

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Poliklinik für Parodontologie
Kommissarische Leiter:
Univ.-Prof. Dr. Dag Harmsen
Priv.-Doz. Dr. Benjamin Ehmke

Untersuchungen zur Populationsstruktur und Virulenz
von *Porphyromonas gingivalis* anhand
intraspezifischer Diversitätsanalysen
ausgewählter Virulenzloci.

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor rerum medicinalium
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Prior, Karola (geb. Beerens)
aus Ascheberg
2005

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Heribert Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Flemmig
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Helge Karch

Tag der mündlichen Prüfung: 24. August 2006

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Poliklinik für Parodontologie
Kommissarische Leiter:
Univ.-Prof. Dr. med. D. Harmsen, Priv.-Doz. Dr. med. dent. B. Ehmke
Referent: Univ.-Prof. Dr. Thomas Flemmig
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Helge Karch

Zusammenfassung

Untersuchungen zur Populationsstruktur und Virulenz von *Porphyromonas gingivalis*
anhand intraspezifischer Diversitätsanalysen ausgewählter Virulenzloci.
Karola Prior

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden 108 *P. gingivalis*-Isolate von 104 Parodontitispatienten analysiert. Bei zwei der 104 Patienten konnte eine Mischinfektion mit verschiedenen Genotypen nachgewiesen werden. Die Nukleinsäurestruktur der Virulenzfaktoren *fimA*, *rgpA*, *rgpB*, *kgp*, *prtT* und *tpr* wurden mit Hilfe von Sequenz- und Restriktionsanalysen identifiziert. Basierend auf diesen Daten konnten die Isolate zum Teil schon bekannten Subtypen, wie z.B. *fimA* I bis V, zugeteilt werden. Darüber hinaus konnten aber auch neue Untergruppen identifiziert werden, insbesondere bei den weniger untersuchten Proteasen PrtT und Tpr. Bei 108 analysierten Isolaten konnten 82 verschiedene Kombinationen der identifizierten Allele nachgewiesen werden. Die Berechnung der „Coverage“ zeigte in Übereinstimmung mit der Rarefaction-Analyse, dass die Gesamtdiversität der untersuchten Loci damit noch nicht einmal zur Hälfte erfasst wurde. Um eine Einschätzung der Populationsstruktur von *P. gingivalis* vornehmen zu können wurde der standardisierte Assoziationsindex berechnet. Dieser lag mit einem Wert von 0,0079 nahe an Null, ein Hinweis darauf, dass die untersuchte Population nahezu das „linkage equilibrium“ (verbundene Gleichgewicht) erreicht. Ebenso wie die große Anzahl verschiedener Genotypen ist dies ein Indiz für eine fehlende Kopplung der untersuchten Genloci. Erreicht wird die Unabhängigkeit der einzelnen Gene durch eine hohe Rekombinationsrate.

Die genetische Heterogenität von *P. gingivalis* wurde schon häufig untersucht, jedoch basiert die Identifizierung der einzelnen Genotypen in dieser Studie erstmals auf Allelen von Virulenzfaktoren, denen zum Teil schon eine unterschiedliche Funktionalität in der Virulenz von *P. gingivalis* nachgewiesen werden konnte. Unabhängig davon gehen die Ergebnisse konform mit denen früherer Studien, die keine distinkte Evolutionslinie für die Virulenz von *P. gingivalis* identifizieren konnten.

Tag der mündlichen Prüfung: 24. August 2006

1	EINLEITUNG	- 1 -
<hr/>		
1.1	PARODONTITIS UND <i>PORPHYROMONAS GINGIVALIS</i>	- 1 -
1.2	VIRULENZFAKTOREN	- 1 -
1.2.1	FIMA	- 2 -
1.2.2	GINGIPAIN	- 2 -
1.2.2.1	RgpA und RgpB	- 3 -
1.2.2.2	Kgp-Hämagglutininteil	- 3 -
1.2.3	PRTT	- 4 -
1.2.4	TPR	- 5 -
1.3	POPULATIONSTRUKTUR VON <i>PORPHYROMONAS GINGIVALIS</i>	- 6 -
1.4	ZIEL DER STUDIE	- 6 -
2	MATERIAL UND METHODEN	- 8 -
<hr/>		
2.1	PROBENENTNAHME	- 8 -
2.2	ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG VON <i>PORPHYROMONAS GINGIVALIS</i> AUS KLINISCHEM PROBENMATERIAL	- 8 -
2.2.1	ISOLIERUNG AUS KLINISCHEM PROBENMATERIAL	- 8 -
2.2.2	IDENTIFIZIERUNG MITTELS POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)	- 9 -
2.3	IDENTIFIZIERUNG VERSCHIEDENER GENOTYPEN DURCH DIREKTE SEQUENZIERUNG DES PCR-PRODUKTES	- 9 -
2.3.1	AMPLIFIKATION DES PCR-PRODUKTES	- 9 -
2.3.2	ENZYMATISCHE REINIGUNG DES PCR-PRODUKTES	- 11 -
2.3.3	SEQUENZIERUNGSREAKTION	- 11 -
2.3.1.1	Variationen im katalytischen Zentrum der <i>rgp</i> -Gene	- 11 -
2.3.1.2	Identifizierung der <i>kgp</i> -Hämagglutininvarianten	- 12 -
2.3.4	ETHANOLFÄLLUNG	- 12 -
2.3.5	AUSWERTUNG DER SEQUENZDATEN	- 12 -
2.4	IDENTIFIZIERUNG UND SUBTYPISIERUNG DES GENOTYPS MITTELS RESTRIKTIONSANALYSE	- 13 -
2.4.1	FIMA-SUBTYPISIERUNG	- 13 -
2.4.2	KGP-HÄMAGGLUTININ W83 FEINTYPISIERUNG	- 13 -
2.4.3	PRTT-SUBTYPISIERUNG	- 14 -
2.4.4	DIFFERENZIERUNG DER TPR-ALLELE	- 14 -

2.5	DIVERSITÄTSANALYSEN	- 15 -
2.5.1	COVERAGE	- 15 -
2.5.2	RAREFACTION-ANALYSE	- 15 -
2.5.3	IDENTIFIZIERUNG DER POPULATIONSTRUKTUR	- 16 -
3	ERGEBNISSE	- 17 -
3.1	UNTERSUCHTES P. GINGIVALIS-KOLLEKTIV	- 17 -
3.2	IDENTIFIZIERUNG DER <i>FIMA</i>-GENOTYPEN	- 17 -
3.3	SEQUENZVARIATIONEN IN <i>RGPA</i> UND <i>RGPB</i>	- 20 -
3.4	<i>KGP</i>-HÄMAGGLUTININVARIANTEN	- 22 -
3.5	<i>PRTT</i>-POLYMORPHISMEN	- 23 -
3.6	MUTATIONEN IM <i>TPR</i>-GEN	- 25 -
3.7	INTRASPEZIFISCHE DIVERSITÄT	- 27 -
3.7.1	COVERAGE	- 29 -
3.7.2	RAREFACTION-DIVERSITÄTSANALYSE	- 30 -
3.7.3	STANDARDISierter ASSOZIATIONSINDEX (I_A^S)	- 30 -
4	DISKUSSION	- 32 -
	LITERATURVERZEICHNIS	- 39 -
	ANHANG	I

1 Einleitung

1.1 Parodontitis und *Porphyromonas gingivalis*

Das Parodontium, auch Zahnhalteapparat genannt, ist eine komplexe Struktur aufgebaut aus Gingiva (Zahnfleisch), Alveolarknochen, Desmodont (Wurzelhaut) und Cementum (Wurzelzement). Gemeinsam sorgen diese Elemente für die feste Verankerung der Zähne im Kiefer. Die Parodontitis ist eine chronische Entzündung dieses Zahnhalteapparates, die den Abbau der bindegewebigen Verankerung und des zahntragenden Knochens hervorruft. Sie wird unter anderem durch Komponenten eines mikrobiellen Biofilms ausgelöst, der sich an der Grenze zwischen harter Zahnoberfläche und angrenzendem Weichgewebe bildet und aus einer Vielzahl verschiedener Bakterienspezies aufgebaut ist. Obwohl inzwischen über 500 verschiedene Bakterienarten identifiziert werden konnten (58), ist die Anzahl der am Entzündungs-geschehen beteiligten Bakterien relativ gering (15, 18).

Ein wichtiger Vertreter unter den parodontalpathogenen Bakterien ist *Porphyromonas gingivalis*, ein anaerobes, gram-negatives unbewegliches Kurzstäbchen aus der Gruppe der schwarz pigmentierten Bakterien. *P. gingivalis* gilt als einer der Hauptverursacher der chronischen und aggressiven Parodontitis (18). Es verfügt über eine Vielzahl verschiedener Virulenzfaktoren, die es ihm ermöglichen sich im Wirtsorganismus zu etablieren und eine parodontale Erkrankung auszulösen. *P. gingivalis* adhäriert an Epithelzellen, roten Blutkörperchen, Kollagenkomplexen sowie anderen Bakterien und ist darüber hinaus auch in der Lage in die Epithelzellen einzudringen (17).

1.2 Virulenzfaktoren

Mit Virulenz wird der Grad der Pathogenität eines Organismus bezeichnet, sie wird durch seine Invasivität und Toxizität bestimmt. Unterschiede in der Progression einer Infektion können durch unterschiedlich virulente Stämme innerhalb einer Spezies hervorgerufen werden. Die heterogenen Virulenzeigenschaften von *P. gingivalis*

wurden an vielen Tiermodellen untersucht. In diesen Versuchen wurden die Tiere subkutan mit *P. gingivalis* infiziert und die Virulenz in Relation zur Größe des entstandenen Abszesses bzw. zur hervorgerufenen Hautläsion evaluiert. Anhand der Ergebnisse dieser Studien wurden viele Stämme als avirulent oder nichtinvasiv, wie z.B. die Stämme ATCC 33277, oder 381, oder als virulent und invasiv (ATCC53977, W83, W50) bewertet (5, 8, 35). Die Pathogenität von *P. gingivalis* liegt in einer Vielzahl von Virulenzfaktoren begründet, zu denen Lipopolysaccharide (LPS), Fimbrien, Hämagglutinin, Hämolysin und verschiedene extrazelluläre hydrolytische Enzyme, vor allem Proteinasen, gezählt werden (21, 31, 39).

1.2.1 FimA

Die Fimbrien gelten als ein wichtiger Virulenzfaktor von *P. gingivalis*. Fimbrien sind Haftstrukturen auf der Bakterienoberfläche, die eine wichtige Rolle bei der Initiierung bzw. dem Voranschreiten der Parodontitis spielen. Sie vermitteln die Adhärenz der Bakterien an und die anschließende Invasion in die Epithelgewebe des Wirtsorganismus (67). Die größte Untereinheit der *P. gingivalis*-Fimbrien, das Fimbrillin (FimA), ist bei einem Großteil der untersuchten *P. gingivalis*-Isolate nachweisbar (67, 41). Basierend auf Variationen in der Nukleotidsequenz des codierenden Gens, *fimA*, waren zum Zeitpunkt der Untersuchungen fünf Untergruppen (Typ I bis V) identifiziert (3, 51). Die Analyse der verschiedenen *fimA* Genotypen und ihrer klonalen Verteilung könnte Einblicke in die Epidemiologie dieser Spezies ermöglichen und darüber hinaus das Wissen über die Gast-Wirt-Beziehungen erweitern.

