N. Abe, K. Yamamoto, K. Nakayama. 1999. Genetic analysis of proteolysis, hemoglobin binding, and hemagglutination of *Porphyromonas gingivalis*. Construction of mutants with a combination of *rgpA, rgpB, kgp,* and *hagA*. J. Biol. Chem. 274: 17955-17960.

388. Shiloah, J., M.R. Patters, J.W.3rd Dean, P. Bland, G. Toledo. 1998. The Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis*, and *Bacteroides forsythus* in Humans 1 Year After 4 Randomized Treatment Modalities. J. Periodontol. 69: 1364-1372.

389. Shinohara, C., S. Mori, T. Ando, T. Tsuji. 1999. Arg-gingipain inhibition and anti-bacterial activity selective for *Porphyromonas gingivalis* by Malabaricone C. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63: 1475-1477.

390. Shoji M., D.B. Ratnayake, Y. Shi, T. Kadowaki, K. Yamamoto, F. Yoshimura, A. Akamine, M.A. Curtis, K. Nakayama. 2002. Construction and characterization of a nonpigmented mutant of *Porphyromonas gingivalis*: cell surface polysaccharide as an anchorage for gingipains. Microbiol. 148: 1183-1191.

391. Shoji, M., M. Naito, H. Yukitake, K. Sato, E. Sakai, N. Ohara, K. Nakayama. 2004. The major structural components of two cell surface filaments of Porphyromonas gingivalis are matured through lipoprotein precursors. Mol. Microbiol. 52: 1513-1525.

392. Simpson, W., C.Y. Wang, J. Mikolajczik-Pawlinska, J. Potempa, J. Travis, V.C. Bond, C.A. Genco. 1999. Transposition of the endogeneous insertion sequence element IS1126 modulates gingipain expression in *Porphyromonas gingivalis*. Infect. Immun. 67: 5012-5020.

393. Simpson, W., T. Olczak, C.A. Genco. 2000. Characterization and expression of Hmur, a TonB-dependent hemoglobin receptor of *Porphyromonas gingivalis*. J. Bacteriol. 182: 5737-5748.

394. Simpson, W., T. Olczak, C.A. Genco. 2004. Lysine-specific gingipain K and heme/hemoglobin receptor HmuR are involved in heme utilization in *Porphyromonas gingivalis*. Acta Biochimica Polonica. 51: 253-262.

395. Slakeski, N., P.S. Bhogal, N.M. O´Brien-Simpson, E.C. Reynolds. 1998. Characterization of a second cell-associated Arg-specific cysteine proteinase of *Porphyromonas gingivalis* and identification of an adhesin-binding motif involved in association of the *PrtR* and *PrtK* proteinases and adhesins into large complexes. Microbiology 144: 1583-1592.

396. Slakeski, N., S.M. Cleal, P.S. Bhogal, E.C. Reynolds. 1999. Characterization of a *Porphyromonas gingivalis* gene *prtK* that encodes a lysine specific cysteine proteinase and three sequence-related adhesins. Oral Microbiol. Immunol. 14: 92-97.

397. Slaney, J.M., M. Rangarajan, J. Aduse-Opoku, S. Fawell, I. Darby, D. Kinane, M.A. Curtis. 2002. Recognition of the carbohydrate modifications to the RgpA protease of Porphyromonas gingivalis by periodontal patient serum IgG. J. Periodont. Res. 37: 215-222.

398. Slaney, J.M., M. Rangarajan, J. Aduse-Opoku, S. Fawell, I. Darby, D. Kinane, M.A. Curtis. 2006. Mechanisms of resistance of *Porphyromonas gingivalis* to killing by serum complement. Infect. Immun. 74: 5352-5361.

399. Slots, J. 1999a. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease: introduction. Periodontology 2000. 20: 7-13.

400. Slots, J., M. Ting. 1999b. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. Periodontology 2000. 20: 82-121.

401. Smalley, J.W., A.J. Birss, C.A. Shuttleworth. 1988. The degradation of type I collagen and human plasma fibronectin by the trypsin-like enzyme and extracellular membrane vesicles of *Bacteroides gingivalis* W50. Arch. Oral Biol. 33: 323-329.