1.2.2 Gingipaine

P. gingivalis produziert eine Vielzahl verschiedener Proteinasen, die ebenfalls als wichtige Virulenzfaktoren angesehen werden (25, 44, 65). Innerhalb dieser Enzymgruppe nehmen die Gingipaine, die basierend auf der Primärsequenz innerhalb der Cysteinproteinase in eine separate Familie (C25) eingruppiert wurden, eine wichtige Rolle ein (61). Die Gingipaine werden durch drei Gene, *rgpA*, *rgpB* und *kgp* kodiert.

1.2.2.1 RgpA und RgpB

Die Produkte der *rgp*-Gene (RgpA, RgpB) spalten Polypeptidketten ausschließlich hinter einem Argininrest (16, 60). Das vom *rgpA*-Gen codierte Gingipain R tritt, durch proteolytische Prozessierung der initial translatierten Polypeptidkette in multiplen molekularen Formen auf. Hierzu gehören sowohl ein membranassoziiertes Enzym (mt-RgpA) als auch zwei lösliche Formen. Gelöst liegen zum einen die katalytische Domäne alleine RgpA_(cat), ein 50 kDa Protein, oder ein nichtkovalenter 95 kDa-Komplex aus katalytischer Domäne und Hämagglutinin-/Adhäsionsdomäne (HrgpA) vor (16, 49, 60). Innerhalb dieses Komplexes ist der katalytische Teil verantwortlich für die proteolytische Aktivität, der letztere Teil für die Adhäsion an extrazelluläre Matrixproteine und rote Blutzellen. Im Gegensatz zum *rgpA*, fehlt beim *rgpB*-Gen nahezu der gesamte codierende Bereich für die Hämagglutinin-/Adhäsionsdomäne, so dass als Produkt hauptsächlich das lösliche 50 kDa Protein (RgpB) vorliegt (49). Ally et al. (2) konnten anhand ihrer Untersuchungen eines *P. gingivalis* Laborstammes zeigen, dass die katalytischen Domänen von RgpA und RgpB bezüglich der Primärstruktur nahezu identisch sind und sich lediglich durch den Austausch von vier Aminosäuren (D281→N, Y283→S, P286→S und N331→K) voneinander unterscheiden. Im 3D-Modell sind diese vier Aminosäuren um das katalytische Zentrum herum angeordnet und könnten damit verantwortlich für die unterschiedliche Substratspezifität der beiden Gingipaine sein. Da noch keine Daten bezüglich dieser Aminosäurenaustausche in klinischen *P. gingivalis*-Isolaten vorliegen, wurde neben den Untersuchungen zur genetischen Variabilität des gesamten codierenden Bereichs, diesem Abschnitt der *rgp*-Gene besondere Beachtung geschenkt.

1.2.2.2 Kgp-Hämagglutininteil

Das *kgp*-Gen codiert für eine Lysin-spezifische Protease, die aus fünf Domänen zusammengesetzt ist: ein Propeptid, eine katalytische Domäne und drei Adhäsion-/Hämagglutinin-domänen (59). Dieses Enzym ist spezifisch an der Aufhebung des Gerinnungspotentials von Fibrinogen beteiligt und könnte daher für die Blutungstendenz und anhaltende Entzündung der mit *P. gingivalis* infizierten parodontalen Taschen verantwortlich sein (33). Darüber hinaus ist Kgp in der Lage den Leukozyten C5a-Rezeptor auszuschalten und könnte so zum Schutz des Bakteriums vor

Phagozytose durch C5a stimulierte Leukozyten beitragen (34). Sequenzanalysen von Propeptid und katalytischer Domäne ließen, basierend auf den Sequenzunterschieden in der katalytischen Domäne, zwei verschiedene Subtypen des *kgp*-Gens erkennen: *kgp-I* und *kgp-II* (9). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Variabilität der Kgp-Hämagglutindomänen analysiert werden. Die Hämagglutindomäne besteht aus den drei Untereinheiten: Kgp39, HA2 und Kgp44. Im Bereich der Kgp44-Domäne zeigen sich Variabilitäten zwischen verschiedenen *P. gingivalis*-Laborstämmen. Drei verschiedene Allele konnten in den Stämmen HG66, 381 und W83 identifiziert werden (59). Durch die Überprüfung von Patientenisolaten konnte ein weiteres Allel, eine Variante des W83-Genotyps (AY559244), identifiziert werden (50). Die Untersuchung der Patientenisolate im Rahmen dieser Studie soll Aufschluß über die Prävalenz der verschiedenen Genotypen im Patientenpool und über eventuell vorhandene weitere Subtypen geben.

1.2.3 PrtT

Das *prtT*-Gen codiert für eine Cysteinproteinase mit signifikanter Homologie zum Streptopain von *Streptococcus pyogenes*, auch als SpeB (streptococcal pyrogenic exotoxinB) bekannt. Daneben weist es große Ähnlichkeiten zu einer weiteren aus *P. gingivalis* isolierten Cysteinproteinase, dem Periodontain, auf. Aufgrund ihrer Homologie, speziell auch im Bereich des katalytischen Zentrums, sollten diese drei Proteinase zur Gruppe der C10 Familie der Cysteinproteinase zugerechnet werden (59). Alle bislang in *P. gingivalis* identifizierten Proteinase sind entweder auf der Bakterienoberfläche lokalisiert oder werden an das umgebende Medium abgegeben, was eine Beteiligung dieser Enzyme am Wachstum von *P. gingivalis* vermuten lässt. Da *P. gingivalis* ein asaccharolytisches Bakterium ist, muss sowohl sein Kohlenstoff- als auch Energiebedarf über die Aufnahme von Proteinbausteinen gedeckt werden. Allerdings ist *P. gingivalis* nicht in der Lage freie Aminosäuren über die Bakterienmembran aufzunehmen, kann jedoch Di- oder Tripeptide sehr gut verwerten (19). Diese Beobachtungen werden auch dadurch gestützt, dass obwohl eine Vielzahl von Untersuchungen zu extrazellulären Endopeptidasen von *P. gingivalis* durchgeführt werden, bislang keine Amino- oder Carboxypeptidasen beschrieben werden konnten.

Periodontain kann keine Proteine mit intakter Sekundär- oder Tertiärstruktur spalten, weist jedoch hohe proteolytische Aktivität gegenüber denaturierten und leicht verfügbaren Polypeptidketten auf. Aufgrund der signifikanten Homologien zwischen PrtT und Periodontain, einschließlich hoch konservierter Aminosäurereste an nachgewiesenen posttranslationalen Aktivierungsschnittstellen, wird für die PrtT-Cysteinproteinase ein ähnliches Aktivitätsspektrum angenommen (53). In einem hypothetischen Szenario könnte die physiologische Rolle der Proteinase folgendermaßen aussehen: Komplexe Proteine werden zunächst durch die Gingipaine in kleinere Fragmente gespalten, die dann vom Periodontain bzw. der PrtT-Proteinase weiter degradiert werden. Bislang ist lediglich eine Nucleinsäuresequenz der PrtT-Proteinase beschrieben worden, die auf der genetischen Ausstattung des Laborstammes ATCC53977 basiert (S75942). Daten über eventuell vorhandene Allele in aus Patienten isolierten Wildstämmen fehlen noch und sollten im Rahmen dieser Studie gewonnen werden.

1.2.4 Tpr

Die Charakterisierung der Tpr-Protease deutet darauf hin, dass es sich bei diesem Enzym um eine thiolabhängige Protease handelt, deren proteolytische Aktivität durch reduzierende Bedingungen aktiviert wird (12, 57). Die Aktivität der Protease wird bei Anzucht unter limitierenden Bedingungen (Nährstoffmangel) signifikant erhöht (56), woraus sich Rückschlüsse über eine vermutliche Beteiligung dieser Protease an der Nährstoffversorgung *in vivo* ergeben. Es konnte gezeigt werden, dass die *tpr*-Genexpression durch einen erhöhten Peptidlevel negativ kontrolliert wird, durch freie Aminosäuren jedoch unbeeinflusst bleibt (43). Tpr scheint somit, wie auch die PrtT-Protease, ein Glied in der Abbaukette komplexer Proteine zu sein, um die Nährstoffversorgung von *P. gingivalis* auch in Konkurrenz mit anderen parodontalpathogenen Erregern sicher zu stellen.

Bislang ist auch von der Tpr-Protease lediglich eine vom Stamm W83 untersuchte Gensequenz bekannt. Hier könnte, wie auch für die *prtT*-Gensequenz vermutet, die Untersuchung von Patientenisolaten eventuell zur Identifizierung weiterer Allele führen.

1.3 Populationsstruktur von *Porphyromonas gingivalis*

Um evaluieren zu können, ob Unterschiede in den verschiedenen Virulenzfaktoren von *P. gingivalis* die Existenz von pathogenen Evolutionslinien reflektieren, ist es notwendig Informationen über die grundlegende Populationsstruktur dieser Spezies zu erhalten. Bakterienarten mit einer klonalen Populationsstruktur sind durch ein starkes „linkage disequilibrium“ also ein gekoppeltes Ungleichgewicht gekennzeichnet, das durch eine nichtzufällige Assoziation von Allelen verschiedener Genloci charakterisiert wird. Bei diesen Populationen ist die Mutationsrate hoch, verglichen mit der Anzahl der Rekombinationen zwischen verschiedenen Stämmen, das heißt ein horizontaler Gentransfer tritt bei diesen Populationen zu selten auf, um die klonale Assoziation der untersuchten Loci aufzubrechen. Dies würde sich in einem gehäuften Auftreten virulenzassoziierter Allele der untersuchten Gene zeigen. Bei Bakterienspezies mit einer nichtklonalen Populationsstruktur werden die Evolutionslinien durch häufige intraspezifische Rekombinationen aufgebrochen. Dies resultiert in einer nahezu willkürlichen Verteilung der virulenzassozierten Allele (45).

1.4 Ziel der Studie

Unterschiede in der Progressionsrate einer Infektion können auf einer unterschiedlichen Virulenz der einzelnen Bakterienstämme innerhalb einer Spezies basieren. Eine Vielzahl von Untersuchungen am Tiermodell (8, 35) oder *in vitro*-Analysen (29, 32) mit Laborstämmen von *P. gingivalis* zeigen deutliche Unterschiede im pathogenen Potential der untersuchten Stämme auf. Eine Vielzahl von Typisierungsmethoden wurde entwickelt, um pathogene Klone besser identifizieren zu können. Hierzu zählen DNA-basierte Methoden, wie die Restriktionsenzymanalyse (REA, restriction enzyme analysis), Untersuchungen zum Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) und „arbitrary primed“ PCR-Analysen (AP-PCR) mit willkürlich ausgewählten Primern (14, 42, 46, 47, 55). Es wurden aber auch Multilokusenzymelektrophoresen (MLEE; 40) oder Ribotypisierungen (66) durchgeführt, um genetisch unterschiedliche Isolate zu identifizieren. In allen Studien konnte eine sehr große genetische Heterogenität der untersuchten *P. gingivalis*-Isolate nachgewiesen werden, nahezu jedes untersuchte Isolat wurde durch einen einzigartigen

genetischen Fingerabdruck charakterisiert. Dies führte Menard und Mouton zu der Hypothese, dass die von Ihnen eingesetzte AP-PCR eventuell ein zu sensitives Instrument ist, um ein realistisches Bild der Diversität wiederzugeben, da Mutationen, Deletionen und die Aufnahme neuen genetischen Materials von Generation zu Generation die Bakterien insgesamt bis zu einem gewissen Grad „genetisch instabil“ machen (48).

Um die intraspezifische Diversität von *P. gingivalis* besser zu verstehen wurden im Rahmen dieser Arbeit sechs Virulenzfaktoren (*fimA*, *rgpA*, *rgpB*, *kgp*, *prtT* und *tpr*) mit Hilfe von Sequenz- und Restriktionsanalysen auf ihre Zugehörigkeit zu zum Teil schon bekannten, zum Teil aber auch neu identifizierten Subtypen untersucht. Hierbei wurde im Gegensatz zu früher durchgeführten Arbeiten bewusst auf die Berücksichtigung einzelner Punktmutationen verzichtet und lediglich deutlich voneinander differenzierbare Subtypen der einzelnen Gene, wie zum Beispiel die verschiedenen *fimA*-Typen, als Allele identifiziert. Geringfügige Variationen innerhalb des Subtyps blieben unberücksichtigt.

Obwohl sich viele Studien mit der Untersuchung einzelner Virulenzfaktoren und ihrer putativen etiologischen Rolle im Entzündungsgeschehen beschäftigen (5, 9, 10, 50), sind bislang keine Untersuchungen durchgeführt worden, die sich mit der Kombination der verschiedenen bei vielen Virulenzfaktoren auch schon identifizierten Allele befassen. Die Untersuchungen zur Prävalenz der einzelnen Subtypen und ihrer unterschiedlichen Kombinationen sollte Aufschluß über die Populationsstruktur des untersuchten *P. gingivalis*-Kollektivs geben.

2 Material und Methoden

2.1 Probenentnahme

Die Gewinnung subgingivaler Plaqueproben erfolgte mit Hilfe steriler Papierspitzen (XXF, Roeko) aus der jeweils am stärksten betroffenen parodontalen Tasche pro Sextant. Die Papierspitzen wurden bis zum Erreichen eines taktilen Widerstandes in die Taschen eingeführt, dort für 10 s belassen, in ein Gefäß mit 0,5 ml steriler gekühlter Ringer-Glyzerinlösung (10% Glyzerin in Ringerlösung, ¼ konz.) überführt und sofort im Labor weiter verarbeitet.

2.2 Isolierung und Identifizierung von *Porphyromonas gingivalis* aus klinischem Probenmaterial

Die Kultivierung der Bakterien aus der subgingivalen Plaque erfolgt direkt im Anschluß an die Probenentnahme, um die Überlebensrate der entnommenen Bakterien, darunter *P. gingivalis* ein Vertreter der strikt anaeroben Bakterien, möglichst hoch zu halten.

2.2.1 Isolierung aus klinischem Probenmaterial

Zur Homogenisation wurden die subgingivalen Plaqueproben 10 s im Ultraschallbad (Bransonic 1510E; Branson, Dietzenbach) geschallt, in mehreren Verdünnungen (0, 1:20, 1:400 und 1:8000) auf Blutagarplatten (CDC-Agar) ausgestrichen und für eine Woche in Anaerobentöpfen (Anaerocult A, Merck, Darmstadt) bei 37 °C inkubiert. *P. gingivalis* wurde anhand seiner typischen Kolonienmorphologie identifiziert und Einzelkolonien auf Blutagarplatten subkultiviert, um Reinkulturen zu erhalten. Die so erhaltenen Isolate wurden mit sterilen Watteträgern abgenommen, in 500 µl Ringer-Glyzerin resuspendiert und in flüssigem Stickstoff konserviert.

2.2.2 Identifizierung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurde Bakterienmaterial der Reinkulturen mit einem sterilen Watteträger von den Agarplatten abgenommen und die Bakterien-DNA mit dem QiaAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert. Die so erhaltene DNA wurde sowohl für die Kontrolle der morphologischen Identifizierung als auch für die Identifizierung verschiedener Fimbrien- bzw. Protease-Genotypen durch direkte Sequenzierung des PCR-Produktes eingesetzt. Die morphologische Identifizierung der *P. gingivalis* Isolate wurde mit Hilfe einer spezifischen PCR verifiziert. Hierbei wurde ein 548bp Fragment aus dem zentralen Bereich des Collagenasegens *prtC* amplifiziert (11).

2.3 Identifizierung verschiedener Genotypen durch direkte Sequenzierung des PCR-Produktes

Um neben den bekannten Sequenzen der verschiedenen Virulenzgene neue Subtypen zu identifizieren, wurden die untersuchten Gene von einigen Isolaten komplett mittels direkter Sequenzierung ausgewählter PCR-Produkte analysiert.

2.3.1 Amplifikation des PCR-Produktes

Hierfür wurde zunächst ein PCR-Produkt amplifiziert, das in der späteren Sequenzierungsreaktion als Matrize eingesetzt wurde. Bekannte Gensequenzen der verschiedenen Virulenzgene (Genbank-Nummer in Tab. 1) wurden mit dem *P. gingivalis*-Genom verglichen (<http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenomePage3.spl?database=gpg>). Beim Primerdesign wurde darauf geachtet, dass sich wiederholende Nukleotidabfolgen (repeats) vermieden wurden, die Primer spezifisch den gewünschten Genabschnitt amplifizierten und in keinem anderen Lokus des *P. gingivalis*-Genoms binden konnten. Bei den größeren Genen musste mit mehreren Produkten gearbeitet werden. Die für die Sequenzierung verwendeten Primer sind in Tabelle 9 aufgeführt. Für die Amplifizierung wurden 5µl isolierte Bakterien-DNA, 5µl PCR-Puffer (10fach), 1,5mM Magnesiumchlorid, je 200µM der vier dNTPs, je 30pmol des Vorwärts- und Rückwärtsprimers, sowie 2U Taq-Polymerase auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt.

Tab. 1: Genbank-Nummern der bekannten Nukleinsäuresequenzen ausgewählter Virulenzloci.

Gen	Subtyp	Genbank-Nummer
<i>fimA</i>	<i>fimA</i> -Typ I	D17794
	<i>fimA</i> -Typ II	D17797
	<i>fimA</i> -Typ III	D17800
	<i>fimA</i> -Typ IV	D17802
	<i>fimA</i> -Typ V	AB027294
<i>rgpA</i>		U15282
<i>rgpB</i>		AF007124
<i>kgp</i>	<i>kgp</i> -381	U68468
	<i>kgp</i> -HG66	U54691
	<i>kgp</i> -W83	AF017059
	<i>kgp</i> -W83var	AY559244
<i>priT</i>		S75942
<i>tpr</i>		M84471

Die Amplifizierung wurde in einem T personal Thermocycler der Firma Biometra (Göttingen, Deutschland) nach folgendem Standardprotokoll durchgeführt: Einem initialen Denaturierungsschritt von 94°C für 3 min folgten 30 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt von 30 s bei 94°C, einem Annealingschritt von 30 s bei 55°C und einem Elongationsschritt bei 72°C, dessen Dauer abhängig von der Produktgröße zwischen 60 s und 5 min gewählt wurde. Ein abschließender Elongationsschritt von 72°C für 3 bis 10 min, je nach Produktgröße, beendete die Läufe. Zur Kontrolle der Produktgröße wurden 15 µl des amplifizierten Produktes mit 3 µl 6x Stopp-Puffer (1,85g EDTA, 25g Saccharose, 50mg Bromphenol, Aqua bidest ad 50ml) gemischt und auf ein 1,8% Agarosegel (Seakem-Agarose in TBE-Puffer) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in TBE-Puffer (21,6g Tris, 11,0g Borsäure, 18,6g EDTA, Aqua bidest. ad 2l) bei 180 V für 70 min (BioRad-Power Pac) in BioRad Elektrophoresekammern. Um die DNA sichtbar zu machen wurden die Agarosegele für 30 min im Ethidiumbromidbad gefärbt (1µg/ml Ethidiumbromid in TBE-Puffer), anschließend 15 min gewässert und auf dem UV-Tisch abgelichtet. PCR-Produkte der richtigen Größe, ohne Nebenbanden wurden für die weiteren Schritte verwendet.

2.3.2 Enzymatische Reinigung des PCR-Produktes

Für den Einsatz in der anschließenden Sequenzierungsreaktion wurden die PCR-Produkte mit dem „PCR-product-pre-sequencing Kit“ (GE Healthcare Bio-Sciences, Little Chalfont, United Kingdom,) enzymatisch gereinigt, das heißt Primer und dNTP's aus der vorherigen Amplifikationsrunde werden enzymatisch abgebaut. Hierfür wurden zu 10 µl der PCR-Produkte jeweils 1µl Exonuclease I (1 U/µl) und 1 µl Alkalische Phosphatase (1U/µl) pipettiert, für 20 min bei 37 °C im Thermocycler inkubiert und die zugegebenen Enzyme abschließend bei 80 °C in 10 min inaktiviert.

2.3.3 Sequenzierungsreaktion

Vom gereinigten PCR-Produkt wurden 2µl als Template für die Sequenzierung eingesetzt. Für jede Probe werden 1µl Primer (10pmol/µl), 1µl Big Dye Version 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, USA), 4µl Sequenzierungspuffer (400mM Tris-HCl pH 9,0; 10mM MgCl₂) und 12µl Wasser (molecular biology grade, Eppendorf) gemischt und zur Template-DNA zugegeben. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte in Biometra T personal Thermocyclern mit einem initialen Denaturierungsschritt von 3min bei 94°C, gefolgt von 25 Zyklen mit jeweils 30s Denaturierung bei 94°C, 20s Annealing bei 50°C und 2min Elongation bei 60°C. Mit den in Tabelle 9 (Anhang) aufgeführten Primern wurden so die gesamten Virulenzgene ausgewählter Isolate (abhängig vom Gen zwischen 19 und 44 Isolate) mit Hilfe überlappender Sequenzierungsreaktionen analysiert.

2.3.1.1 Variationen im katalytischen Zentrum der *rgp*-Gene

Um eventuell vorhandene Variationen im katalytischen Zentrum der *rgp*-Gene zu identifizieren, wurde neben der kompletten Sequenzierung ausgewählter Isolate eine weitere Sequenzierung mit allen in dieser Studie involvierten Isolaten durchgeführt. Mit Hilfe des Primerpaares Seq 1 und Seq IV wurde hierfür ein ca. 2 kb großes Produkt amplifiziert und anschließend mit dem Primer Seq 5 sequenziert, um die Nukleinsäurepolymorphismen an den Positionen nt 1527, 1534, 1542 und 1679, (bezogen auf den codierenden Bereich der Referenzsequenz) zu identifizieren.

2.3.1.2 Identifizierung der *kgp*-Hämagglutininvarianten

Die Analyse der verschiedenen *kgp*-Hämagglutininvarianten erfolgte analog der unter 2.3.1.1. aufgeführten Analyse der katalytischen Zentren der *rgp*-Gene. Mit Hilfe der Primer *kgp*-F4 und *kgp*-en12 wurde ein Produkt amplifiziert, von dem dann mit Hilfe der Primer *kgp*-F42 und *kgp*-R81 ein ca. 1000 bp großes Fragment sequenziert wurde. Die Zuordnung der einzelnen Isolate zu den verschiedenen Hämagglutininvarianten erfolgte mit Hilfe der Blast-Homepage (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) des National Centers for Biotechnology Information (NCBI) und der bekannten Referenzsequenzen. Die Differenzierung der Subtypen AY559244 und AF017059 erfolgte über eine zusätzliche Restriktionsanalyse.

2.3.4 Ethanolfällung

Für die Ethanolfällung wurden zu jedem 20µl Sequenzierungsansatz 14,5µl Wasser gegeben und dieser Ansatz dann in ein 1,5ml Eppendorfgefäß umgefüllt. In einem Master-Mix wurden 62,5µl Ethanol absolut (Roth) und 3µl Natriumacetat (3 M, pH 5,8) gemischt, davon 65,5µl zu jedem Ansatz pipettiert kurz auf dem Vortex-Mixer gerüttelt und 15min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, um die DNA zu fällen. Anschließend wurden die Proben 20min in der Zentrifuge (Biofuge 13, Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 13.000rpm zentrifugiert und der Überstand sofort abgegossen. Die Proben wurden mit 250µl Ethanol (70%) gewaschen und erneut 5 min bei 13.00 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgegossen und die Gefäße anschließend kopfüber auf sauberen Zellstofftücher vorsichtig ausgeklopft, um den verbliebenen Restalkohol ablaufen zu lassen. Die offenen Gefäße wurden bis zur vollständigen Trocknung ins Dunkle gestellt, anschließend bis zum sequenzieren eingefroren oder direkt für die Sequenzierung in 50µl Formamid gelöst und mit dem ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) analysiert.