402. Smalley, J.W., A.J. Birss, A.S. McKee, P.D. Marsh. 1996. Haemin binding as a factor in the virulence of *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Microbiol. Lett. 141: 65-70.

403. Smalley, J.W., J. Silver, P.J. Marsh, A.J. Birrs. 1998. The periodontopathogen *Porphyromonas gingivalis* binds iron protoporphyrin IX in the mu-oxo dimeric form: an oxidative buffer and possible pathogenic mechanism. Biochem. J. 331: 681-685.

404. Smalley, J.W., A.J. Birss, R. Withnall, J. Silver. 2002. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with oxyhaemoglobin and deoxyhaemoglobin. Biochem. J. 362: 239-245.

405. Smalley, J.W., M.F. Thomas, A.J. Birss, R. Withnall, J. Silver. 2004. A combination of both arginine- and lysine-specific gingipain activity of *Porphyromonas gingivalis* is necessary for the generation of the *μ*-oxo bishaem-containing pigment from haemoglobin. Biochem. J. 379: 833-840.

406. Smalley, J.W., A.J. Birss, B. Szmigielski, J. Potempa. 2006. The HA2 haemagglutinin domain of the lysine-specific gingipain (Kgp) of *Porphyromonas gingivalis* promotes m-oxo bishaem formation from monomeric iron(III) protoporphyrin IX. Microbiol. 152: 1839-1845.

407. Smalley, J.W., A.J. Birss, B. Szmigielski, J. Potempa. 2007. Sequential action of R- and K-specific gingipains of *Porphyromonas gingivalis* in the generation of the heam-containing pigment from oxyhaemoglobin. Arch. Biochem. Biophys. 465: 44-49.

408. Snipas, S.J., H.R. Stennicke, S. Riedl, J. Potempa, J. Travis, A.J. Barrett, G.S. Salvesen. 2001. Inhibition of distant caspase homologues by natural caspase inhibitors. Biochem. J. 357: 575-580.

409. Socransky, S.S., W.J. Loesche, C. Hubersak, J.B. MacDonald. 1964. Dependency of *Treponema microdentium* on other oral organisms for isobutyrate, polyamines, and a controlled oxidation-reduction potential. J. Bacteriol. 88: 200-209.

410. Socransky, S.S., A.D. Haffajee, J.M. Goodson, J. Lindhe. 1984. New concepts of destructive periodontal disease. J. Clin. Periodontol. 11: 21-32.

411. Socransky, S.S., A.D. Haffajee, C. Smith, S. Dibart. 1991. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. J. Clin. Periodontol. 18: 766-775.

412. Socransky, S.S., A.D. Haffajee. 1992. The Bacterial Etiology of Destructive Periodontal Disease: Current Concepts. J. Periodontol. 63: 322-331.

413. Socransky, S.S., A.D. Haffajee, M.A. Cugini, C. Smith, R.L.Jr. Kent. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. J. Clin. Periodontol. 25: 134-144.

414. Socransky, S.S., A.D. Haffajee, L.A. Ximenez-Fyvie, M. Feres, D. Mager. 1999. Ecological considerations in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* periodontal infections. Periodontology 2000. 20: 341-362.

415. Sorsa, T., T. Ingman, K. Suomalainen, M. Haapasalo. 1992. Identification of proteases from periodontopathogenic bacteria as activators of latent human neutrophil and fibroblast-type interstitial collagenases. Infect. Immun. 60: 4491-4495.

416. Sroka, A., M. Sztukowska, J. Potempa, J. Travis, C.A. Genco. 2001. Degradation of host heme proteins by lysine- and arginine-specific cysteine proteinases (gingipains) of *Porphyromonas gingivalis*. J. Bacteriol. 183: 5609-5616.

417. Stenman S., A. Vaheri. 1978. Distribution of an major connective tissue protein, fibronectin, in normal human tissues. J. Exp. Med. 147: 1054-1064.