2.3.5 Auswertung der Sequenzdaten

Die aus den Sequenzierungsläufen resultierenden Chromatogramme wurden mit dem frei verfügbaren Programm Chromas Version 1.43 (<http://www.technelysium.com.au/chromaslite.html>) ausgewertet, Anfang und Ende der Chromatogramme getrimmt und

so für die Online-Analyse vorbereitet. Die Einzelsequenzen wurden mit Hilfe der BLAST-Homepage (s 2.3.1.2) analysiert. Hierfür dienten die in Tabelle 1 aufgeführten Literatursequenzen, die auch schon für das Primerdesign verwendet wurden als Referenzsequenzen. Abweichungen der Nukleotidabfolge im Vergleich zur Referenz wurden notiert und so verschiedene Genotypen identifiziert.

2.4 Identifizierung und Subtypisierung des Genotyps mittels Restriktionsanalyse

Zur Identifizierung einer größeren Menge von Isolaten wurden anhand der erhaltenen Sequenzdaten Restriktionskarten erstellt, mit denen die Zugehörigkeit der Isolate zu den Subtypen der einzelnen Virulenzgene bestimmt wurde. Für die Restriktionsanalyse wurden Produkte ausgewählt, in denen sich Restriktionsschnittstellen befanden, die durch die verschiedenen Genotypen moduliert wurden. So konnte ein bestimmter Genotyp durch ein oder mehrere Restriktionsmuster eindeutig identifiziert werden. Die Restriktionskarten wurden mit Hilfe des NebCutter V2.0, eines Online-Tools der Firma New England Biolabs (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) erstellt.

2.4.1 *fimA*-Subtypisierung

Zur Identifizierung der *fimA*-Genotypen I bis V wurden zunächst spezifische von Amano et al. (4) und Nakagawa et al. (51) entwickelte Primer eingesetzt (Tab. 9). Die weitere Subtypisierung der *fimA*-Typ I und II-Isolate erfolgte über eine *Hpa II*-Restriktion des mit den Primern *fimA-F* und *fimA-R* erhaltenen Produkts. Für die Subtypisierung der *fimA*-Isolate des Typs IV wurde das gleiche Produkt mit dem Restriktionsenzym *Hae III* geschnitten.

2.4.2 *kgp*-Hämagglutinin W83 Feintypisierung

Um die beiden *kgp*-Hämagglutinintypen W83 (AF017059) und W83-Variante (W83var; AY559244) voneinander differenzieren zu können, wurde eine Restriktionsenzymanalyse mit *Hind II* durchgeführt. Während das mit den Primern *kgp-F6* und *kgp-*

R9 erhaltene Amplifikat der W83-Variante keine Restriktionsschnittstelle besitzt, also ungeschnitten bleibt, wird der W83-Typ bei Position nt 1308 des 1878bp großen Amplifikats geschnitten.

2.4.3 *prtT*-Subtypisierung

Die Identifizierung der verschiedenen *prtT*-Subtypen erfolgte mit Hilfe eines 1020 bp großen Produktes, das mit den Primern *prtT*-F11 und *prtT*-R2 erhalten wurde. Dieses Produkt wurde anschließend mit den Restriktionsenzymen *Mse I* und *Hind II* geschnitten.

2.4.4 Differenzierung der *tpr*-Allele

Um eine eindeutige Identifizierung der verschiedenen *tpr*-Allele zu erreichen mussten mehrere Restriktionsenzyme eingesetzt werden. Das mit dem Primerpaar *tpr*-F2 und *tpr*-R2 erhaltene Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Hae III*, *Nla IV* und *Rsa I* geschnitten.

Tab. 2: Verwendete Restriktionsenzyme und –temperaturen zur Differenzierung der mit Hilfe der Sequenzierung ermittelten Subtypen im *fimA*-, *prtT*- und *tpr*-Gen.

Differenzierung der Subtypen	Restriktionsenzym	t [°C]
<i>fimA</i> Typ I ^{555A} , I ^{555C} , II und IIb	<i>Hpa II</i>	37
<i>fimA</i> Typ IVa und IVb	<i>Hae III</i>	37
<i>kgp</i> -W83 und W83var	<i>Hind II</i>	37
<i>prtT</i> Typ A und B	<i>Mse I</i> , <i>Hind II</i>	65, 37
<i>tpr</i> (M, Pg7, 36, 44, 68, 77, 83)	<i>Hae III</i> , <i>Nla IV</i> und <i>Rsa I</i>	37

Die PCR-Produkte wurden analog der Produkt-PCR für die Sequenzierung amplifiziert (siehe 2.3.1.). 17µl des PCR-Produkt wurden mit jeweils 2µl des entsprechenden Restriktionspuffers (10fach, Fermentas) und 1µl des in Tabelle 2 angegebenen Restriktionsenzym (Fermentas) gemischt. Die Ansätze wurden für 3h bei der angegebenen Restriktionstemperatur im Thermocycler inkubiert anschließend für

10min auf 80°C erhitzt und so inaktiviert. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte wie schon beschrieben mit Hilfe 1,8%iger Agarosegele bei 180 V.

2.5 Diversitätsanalysen

2.5.1 Coverage

Die Bestimmung der Coverage (engl. für Abdeckung) ist eine einfache Methode zur Bestimmung der genetischen Diversität (24, 62). Mit dieser Methode kann berechnet werden, wieviel Prozent der Gesamtdiversität mit der Anzahl der untersuchten Isolate erfasst wurden. Die Coverage (C) berechnet sich nach unten stehender Formel, wobei n_1 für die Anzahl der Isolate oder Muster steht, die nur ein einziges Mal auftreten und N für die Gesamtanzahl der untersuchten Isolate.

$$C = \left(1 - \frac{n_1}{N}\right) \times 100$$

Da diese Methode allein auf der Bestimmung des Verhältnisses der Anzahl einzeln auftretender Isolate zur Gesamtanzahl der untersuchten Isolate basiert, kann sie lediglich als Abschätzung angesehen werden.

2.5.2 Rarefaction-Analyse

Der Rarefaction-Analyse liegt ein komplexer Algorithmus zur Erfassung der Diversität zugrunde. Das Prinzip beruht darauf, dass eine Gesamtprobe von n untersuchten Individuen auf eine Teilmenge von m Individuen ausgedünnt (engl. to rarefy) wird und gegen die Anzahl an Spezies, oder allgemein Gruppen, die von den Teilmengen repräsentiert werden, aufgetragen wird. Es werden also Stichproben ohne Rückgabe gezogen und damit eine Interpolation in Richtung der Spezieszahl der Gesamtprobe n durchgeführt.

Mit Hilfe der Rarefaction-Analyse kann, sofern mit der untersuchten Stichprobe eine Sättigung erreicht wurde, die minimale Stichprobengröße abgeschätzt werden, die notwendig ist, um alle Spezies eines Habitats zu erfassen (30).

Die Rarefaction-Analyse wurde eingesetzt, um zu überprüfen, ob die Untersuchung von 108 Isolaten ausreichend war, um die Gesamtdiversität der verschiedenen Kombinationen der Virulenzfaktoren in *P. gingivalis* zu erfassen. Alle hierfür notwendigen Berechnungen wurden mit dem Programm aRarefactWin (<http://www.uga.edu/~strata/software/AnRareReadme.html>) durchgeführt.

2.5.3 Identifizierung der Populationsstruktur

Bakterienspezies mit einer klonalen Populationsstruktur sind durch ein starkes „linkage disequilibrium“ (gekoppeltes Ungleichgewicht) charakterisiert. Dies ist die Folge einer klonal-strukturierten Population mit eingeschränkter Rekombination. Im Gegensatz dazu ist das „linkage equilibrium“ definiert als statistische Unabhängigkeit der Allele aller untersuchten Loci. Das heißt, zwei Genloci befinden sich in einem Gleichgewicht, wenn die Genotypfrequenzen des ersten Genlocus unabhängig von den Genotypfrequenzen des zweiten Locus sind. Ein Ungleichgewicht kann durch verschiedene Faktoren hervorgerufen werden: physikalische Kopplung der Gene, Gendrift und Selektionsdruck. Eine Population, die nicht durch Selektion oder Migration gestört wird, sollte sich im linkage equilibrium oder übersetzt: „verbundenen Gleichgewicht“ befinden, das heißt, alle möglichen Kombinationen der verbundenen Gene sollten mit gleicher Frequenz nachweisbar sein. Rekombinationen verschieben eine Population in Richtung des Gleichgewichts, Selektionsdruck dagegen verschiebt die Zusammensetzung der Population in Richtung Ungleichgewicht.

Mit Hilfe des Programms LIAN 3.1 (<http://adenine.biz.fh-weihenstephan.de/lian/>) wurde die Nullhypothese getestet, dass sich der für *P. gingivalis* getestete Datensatz der fünf verschiedenen Loci im verbundenen Gleichgewicht befindet, das bedeutet, alle Allele der untersuchten Loci statistisch unabhängig voneinander verteilt sind. LIAN 3.1 berechnet einen standardisierten Assoziationsindex (I_A^S), der ein Maß dafür ist, wie hoch der Grad der Kopplung in den erhobenen Multilocusdaten ist. I_A^S ist eine Funktion der Rekombinationsrate und gleich Null, wenn alle Allele sich im verbundenen Gleichgewicht befinden (27, 28).

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchtes *P. gingivalis*-Kollektiv

Im Rahmen dieser Studie wurden 108 aus subgingivalen Plaqueproben isolierte *P. gingivalis* Wildstämme untersucht. Die Plaqueproben wurden von 104 parodontal erkrankten Patienten vor Beginn einer konservativen Parodontitistherapie gewonnen. Bei zwei Patienten konnte eine Mischinfektion mit drei verschiedenen Isolaten nachgewiesen werden.

3.2 Identifizierung der *fimA*-Genotypen

Die Sequenzanalyse von 44 Isolaten ergab folgende Verteilung: 15 Isolate konnten als *fimA* Typ I, 15 als *fimA* Typ II, 2 als *fimA* Typ III, 8 als *fimA* Typ IV und 4 als *fimA* Typ V klassifiziert werden. Interessanterweise wiesen neun der fünfzehn Typ I Isolate im Bereich der Nukleotidpositionen 1077-1080 (Referenzsequenz GCAA) eine Sequenz auf, die identisch mit der des Typs II ist (ATGG, vgl. Tab. 10 im Anhang). Amano et al. (4) haben aber genau in diesem Bereich, in dem viele der untersuchten Typ I und Typ II Isolate identisch sind, einen Primer generiert, der zwischen Typ I und Typ II differenzieren soll (Abb. 1). Darüber hinaus unterschieden sich fünf der neun Typ II-Isolate im Bereich zwischen Nukleotid 493 und 584 von der Typ II-Referenzsequenz. Stattdessen zeichnete sich dieser Bereich durch eine eindeutige Homologie zur Typ I-Referenzsequenz aus (Tab. 11, Anhang). Dieser spezielle Genotyp wurde als *fimA*-Typ IIb benannt. Es zeigte sich weiterhin, dass der *fimA* Typ IV anhand der Sequenzvariationen in zwei Untergruppen, *fimA* Typ IVa und Typ IVb, eingeteilt werden konnte (Tab. 13, Anhang).

Die ursprünglich von Amano et al. (3, 4) beschriebene PCR ermöglicht aufgrund der in den Patientenisolaten identifizierten Sequenzidentität im Bereich der Primerbindestelle einiger *fimA* Typ I und Typ II-Isolate keine ausreichende Differenzierung zwischen diesen Gruppen. Zudem war keine Unterscheidung der beiden *fimA* Typ IV Untergruppen möglich. Die Primer der *fimA* Gruppen Typ III und Typ V reichten im Gegensatz dazu zu einer spezifischen Identifizierung dieses Subtyps aus.

Aus diesem Grund wurde eine Restriktionsanalyse entwickelt, die eine exakte Differenzierung der *fimA*-Isolate des Typs I, II und IV ermöglichte.

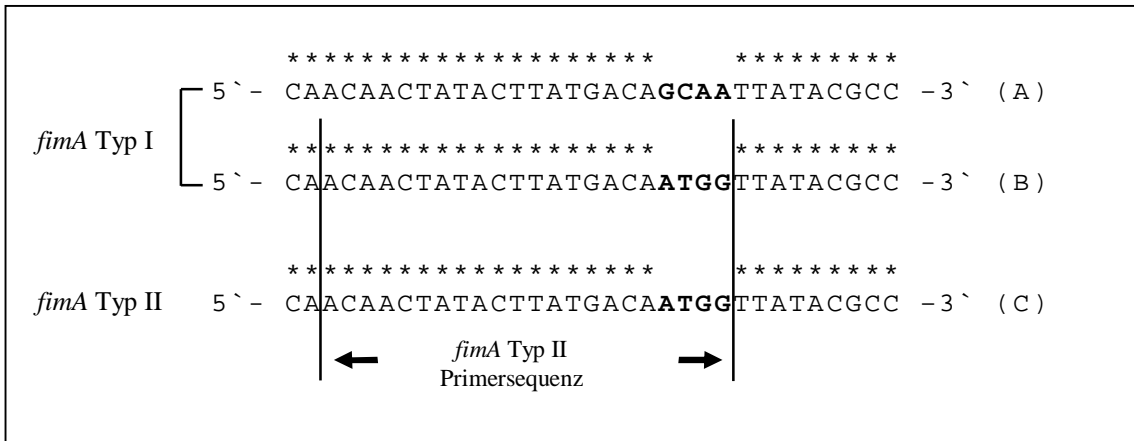


Abb. 1: Sequenz der *fimA*-Genotyp I und II Primerbindestelle. (A) *fimA*-Genotyp I Sequenz analog zur Literatursequenz D17794; (B) In klinischen Isolaten identifizierte *fimA*-Genotyp I Sequenz; (C) *fimA*-Genotyp II Sequenz analog zur Literatursequenz D17797. Sternchen markieren Sequenzidentitäten.

Die Restriktionsanalyse des *fimA*-Genotyps I führte zu einer weiteren Diskriminierung zweier Genotypen, die einerseits ein Restriktionsmuster mit drei Banden der Größen 591 bp, 569 bp und 162 bp erzeugten, dieser Typ wurde als *fimA* Typ I^{555A} bezeichnet, und andererseits zwei Fragmente der Größe 1160 bp und 162 bp (*fimA* Typ I^{555C}) hervorriefen (Abb. 2a, 2b). Die Analyse der Sequenzdaten zeigte, dass eine Transversion an Position nt 555 für die verschiedenen Restriktionsmuster verantwortlich ist (555A→C). Da aus diesem Polymorphismus jedoch lediglich eine neutrale Substitution resultiert (Threonin→Asparagin) scheint eine Unterteilung des *fimA* Typs I in weitere Subtypen nicht gerechtfertigt. Die Restriktion eines *fimA* Typ II Produkts führt zur Entstehung von Fragmenten mit der Größe 528 bp, 422 bp, 159 bp und 153 bp. Der *fimA* Typ IIb bringt aufgrund seiner Homologie zum *fimA* Typ I im Bereich zwischen nt 493 und nt 584, wodurch die normalerweise im *fimA* Typ II vorhandene *Hpa* II-Schnittstelle entfällt und dafür die im Typ I vorliegende eingefügt wird, Fragmente der Größen von 569 bp (analog zu Typ I), 422 bp, 159 bp und 153 bp hervor (Abb. 2a, 2b). Die *Hae* III-Restriktion der *fimA* Typ IV Produkte resultiert, wie in Abb. 2 dargestellt, beim Typ IVa in fünf Fragmenten (712 bp, 255 bp, 180 bp, 117bp und 83 bp), beim Typ IVb in 3 Fragmenten (712 bp, 455 bp und 180 bp).

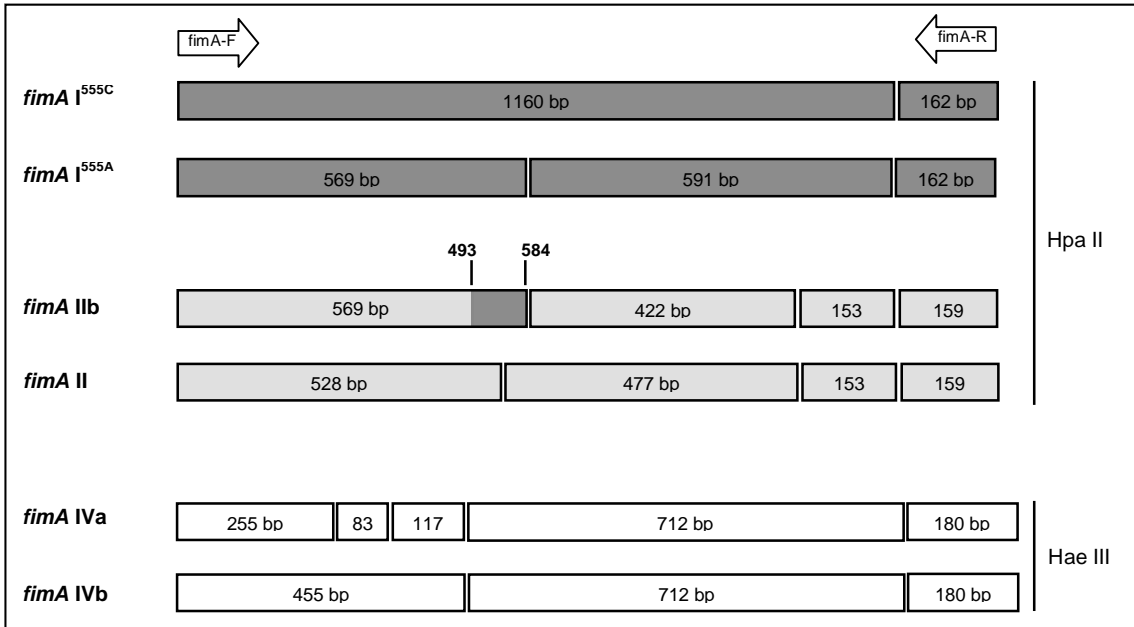


Abb. 2a: Theoretisch ermittelte Restriktionsmuster zur Differenzierung der *fimA*-Genotypen I und II, sowie der Subtypen IIb, IVa und IVb.

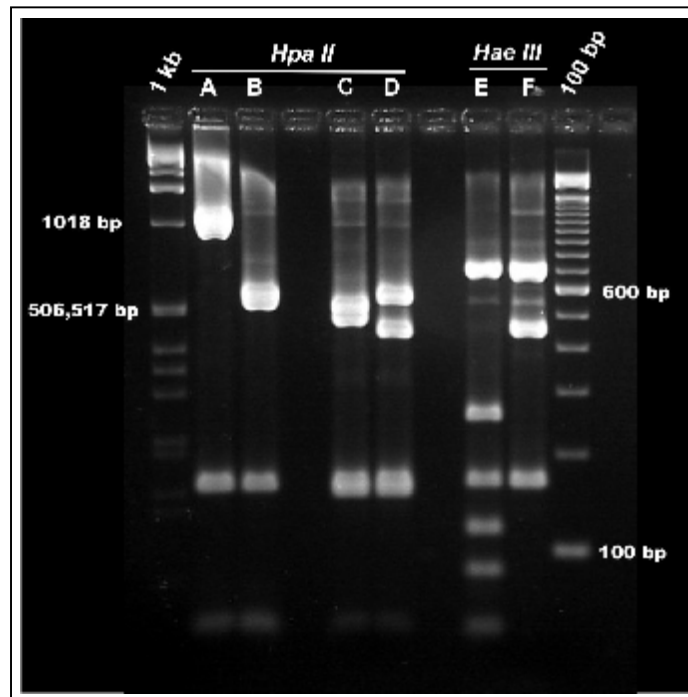


Abb. 2b: Detektion der *fimA* Genotypen durch *HpaII*, bzw. *HaeIII*-Restriktion des PCR-Produktes *fimA-F* -*fimA-R*. A) *fimA* Typ I^{555C}, B) *fimA* Typ I^{555A}, C) *fimA* Typ II, D) *fimA* Typ IIb, E) *fimA* Typ IVa, F) *fimA* Typ IVb. 1 kb, 100 bp: Größenstandards.

Insgesamt konnten so von 108 untersuchten Isolaten 31 dem *fimA* Typ I (28,7%), 40 dem *fimA* Typ II, wovon wiederum 11 Isolate als Subtyp IIb identifiziert wurden, 5 Isolate dem Typ III, 13 dem Typ IVa, 6 dem Typ IVb und vier dem Typ V zugeordnet werden. Bei sieben Isolaten konnte kein Produkt amplifiziert werden, zwei weitere Isolate lieferten Produkte einer abweichenden Größe, die keinem der bekannten *fimA* Typen zugeordnet werden konnte (Tab. 3).

Tab. 3: Prävalenz der verschiedenen *fimA*-Genotypen und ihrer Untergruppen.

FimA-Typ	n	%
Typ I	31	28,70
Typ-II	29	26,85
Typ IIb	11	10,19
Typ-III	5	4,63
Typ-IVa	13	12,04
Typ-IVb	6	5,56
Typ-V	4	3,70
kein Produkt	7	6,48
n. t.	2	1,85

3.3 Sequenzvariationen in *rgpA* und *rgpB*

Die Sequenzanalyse der *rgpA*- und *rgpB*-Gene 23 bzw. 19 klinischer Isolate ergab sehr heterogene Nukleotidsequenzen, die zahlreichen Substitutionen in der daraus abgeleiteten Primärstruktur der Proteine zur Folge haben (44 Austausche bei RgpA und 34 Austausche bei RgpB). Verglichen mit der Referenzsequenz von *rgpA* (Genbank-Nummer: U15282) wurden 26 konservative und 18 nichtkonservative Aminosäureaustausche identifiziert. Beim *rgpB*-Gen (Genbank-Nummer der Referenzsequenz: AF007124) wurden durch die Variationen in der Nukleotidsequenz 18 konservative und 16 nichtkonservative Aminosäureaustausche definiert. Bei einem Vergleich der beiden Gene fällt auf, dass 11 homologe Aminosäureaustausche vorliegen.

Die vier Aminosäureaustausche im katalytischen Zentrum, die für die unterschiedliche Substratspezifität der beiden Gingipaine verantwortlich gemacht werden, liegen an Position 281, 283, 286 und 331 bezogen auf die Aminosäuresequenz

und werden durch Nukleinsäurepolymorphismen an den Positionen 1527, 1534, 1542 und 1679, bezogen auf den codierenden Bereich, hervorgerufen (vgl. Abb. 3).