418. Sternberg, C., B.B. Christensen, T. Johansen, A. Toftgaard-Nielsen, J.B. Andersen, M. Givskov, S. Molin. 1999. Distribution of Bacterial Growth Activity in Flow-Chamber Biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 65: 4108-4117.

419. Stewart, P.S., J.W. Costerton. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet. 358: 135.

420. Stoodley, P., Z. Lewandowski, J.D. Boyle, H.M. Lappin-Scott. 1998. Oscillation characteristics of biofilm streamers in turbulent flowing water as related to drag and pressure drop. Biotechnol. Bioeng. 57: 536.

421. Sugawara, S., E. Nemoto, H. Tada, K. Miyake, T. Imamura, H. Takada. 2000. Proteolysis of human monocyte CD14 by cysteine proteinases (gingipains) from *Porphyromonas gingivalis* leading to lipopolysaccharide hyporesponsiveness. J. Immunol. 165: 411-418.

422. Sundqvist, G., D. Figdor, L. Hanstrom, S. Sorlin, G. Sandstrom. 1991. Phagocytosis and virulence of different strains of *Porphyromonas gingivalis*. Scand. J. Dent. Res. 99: 117-129.

423. Sutherland, I.W. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiology. 147: 3-9.

424. Sztukowska, M., M. Bugno, J. Potempa, J. Travis, D.M. Kurtz Jr. 2002. Role of rubrerythrin in the oxidative stress response of *Porphyromonas gingivalis*. Mol. Microbiol. 44: 479-488.

425. Sztukowska, M., A: Sroka, M. Bugno, A. Banbula, Y. Takahashi, R.N. Pike, C.A. Genco, J. Travis, J. Potempa. 2004. The C-terminal domains of the gingipain K polyprotein are necessary for assembly of the active enzyme and expression of associated activities. Mol. Microbiol. 54: 1393-1408.

426. Tada, H., S. Sugawara, E. Nemoto, N. Takahashi, T. Imamura, J. Potempa, J. Travis, H. Shimauchi, H. Takada. 2002. Proteolysis of CD14 on human gingival fibroblasts by arginine-specific cystein proteinases from *Porphyromonas gingivalis* leading to down-regulation of lipopolysaccharide-induced interleukin-8 producton. Infect. Immun. 70: 3304-3307.

427. Tada, H., S. Sugawara, E. Nemoto, T. Imamura, J. Potempa, J. Travis, H. Shimauchi, H. Takada. 2003. Proteolysis of ICAM-1 on human oral epithelial cells by gingipains. J. Dent. Res. 82: 796-801.

428. Takahashi, N., T. Sato. 2001. Preferential utilization of dipeptides by *Porphyromonas gingivalis*. J. Dent. Res. 80: 1425-1429.

429. Takamatsu, N., K. Yano, M. Umeda, I. Ishikawa. 1999. Effect of initial periodontal therapy on the frequency of detecting *Bacteroides forsythus, Porphyromonas gingivalis*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J. Periodontol. 70: 574-580.

430. Takii, R., T. Kodawaki, A. Baba, T. Tsukuba, K. Yamamoto. 2005. A functional virulence complex composed of gingipains, adhesins, and lipopolysaccharide shows high affinity to host cells and matrix proteins and escapes recognition by host immune systems. Infect. Immun. 73: 883-893.

431. Tancharoen, S., K.P. Sarker, T. Imamura, K.K. Biswas, K. Matsushita, S. Tatsuyama, J. Travis, J. Potempa, M. Torii, I. Maruyama. 2005. Neuropeptide release from dental pulp cells by RgpB via proteinase-activated receptor-2 signaling. J. Immunol. 174: 5796–5804.

432. Taniguchi, A., F. Nishimura, Y. Murayama, S. Nagasaka, M. Fukushima, M. Sakai, et al. 2003. *Porphyromonas gingivalis* infection is associated with carotid atherosclerosis in non-obese Japanese type 2 diabetic patients. Metabolism. 52: 142-145.

433. Tarone, G., G. Galetto, M. Prat, P.M. Comoglio. 1982. Cell surface molecules and fibronectin-mediated cell adhesion: effect of proteolytic digestion of membrane proteins. J. Cell. Biol. 94: 179-186.