Während sich im *rgpA*-Gen für die oben aufgeführten Aminosäuren keinerlei Heterogenität feststellen ließ, das heißt alle untersuchten Isolate an diesen vier Positionen mit der Literatursequenz übereinstimmen (281N, 283S, 286S und 331K), konnten beim *rgpB*-Gen fünf verschiedene Genotypen identifiziert werden, die nach den an den entsprechenden Positionen vorliegenden Aminosäuren benannt wurden (NYPN, NSSN, NSSK, NYPK und DYPN). Der Genotyp NYPN konnte in 38 Isolaten identifiziert werden. Zusammen mit den Allelen NSSK, vertreten in 33 Isolaten, und NSSN, in 28 Isolaten nachgewiesen, stellen diese drei Genotypen den Hauptanteil dar (Tab. 4). Die anderen Genotypen, acht Isolate mit der Kombination NYPK und ein Isolat mit der Aminosäurenkombination DYPN sind deutlich seltener vertreten.

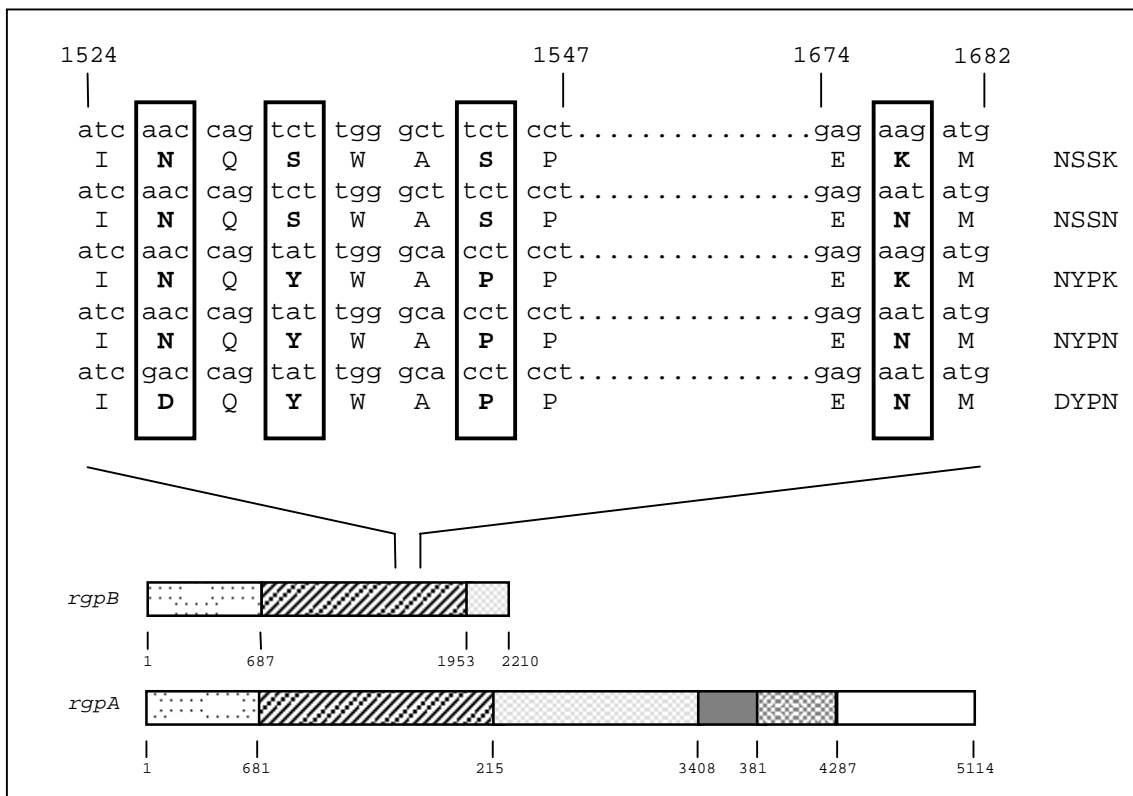


Abb. 3: Nukleotidsequenz von *rgpA* (Reihe I) und die verschiedenen *rgpB*-Genotypen (Reihen I bis V) einschließlich der daraus resultierenden Aminosäuresequenzen im aktiven Zentrum.

Tab. 4: Verteilung und prozentualer Anteil der fünf verschiedenen *rgp B*-Allele im untersuchten *P. gingivalis*-Kollektiv.

Rgp B	n	%
NYPN	38	35,18
NSSK	33	30,55
NSSN	28	25,93
NYPK	8	7,41
DYPN	1	0,93

3.4 *kgp*-Hämagglutininvarianten

Der für den *kgp*-Hämagglutinin codierende Genabschnitt von 22 Isolaten wurde komplett sequenziert. Innerhalb dieser Gruppe konnten die vier schon bekannten Sequenzvarianten identifiziert werden. Darüber hinaus konnte kein neuer Subtyp nachgewiesen werden.

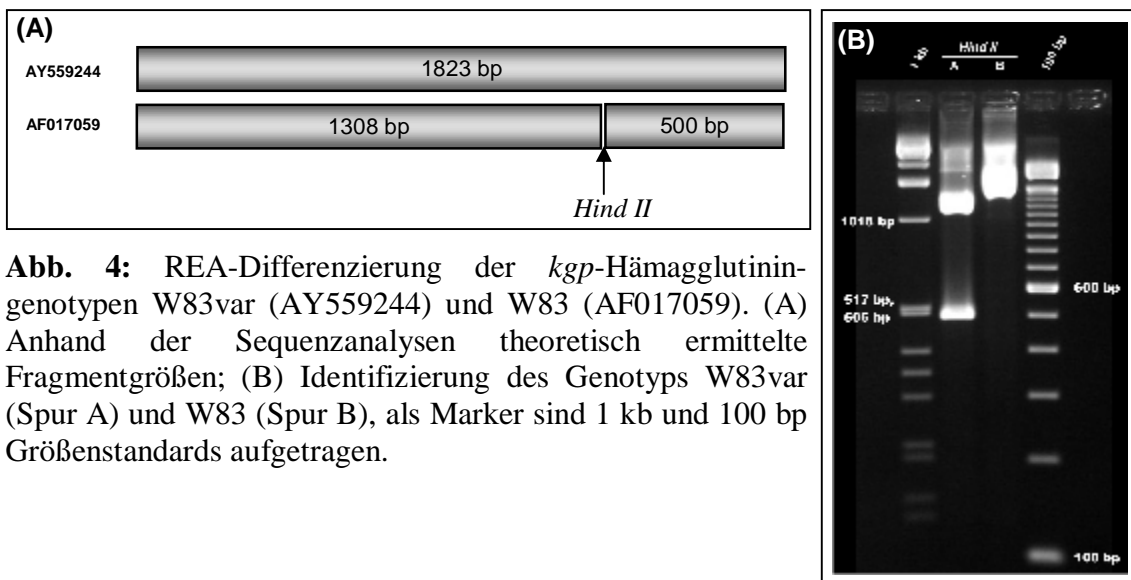


Abb. 4: REA-Differenzierung der *kgp*-Hämagglutinin-Genotypen W83var (AY559244) und W83 (AF017059). (A) Anhand der Sequenzanalysen theoretisch ermittelte Fragmentgrößen; (B) Identifizierung des Genotyps W83var (Spur A) und W83 (Spur B), als Marker sind 1 kb und 100 bp Größenstandards aufgetragen.

Zur Differenzierung zwischen den Genotypen W83 und W83var wurde eine Restriktionsenzymanalyse durchgeführt. Hierfür wird eine *Hind II*-Schnittstelle des *kgp*-Hämtyps W83 benutzt, die aufgrund von Mutationen in der W83-Variante nicht mehr vorliegt (Abb. 4).

Die Restriktionsenzymanalyse (REA) der restlichen Isolate zeigte, dass sich auch in diesem Fall drei Viertel der untersuchten Isolate auf zwei der vier Subtypen aufteilen, das sind der *kgp*-Hämagglutinintyp U68464 (381) mit knapp 40% und der Subtyp AF017059 (W83) mit fast 35%. Die Variante des AF017059 (W83var, AY559244) ist in etwa 10% der Isolate vertreten, der dritte eigenständige Subtyp (U54691, HG66) konnte in knapp 17% der Isolate nachgewiesen werden (Tab. 5).

Tab. 5: Prävalenz der identifizierten *kgp*-Hämagglutininvarianten in *P. gingivalis* Wildstämmen.

<i>kgp</i> -Häm-Typ		n	%
<i>kgp</i> -Häm U68464	381	43	39,81
<i>kgp</i> -Häm AF017059	W83	37	34,26
<i>kgp</i> -Häm AY559244	W83 var	10	9,26
<i>kgp</i> -Häm U54691	HG66	18	16,67

3.5 *prtT*-Polymorphismen

Die Sequenzierung des *prtT*-Gens von 24 Isolaten zeigte, dass im katalytischen Teil des Gens (237-597 bp) keine Zuordnung zu verschiedenen Subtypen möglich ist. Einzelne Nukleinsäuresubstitutionen treten in diesem Sequenzabschnitt scheinbar willkürlich auf, lassen jedoch kein Muster erkennen (Tab. 18, Anhang). Anders im Hämagglutininanteil, dort sind anhand der Sequenzierungsergebnisse deutlich zwei verschiedene Varianten zu erkennen. Während die Variante A verglichen mit der Literatursequenz (S 75942) im Bereich zwischen Nukleotid 1485 und 1587 hoch konserviert ist, dort kommt es lediglich zu einem einzelnen Nukleinsäureaustausch bei einem einzelnen Isolat, weicht die Variante B in diesem Bereich stark von der Literaturvorgabe ab. Dort sind innerhalb dieses 102 bp langen Genabschnittes 32 Austausche zu verzeichnen (Tab. 18, Anhang). Die Abweichungen in diesem Bereich führen im *prtT* Typ B zum Verlust einer *MseI*-Restriktionsschnittstelle beziehungsweise lassen eine *HindIII*-Restriktionsschnittstelle entstehen, was für die Typisierung der weiteren Isolate genutzt wurde (Abb. 5a, 5b).

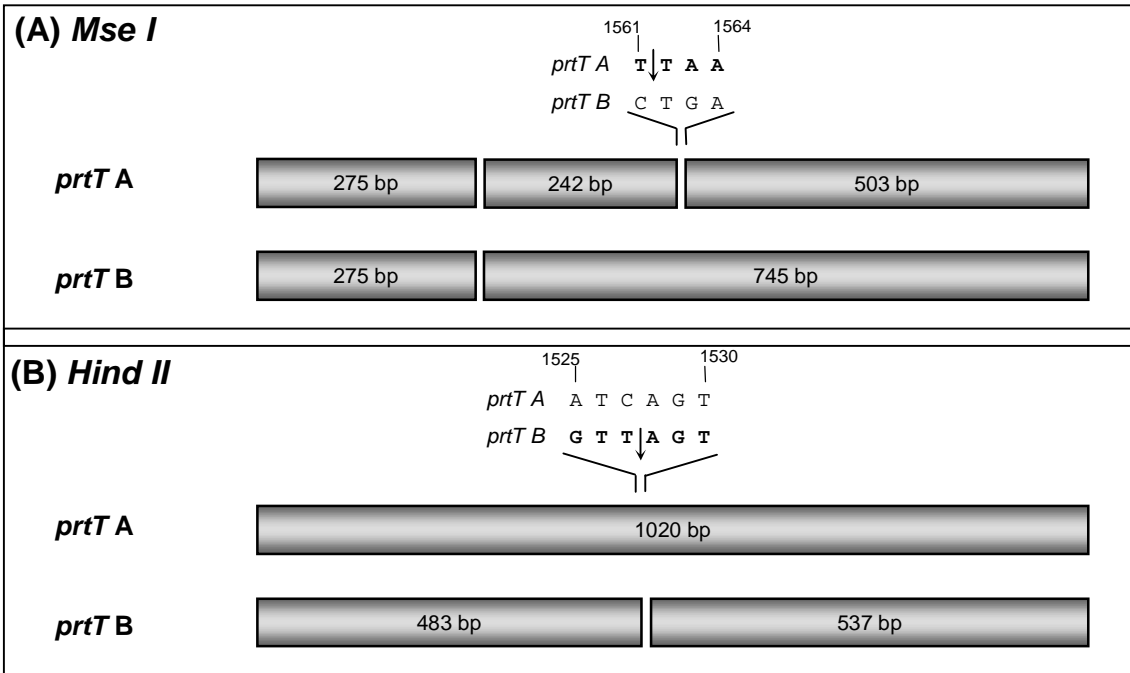


Abb. 5a: Restriktionsschnittstellen zur Differenzierung zwischen den beiden *prtT*-Varianten A und B. Die abweichende Sequenz im Bereich zwischen nt 1485 und nt 1587 führt zum Verlust einer *MseI*-Schnittstelle (A) bzw. zur Neuentstehung einer *HindII*-Schnittstelle (B) in der Variante B.

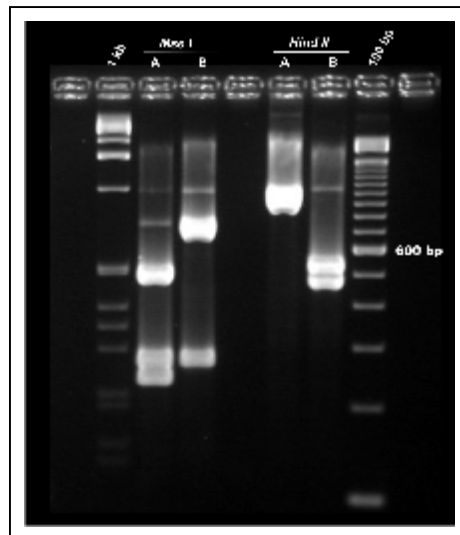


Abb. 5b: *MseI*- und *Hind II*-Restriktionsmuster zur Differenzierung der *prtT*-Genotypen A und B. 1 kb, 100 bp: Molekulargewichtsstandards.

Von den 108 untersuchten *P. gingivalis*-Isolaten entsprechen über 86 % (93 Isolate) der Referenzsequenz, die restlichen 15 Isolate und somit knapp 14% konnten jedoch eindeutig der neu identifizierten Variante B zugeordnet werden (Tab. 6).

Tab. 6: Prävalenz der verschiedenen *tpr*-Varianten im vor Therapie erhaltenen *P. gingivalis* Kollektiv.

Tpr-Typ	n	%
Typ A	93	86,11
Typ B	15	13,89

3.6 Mutationen im *tpr*-Gen

Die Sequenzierung 23 klinischer Isolate resultierte in der Identifizierung von sieben verschiedenen Subtypen. Die einzelnen Vertreter innerhalb der Gruppen unterscheiden sich nur durch ganz vereinzelt auftretende Nukleinsäureaustausche (vgl. Tab. 19, Anhang). Anhand der Sequenzierungsergebnisse wurden Restriktionskarten für die Untersuchung der weiteren Isolate erstellt. Um eine eindeutige Unterscheidung der einzelnen Subtypen zu erreichen, waren dabei Restriktionen mit mehreren Enzymen notwendig (Abb. 6a, 6b).

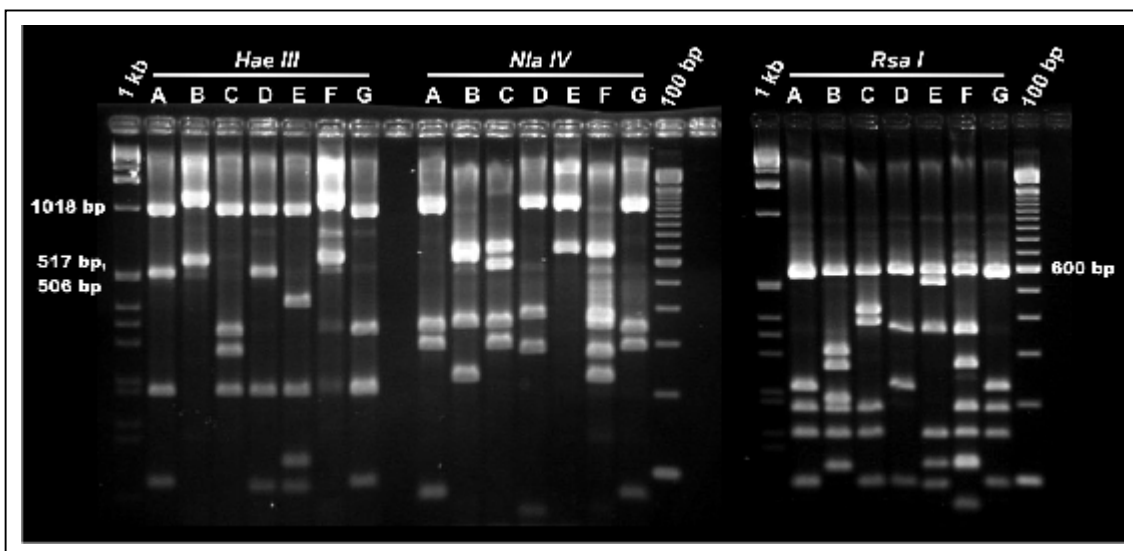


Abb. 6a: Differenzierung der *tpr*-Subtypen mittels Restriktionsanalyse; (A) Typ M84471, (B) Typ Pg7, (C) Typ Pg36, (D) Typ Pg44, (E) Typ Pg68, (F) Typ Pg77, (G) Typ Pg83; 1kb, 100 bp: Molekulargewichtsstandards.

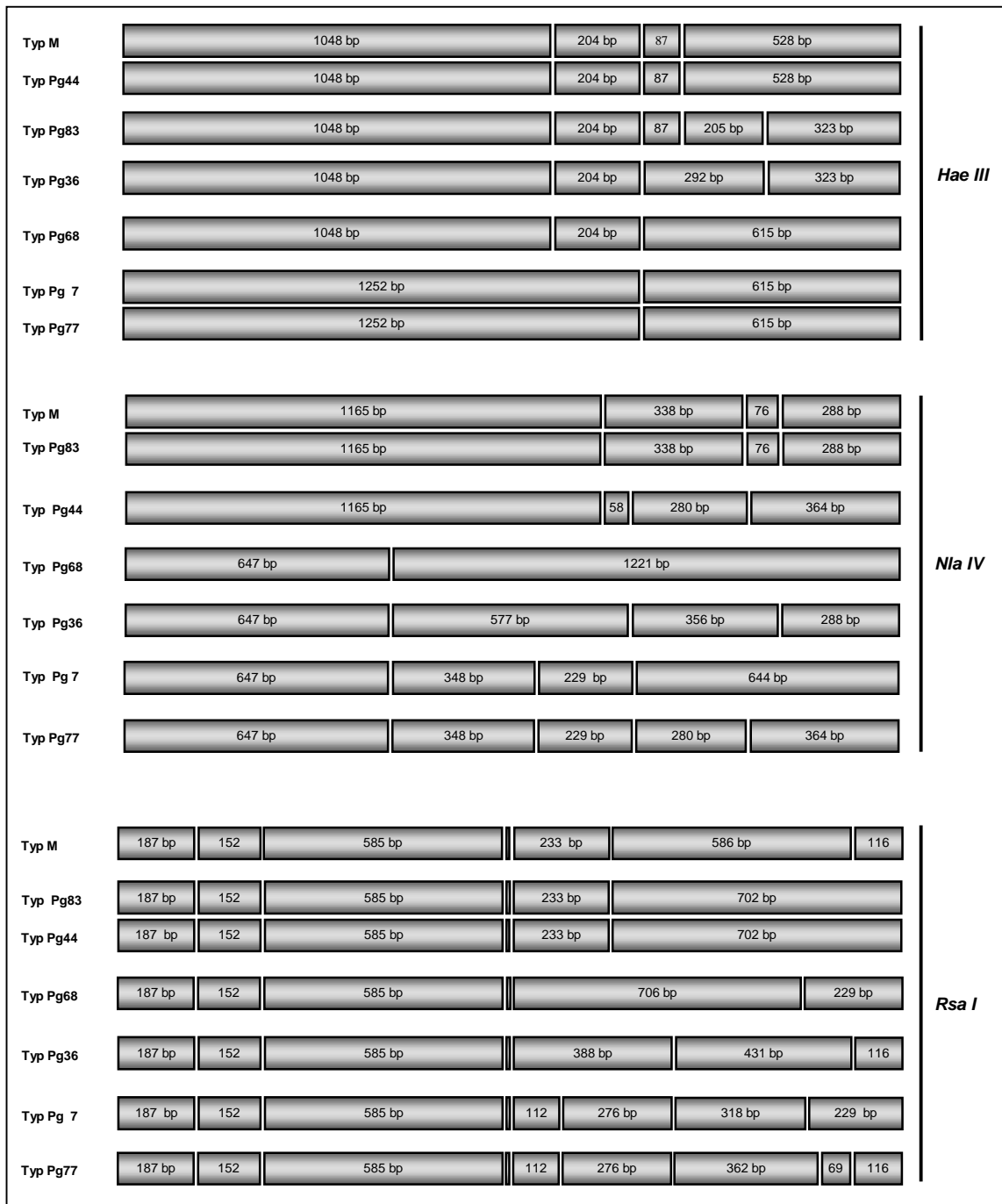


Abb. 6b: Anhand der Sequenzierung ermittelte Restriktionsschnittmuster der verschiedenen *tpr*-Subtypen bei Einsatz der Restriktionsenzyme *HaeIII*, *NlaIV* und *RsaI*.

Die Untersuchungsergebnisse der 108 Isolate zeigen auch hier, dass circa drei Viertel der Isolate durch drei der sieben Genotypen abgedeckt werden: Typ M mit etwas über 35%, Typ P7 mit 25% und Typ P36 mit knapp 17%. Die weiteren Genotypen stellen nur

einen geringeren Teil am Gesamtaufkommen, so konnte Typ P77 in 9 Isolaten (8,33%), Typ P44 in 8 Isolaten (7,41%), Typ P68 in 5 Isolaten (4,63%) und Typ P83 in 2 Isolaten (1,85%) nachgewiesen werden (Tab. 7). Eines der 108 Isolate konnte mit Hilfe der Restriktionsanalyse keiner der anderen Gruppen zugeordnet werden.

Tab. 7: Absolute und prozentuale Verteilung der verschiedenen *tpr*-Genotypen.

Tpr-Typ	n	%
M	38	35,19
P7	27	25,00
P36	18	16,67
P77	9	8,33
P44	8	7,41
P68	5	4,63
P83	2	1,85
n. t.	1	0,93

n. t. not typeable

3.7 Intraspezifische Diversität

Im Rahmen dieser Studie wurden sechs verschiedene Virulenzgene untersucht. Fünf der sechs Gene konnten eindeutig in verschiedene Subtypen unterteilt werden. Dabei konnten abhängig vom Gen zwischen 2 (*priT*) und 7 (*tpr*, *fimA*) Allele pro Gen nachgewiesen werden. Werden die Virulenzfaktoren eines einzelnen Isolats als Kopplungsgruppe angesehen, kann eine Einteilung der untersuchten Isolate nach der Zugehörigkeit zu einem spezifischen Genotyp durchgeführt werden. Obwohl bei den untersuchten Genen einzelne Allele deutlich häufiger vertreten waren, konnte interessanterweise bei vielen Isolaten eine einzigartige Kombination der verschiedenen Virulenzfaktoren nachgewiesen werden. So ergab die Untersuchung der 108 verschiedenen Patientenisolate 82 voneinander abweichende Kombinationen, von denen 63 lediglich in einem einzigen Isolat identifiziert, 14 in je 2 Isolaten nachgewiesen wurden, 4 Kombinationen in drei verschiedenen Patientenisolaten und lediglich eine Gruppierung in fünf untersuchten Isolaten vertreten waren (Tab. 8).