434. Teng, Y.A. 2003. The role of aquired immunity and periodontal disease progression. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 14: 237-252.

435. Tezal, M., J. Wactawski-Wende, S.G. Grossi, A.W. Ho, R. Dunford, R.J. Genco. 2000. The relationship between bone mineral density and periodontitis in postmenopausal women. J. Periodontol. 71: 1492-1498.

436. Tokuda, M., M. Duncan, M.I. Cho, H.K. Kuramitsu. 1996. Role of the *Porphyromonas gingivalis* protease activity in colonisation of oral surfaces. Infect. Immun. 64: 4067-4073.

437. Tokuda, M., T. Karunakaran, M. Duncan, N. Hamada, H.K. Kuramitsu. 1998a. Role of the Arg-gingipain A in virulence of *Porphyromonas gingivalis*. Infect. Immun. 66: 1159-1169.

438. Tokuda, M., W. Chen, T. Karunakaran, H.K. Kuramitsu. 1998b. Regulation of protease expression in *Porphyromonas gingivalis*. Infect. Immun. 66: 5232-5237.

439. Tolker-Nielsen, T., U.C. Brinch, P.C. Ragas, J.B. Andersen, C.S. Jacobsen, S. Molin. 2000. Development and dynamics of *Pseudomonas sp.* biofilms. J. Bacteriol. 182: 6482.

440. Tonetti, M., D. Cortellini, N.P. Lang. 1998. In situ detection of apoptosis at sites of chronic bacterially induced inflammation in human gingiva. Infect. Immun. 66: 5190-5195.

441. Travis, J., R. Pike, T. Imamura, J. Potempa. 1997. *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence factors in the development of periodontitis. J. Periodontal Res. 32: 120-125.

442. Travis J., A. Banbula, J. Potempa. 2000; The role of bacterial and host proteinases in periodontal disease. Adv. Exp. Med. Biol. 477: 455-65.

443. Uehara, A., S. Sugawara, R. Tamai, H. Takada. 2001. Contrasting responses of human gingival and colonic epithelial cells to lipopolysaccharides, lipoteichoic acids and peptidoglycans in the presence of soluble CD14. Med. Microbiol. Immunol. 189: 185-192.

444. Uehara, A., K. Muramoto, T. Imamura, K. Nakayama, J. Potempa, J. Travis, S. Sugawara, H. Takada. 2005. Arginine-specific gingipains from *Porphyromonas gingivalis* stimulate Production of hepatocyte growth factor (scatter factor) through protease-activated receptors in human gingival fibroblasts in culture. J. Immunol. 175: 6076–6084.

445. Uitto, V.J., H. Larjava, J. Heino, T. Sorsa. 1989. A protease of *Bacteroides gingivalis* degrades cell surface and matrix glycoproteins of cultured gingival fibroblasts and induces secretion of collagenase and plasminogen activator. Infect. Immun. 57: 213-218.

446. Umemoto, T. M. Li, I. Namikawa. 1997. Adherence of human oral spirochetes by collagen-binding proteins. Microbiol. Immunol. 41: 917-923.

447. Urnowey, S., T. Ansai, V. Bitko, K. Nakayama, T. Takehara, S. Barik. 2006. Temporal activation of anti- and pro-apoptotic factors in human gingival fibroblasts infected with the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis:* potential role of bacterial proteases in host signaling. BMC Microbiol. 6: 26. 1-15.

448. Vagnes, K.S., O. Vagnes, V. Bakken. 2007. Sera from mice immunized with dna encoding *Porphyromonas gingivalis* catalytic or adhesion part of HRgpA inhibit degradation of human fibronectin by HRgpA. Oral Microbiol. Immunol. 22: 46-51.

449. Van der Velden, U. 2006. The significance of supragingival plaque accumulation in periodontal disease. Int. J. Dent. Hygiene. 4 (Suppl. 1): 11-14.

450. Van Dyke, T.E., C.N. Serhan. 2003. Resolution of Inflammation: A New Paradigm for the Pathogenesis of Periodontal Diseases. J. Dent. Res. 82: 82-90.

451. Van Steenbergen, T.J.M., F.G. Delemarre, F. Namavar, J. De Graaf. 1987. Differences in virulence within the species *Bacteroides gingivalis*. Antonie Van Leeuwenhoek. 53: 233-244.

452. Vanterpool, E., F. Roy, H.M. Fletcher. 2004. The *vimE* gene downstream of *vimA* is independently expressed and is involved in modulating proteolytic activity in *Porphyromonas gingivalis* W83. Infect. Immun. 72: 5555-5564.

453. Vanterpool, E., F. Roy, L. Sandberg, H.M. Fletcher. 2005a. Altered gingipain maturation in *vimA*- and *vimE*-defective isogenic mutants of *Porphyromonas gingivalis*. Infect. Immun. 73: 1357-1366.

454. Vanterpool, E., F. Roy, H.M. Fletcher. 2005b. Inactivation of *vimF*, a putative glycosyltransferase gene downstream of *vimE*, alters glycosylation and activation of the gingipains in *Porphyromonas gingivalis* W83. Infect. Immun. 73: 3971-3982.

455. Vanterpool, E., F. Roy, W. Zhan, S.M. Sheets, L. Sandberg, H.M. Fletcher. 2006. *VimA* is part of the maturation pathway for the major gingipains of *Porphyromonas gingivalis* W83. Microbiol. 152: 3383-3389.

456. Van Winkelhoff, A.J., U. van der Velden, J. de Graaff. 1988. Microbial succession in recolonizing deep periodontal pockets after a single course of supra- and subgingival debridement. J. Clin. Periodontol. 15: 116-122.

457. Veith, P.D., G.H. Talbo, N. Slakeski, S.G. Dashper, C. Moore, R.A. Paolini, E.C. Reynolds. 2002. Major outer membrane proteins and proteolytic processing of RgpA and Kgp of *Porphyromonas gingivalis* W50. Biochem. J. 363: 105-115.

458. Veith, P.D., Y.-Y. Chen, E.C. Reynolds. 2004. *Porphyromonas gingivalis* RgpA and Kgp proteinases and adhesins are C terminally processed by the carboxypeptidase CPG70. Infect. Immun. 72: 3655-3657.

459. Virtanen, I., T. Vartio, R.A. Badley, V.P. Lehto. 1982. Fibronectin in adhesion, spreading and cytoskeletal organization of cultured fibroblasts. Nature. 298: 660-663.

460. Wang, H.L., H. Greenwell, N.F. Bissada. 1990. Crevicular fluid iron changes in treated and untreated periodontially diseased sites. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 69: 450-456.

461. Wang, P.L., S. Shirasu, M. Shinohara, M. Daito, M. Oido, Y. Kowashi, K. Ohura. 1999. Induction of apoptosis in human gingival fibroblasts by a *Porphyromonas gingivalis* protease preparation. Arch. Oral Biol. 44: 337-342.

462. Wang, P.L., M. Shinohara, N. Murakawa, M. Endo, S. Sakata, M. Okamura, K. Ohura. 1999. Effect of cysteine potease of *Porphyromonas gingivalis* on adhesion molecules in gingival epithelial cells. Jpn. J. Pharmacol. 80: 75-79.

463. Weinberg, A., C.M. Belton, Y. Park, R.J. Lamont. 1997. Role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. Infect. Immun. 65: 313-316.

464. Wingrove, W.A., R.G. DiScipio, Z. Chen, J. Potempa, J. Travis, T.E. Hugli. 1992. Activation of complement components C3 and C5 by a cysteine proteinase (gingipain-1) from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. J. Biol. Chem. 267: 18902-18907.

465. Winkel, E.G., A.J. van Winkelhoff, U. van der Velden. 1998. Additional clinical and microbiological effects of amoxicillin and metronidazole after initial periodontal therapy. J. Clin. Periodontol. 25: 857-864.

466. Whittaker, C.J., C.M. Klier, P.E. Kolenbrander. 1996. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 50: 513-552.

467. Woese, C.R. 1987. Bacterial Evolution. Microbiol. Rev. 51: 221-271.

468. Wooldridge, K.G., P.H. Williams. 1993. Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12: 325-348.

469. Xie, H., N.I. Belogortseva, J. Wu, W.-H. Lai, C. Chen. 2006. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 entry by a binding domain of *Porphyromonas gingivalis* gingipain. Antimicrob. Agents Chemother. 50: 3070-3074.

470. Ximénez-Fyvie, L.A., A.D. Haffajee, S.S. Socransky. 2000. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. J. Clin. Periodontol. 27: 648-657.

471. Xu, K.D., G.A. McFeters, P.S. Stewart, F. Xia, C.T. Huang. 1998. Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4035.

472. Xu, K.D., G.A. McFeters, P.S. Stewart. 2000. Biofilm resistance to antimicrobial agents. Microbiology. 146: 547.

473. Yamada, M., A. Ikegami, H.K. Kuramitsu. 2005. Synergistic biofilm formation by *Treponema deticola* and *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Microbiol. Lett. 250: 271-277.

474. Yamanaka, A., T. Kouchi, K. Kasai, T. Kato, K. Ishihara, K. Okuda. 2007. Inhibitory effect of cranberry polyphenol on biofilm formation and cysteine proteases of *Porphyromonas gingivalis*. J. Periodontol. Res. 42: 589-592.

475. Yamatake, K., M. Maeda, T. Kadowaki, R. Takii, T. Tsukuba, T. Ueno, E. Kominami, S. Yokota, K. Yamamoto. 2007. Role for gingipains in *Porphyromonas gingivalis* traffic to phagolysosomes and survival in human aortic endothelial cells. Infect. Immun. 75: 2090-2100.

476. Yasaki-Inagaki, Y., S. Inagaki, S. Yamada, K. Okuda, K. Ishihara. 2006. Production of protective antibodies against *Porphyromonas gingivalis* strains by immunization with recombinant gingipain domains. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 47: 287-295.

477. Yilmaz, O., T. Jungas, P. Verbeke, D.M. Ojcius. 2004. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway contributes to survival of primary epithelial cells infected with the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. Infect. Immun. 72: 3743-3751.

478. Yoneda, M., H.K. Kuramitsu. 1996. Genetic evidence for the relationship of *Porphyromonas gingivalis* cysteine protease and hemagglutinin activities. Oral Microbiol. Immunol. 11:129-34.

479. Yoneda, M., T. Hirofuji, H. Anan, A. Matsumoto, T. Hamachi, K. Nakayama, K. Maeda. 2001. Mixed infection of *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides forsythus* in a murine abscess model: involvement of gingipains in a synergistic effect. J. Periodont. Res. 36: 237-243.

480. Yoneda, M., T. Yoshikane, N. Motooka, K. Yamada, K. Hisama, T. Naito, I. Okada, M. Yoshinaga, K. Hidaka, K. Imaizumi, K. Maeda, T. Hirofuji. 2005. Stimulation of growth of *Porphyromonas gingivalis* by cell extracts from *Tannerella forsythia*. J. Periodont. Res. 40: 105-109.

481. Yonezawa, H., K. Ishihara, K. Okuda. 2001. Arg-Gingipain a DNA vaccine induces protective immunity against infection by *Porphyromonas gingivalis* in a murine model. Infect. Immun. 69: 2858-2864.

482. Yonezawa, H., T. Kato, H.K. Kuramitsu, K. Okuda, K. Ishihara. 2005. Immunization by Arg-gingipain A DNA vaccine protects mice against an invasive *Porphyromonas gingivalis* infection through regulation of interferon-gamma production. Oral Microbiol. Immunol. 20: 259-266.

483. Yoshioka, M., P.L. Wang, K. Ohura. 1997. Effect of proteases from *Porphyromonas gingivalis* on adhesion molecules of human periodontal ligament fibroblast cells. [Abstract]. Nippon Yakurigaku Zasshi. 110: 347-55.

484. Yun, P.L., A.A. DeCarlo, N. Hunter. 1999. Modulation of major histocompatibility complex protein expression by human γ interferon mediated by cysteine proteinase-adhesin polyproteins of *Porphyromonas gingivalis*. Infect. Immun. 67: 2986-2995.

485. Yun, P.L., A.A. DeCarlo, C. Collyer, N. Hunter. 2001. Hydrolysis of interleukin-12 by *Porphyromonas gingivalis* major cysteine proteinases may affect local gamma interferon accumulation and the Th1 or Th2 T-cell phenotype in periodontitis. Infect. Immun. 69: 5650-5660.

486. Yun, P.L., A.A. DeCarlo, C. Collyer, N. Hunter. 2002. Modulation of interleukin-12 and γ-interferon synergistic feedback regulatory cycle of T-cell and monocytes by lipopolysaccharide in the absence or presence of cysteine proteinases. Infect. Immun. 70: 5695-5705.

487. Yun, P.L., A.A. DeCarlo, C. Collyer, N. Hunter. 2003. Enhancement of Th2 pathways and direct activation of B cells by the gingipains of *Porphyromonas gingivalis*. Clin. Exp. Immunol. 134: 295-302.

488. Yun, P.L., A.A. DeCarlo, C.C. Chapple, N. Hunter. 2005a. Functional implication of the hydrolysis of platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (CD31) by gingipains of *Porphyromonas gingivalis* for the pathology of periodontal disease. Infect. Immun. 73: 1386-1398.

489. Yun, P.L., A.A. DeCarlo, C.C. Chapple, C. Collyer, N. Hunter. 2005b. Binding of *Porphyromonas gingivalis* gingipains to human CD4+ T cells preferentially down-regulates surface CD2 and CD4 with little effect on co-stimulatory molecule expression. Microbial Pathogenesis. 38: 85-96.

490. Yun, P.L., A.A. DeCarlo, N. Hunter. 2006. Gingipains of *Porphyromonas gingivalis* modulate leukocyte adhesion molecule expression induced in human endothelial cells by ligation of CD99. Infect. Immun. 74: 1661-1672.

491. Yun, P.L., A.A. DeCarlo, N. Hunter. 2007. Blockade of protease-activated receptors on T cells correlates with altered proteolysis of CD27 by gingipains of *Porphyromonas gingivalis*. Clin. Exper. Immunol. 150: 217-229.

492. Zhang, J., H. Dong, S. Casket, M.J. Duncan. 1999. IL-8 degradation by *Porphyromonas gingivalis* proteases. Microb. Pathog. 26: 275-280.

493. Zhang, P., Q.B. Yang, D.F. Balkovetz, J.P. Lewis, J.D. Clements, S.M. Michalek, J. Katz. 2005. Effectiveness of the B subunit of cholera toxin in potentiating immune responses to the recombinant hemagglutinin/adhesin domain of the gingipain Kgp from *Porphyromonas gingivalis*. Vaccine. 23: 4734-44.

494. Zhang, P., J.P. Lewis, S.M. Michalek, J. Katz. 2007. Role of CD80 and CD86 in host immune responses to the recombinant hemagglutinin domain of *Porphyromonas gingivalis* gingipain and in the adjuvanticity of cholera toxin B and monophosphoryl lipid A. Vaccine. 25: 6201-10. Epub 2007 Jun 19.

495. Chen, T., M.J. Duncan. 2004. Gingipain adhesin domains mediate *Porphyromonas gingivalis* adherence to epithelial cells. Microbial Pathogenesis 36: 205-209.

496. Werb, Z., P.M. Tremble, O. Behrendtsen, E. Crowley, C.H. Damsky. 1989. Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. J. Cell Biol. 109: 877-889.

497. Hanley, S.A., J. Aduse-Opoku, M.A. Curtis. 1999. A 55-kilodalton immunodominant antigen of *Porphyromonas gingivalis W50* has arisen via horizontal gene transfer. Infect. Immun. 67: 1157-1171.

498. Wang, C.-Y., V.C. Bond, C.A. Genco. 1997. Identification of a second endogenous *Porphyromonas gingivalis* insertion element. J. Bacteriol. 179: 3808-3812.

499. Sawada, K., S. Kokeguchi, H. Hongyo, S. Sawada, M. Miyamoto, H. Maeda. 1999. Identification by substractive hybridization of a novel insertion sequence specific for virulent strains of *Porphyromonas gingivalis*. Infect. Immun. 67: 5621-56225.

6. Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Pathogenese der Parodontitis	Seite 6
Abbildung 2	Subgingivale mikrobiologische Komplexe	Seite 8
Abbildung 3	*P. gingivalis*-Isolat (Phasenkontrast)	Seite 10
Abbildung 4	Das *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides*-Phylum	Seite 12
Abbildung 5	Ausschnitt eines phylogenetischen Baumes der *Bacteroides*-Subgruppe des *CFB*-Phylums als Resultat einer 16S rRNA-Sequenzierung	Seite 14
Abbildung 6	Die Angriffpunkte der Gingipaine im Kallikrein/Kinin-System und im Blutgerinnungssystem	Seite 26
Abbildung 7	Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen bzw. den alternativen Weg	Seite 31
Abbildung 8	Die multiplen pathogenen Aktivitäten der Gingipaine in ihrer Assoziation mit der Parodontitis und anderer Erkrankungen	Seite 33
Abbildung 9	Die Rolle des proteolytischen Systems von *P. gingivalis* bei der eigenen Nährstoffbeschaffung	Seite 39

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Klassifikation parodontaler Erkrankungen und Zustände	Seite 5
Tabelle 2	Prozentuale Übereinstimmungen bzw. Unterschiede zwischen den jeweiligen 16S rRNA-Sequenzen	Seite 15
Tabelle 3	Peptidasen von *P. gingivalis*	Seite 15
Tabelle 4	Prävalenz der identifizierten Hämagglutininvarianten bei *P. gingivalis* Wildstämmen	Seite 20
Tabelle 5	Eigenschaften von *P. gingivalis* Gingipain Mutationen	Seite 43

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Wolfgang Pfister für die Idee, die Überlassung des Themas, seiner die Unterstützung und schnelle Reaktionen auf meine Emails sowie der Bereitstellung finanzieller Mittel für die Literaturrecherche.
An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meiner Frau bedanken, die es tapfer ausgehalten hat, auf viel gemeinsame Freizeit zu verzichten.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Geburtsdatum, Ort	14.06.1971 in Münster
Familienstand	verheiratet mit Dr. Ruth Swaneburg

Berufstätigkeit

Seit Feb. 2008	Zusammen mit meiner Ehefrau Dr. Ruth Swaneburg tätig in eigener parodontologischer Schwerpunktpraxis in Soest
2007	Tätigkeit als angestellter Zahnarzt in einer Facharztpraxis für Oralchirurgie
2003 - 2007	Tätigkeit als Ausbildungsassistent bei Dr. Kai Worch, M.S. (USA), Fachzahnarzt für Parodontologie in Garbsen

Masterthesis

2007-2009	„Gingipaine als Virulenzfaktoren von *Porphyromonas gingivalis* und ihre Bedeutung in der Pathogenese der Parodontitis“ bei Universitätsprofessor Dr. med. Wolfgang Pfister am Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Jena

Promotion

01/2006	Spezifischer Nachweis von *Porphyromonas gingivalis*-16S rRNA mittels der DNA-Sonden „*P.gingivalis* specific“ und „*P.gingivalis* BG32“ durch Fluoreszenz in situ Hybridisation (FISH-technik) bei Univ.-Prof. Dr. Flemmig und Univ.-Prof. Dr. Karch an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster

Studium

1997 - 2003	Studium der Zahnmedizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster

Vorheriger Werdegang

1994 - 1997	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife
1991 - 1994	Tätigkeit als Zahntechniker und zwischenzeitlich als Zeitsoldat im Sanitätsdienst einer Zahnarztgruppe der Bundeswehr
1987 - 1991	Ausbildung zum Zahntechniker

Soest, den 14.02.2009

Dr. Uwe Swaneburg