Tab. 8: Identifizierte Sequenztypen und Allelnummern der untersuchten *P. gingivalis* Isolate. Darüber hinaus ist die Anzahl (n) der Isolate angegeben, bei denen ein identischer Genotyp nachgewiesen wurde.

Geno- typ	<i>fimA</i>		<i>tpr</i>		<i>prtT</i>		<i>kgp-Häm</i>		<i>rgpB</i>		n
	Subtyp	Allel-Nr.	Subtyp	Allel-Nr.	Subtyp	Allel-Nr.	Subtyp	Allel-Nr.	Subtyp	Allel-Nr.	
1	4a	3	P7	3	A	2	U68468	4	NSSK	4	5
2	1	10	M	8	A	2	U68468	4	NSSN	3	3
3	1	10	M	8	A	2	U54691	1	NYPN	1	3
4	1	10	P36	6	B	1	U54691	1	NSSK	4	3
5	2	9	M	8	A	2	U68468	4	NYPN	1	3
6	1	10	M	8	A	2	AF017059	3	NSSN	3	2
7	1	10	M	8	A	2	AY559244	2	NSSK	4	2
8	1	10	P36	6	A	2	U68468	4	NYPN	1	2
9	1	10	P7	3	A	2	AF017059	3	NSSK	4	2
10	2	9	P36	6	A	2	U68468	4	NYPN	1	2
11	2	9	P7	3	A	2	AF017059	3	NSSN	3	2
12	2	9	P7	3	A	2	AF017059	3	NYPN	1	2
13	2	9	P77	2	A	2	AF017059	3	NYPN	1	2
14	5	7	P44	5	A	2	U68468	4	NSSK	4	2
15	2-1	6	P36	6	A	2	U68468	4	NYPN	1	2
16	4b	2	M	8	A	2	AF017059	3	NSSK	4	2
17	4b	2	P77	2	A	2	U68468	4	NSSK	4	2
18	kein Produkt	1	M	8	A	2	U54691	1	NYPN	1	2
19	kein Produkt	1	P7	3	A	2	AF017059	3	NYPN	1	2
20	1	10	M	8	A	2	AF017059	3	NSSK	4	1
21	1	10	M	8	A	2	AY559244	2	NSSN	3	1
22	1	10	M	8	A	2	U54691	1	NSSK	4	1
23	1	10	P36	6	A	2	U68468	4	NSSN	3	1
24	1	10	P36	6	A	2	U68468	4	NYPK	2	1
25	1	10	P36	6	A	2	AF017059	3	NSSN	3	1
26	1	10	P36	6	A	2	AF017059	3	NYPN	1	1
27	1	10	P36	6	A	2	U54691	1	NYPN	1	1
28	1	10	P44	5	A	2	U54691	1	NYPK	2	1
29	1	10	P44	5	B	1	U68468	4	NYPN	1	1
30	1	10	P7	3	A	2	U68468	4	NSSK	4	1
31	1	10	P7	3	A	2	U68468	4	NSSN	3	1
32	1	10	P7	3	B	1	U68468	4	NSSN	3	1
33	1	10	P83	1	A	2	AF017059	3	NYPN	1	1
34	2	9	M	8	A	2	U68468	4	NYPK	2	1
35	2	9	M	8	A	2	AF017059	3	NSSK	4	1
36	2	9	M	8	A	2	AF017059	3	NSSN	3	1
37	2	9	M	8	A	2	AF017059	3	NYPN	1	1
38	2	9	M	8	A	2	AY559244	2	NSSN	3	1
39	2	9	M	8	A	2	AY559244	2	NYPN	1	1
40	2	9	M	8	A	2	U54691	1	NSSN	3	1
41	2	9	M	8	A	2	U54691	1	NYPK	2	1
42	2	9	M	8	B	1	U68468	4	NSSK	4	1
43	2	9	M	8	B	1	AF017059	3	NSSN	3	1
44	2	9	P44	5	A	2	U68468	4	NYPN	1	1
45	2	9	P68	4	A	2	U68468	4	NSSN	3	1
46	2	9	P68	4	B	1	U68468	4	NYPN	1	1
47	2	9	P7	3	A	2	AF017059	3	NSSK	4	1
48	2	9	P7	3	A	2	AF017059	3	NYPN	1	1
49	2	9	P7	3	A	2	AY559244	2	NYPN	1	1
50	2	9	P7	3	B	1	U54691	1	NYPN	1	1
51	2	9	P7	3	B	1	U54691	1	NYPK	2	1
52	3	8	M+Insert	7	A	2	AF017059	3	NSSK	4	1

Geno- typ	<i>fimA</i>		<i>tpr</i>		<i>prtT</i>		<i>kgp-Häm</i>		<i>rgpB</i>		n
	Subtyp	Allel-Nr.	Subtyp	Allel-Nr.	Subtyp	Allel-Nr.	Subtyp	Allel-Nr.	Subtyp	Allel-Nr.	
53	3	8	P44	5	A	2	U68468	4	NYPN	1	1
54	3	8	P7	3	A	2	U68468	4	DYPN	5	1
55	3	8	P7	3	A	2	AF017059	3	NSSN	3	1
56	3	8	P77	2	A	2	AF017059	3	NSSK	4	1
57	5	7	M	8	A	2	AF017059	3	NSSN	3	1
58	5	7	M	8	B	1	AF017059	3	NSSN	3	1
59	2-1	6	P36	6	A	2	U68468	4	NSSN	3	1
60	2-1	6	P36	6	B	1	U54691	1	NSSN	3	1
61	2-1	6	P44	5	B	1	AY559244	2	NYPK	2	1
62	2-1	6	P68	4	A	2	AF017059	3	NSSK	4	1
63	2-1	6	P7	3	B	1	AF017059	3	NSSN	3	1
64	2-1	6	P7	3	B	1	U54691	1	NSSN	3	1
65	2-1	6	P77	2	A	2	AF017059	3	NYPK	2	1
66	2-1	6	P77	2	A	2	AF017059	3	NYPN	1	1
67	2-1	6	P83	1	A	2	AY559244	2	NYPK	2	1
68	2(abw. Subt.)	5	M	8	A	2	AF017059	3	NSSK	4	1
69	4 (größ. Prod.)	4	P77	2	A	2	AF017059	3	NSSK	4	1
70	4a	3	M	8	A	2	U68468	4	NSSN	3	1
71	4a	3	M	8	A	2	U68468	4	NYPN	1	1
72	4a	3	M	8	A	2	AY559244	2	NSSN	3	1
73	4a	3	M	8	A	2	U54691	1	NYPN	1	1
74	4a	3	P44	5	A	2	AY559244	2	NSSN	3	1
75	4a	3	P68	4	A	2	U68468	4	NSSK	4	1
76	4a	3	P68	4	A	2	AF017059	3	NSSK	4	1
77	4a	3	P7	3	A	2	U68468	4	NYPN	1	1
78	4b	2	P36	6	A	2	U68468	4	NYPN	1	1
79	4b	2	P77	2	A	2	AF017059	3	NSSK	4	1
80	kein Produkt	1	M	8	A	2	U68468	4	NYPN	1	1
81	kein Produkt	1	P36	6	A	2	U68468	4	NSSN	3	1
82	kein Produkt	1	P7	3	A	2	U68468	4	NSSK	4	1

3.7.1 Coverage

Von den 108 untersuchten Isolaten konnten 63 Kombinationen in nur jeweils einem Isolat nachgewiesen werden. Mit diesen Werten berechnet sich die „Coverage“ und somit der erfasste Anteil der Gesamtdiversität zu 41,67%. Theoretisch müssten demnach, um die gesamte intraspezifische Diversität der im Rahmen dieser Studie untersuchten Virulenzgene analysieren zu können, mindestens zweieinhalb mal so viele Bakterienstämme, also ca. 250 Patientenisolate, untersucht werden.

3.7.2 Rarefaction-Diversitätsanalyse

Die Untersuchung von 108 Patientenisolaten lieferte 82 verschiedene Kombinationen der identifizierten Genotypen, die in unterschiedlicher Häufigkeit vertreten waren. Die auf dieser Basis berechnete Rarefaction-Kurve zeigt zwar eine Abflachung von einer Vergleichsgeraden mit linearem Anstieg (Steigung der Geraden beträgt 1), ist jedoch noch weit davon entfernt eine Sättigung zu erreichen (Abb. 7). Dies ist ein Zeichen dafür, dass die intraspezifische Diversität der untersuchten Virulenzgene in den *P. gingivalis*-Patientenisolaten nur unvollkommen erfasst wurde und die Untersuchung weiterer Isolate noch neue Kombinationen der verschiedenen Genotypen hervorbringen würde, was sich auch durch die Berechnung der „Coverage“ abzeichnete.

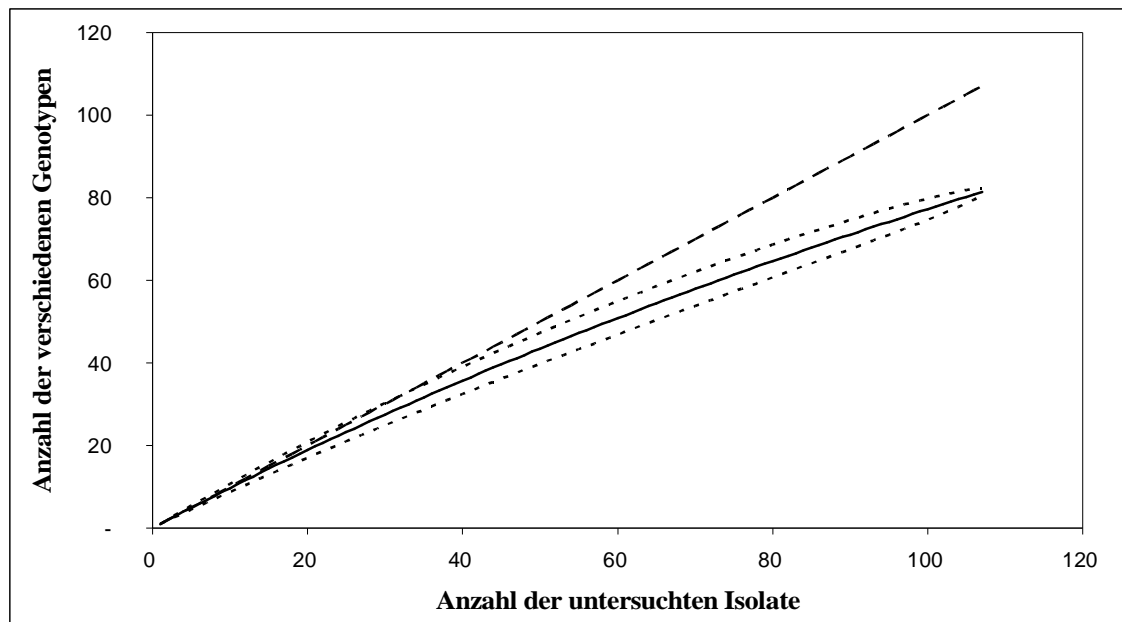


Abb. 7: Rarefaction-Diagramm der interpolierten Anzahl verschiedener *P. gingivalis*-Genotypen gegen die Anzahl der insgesamt untersuchten Isolate (—). 95 % Konfidenzintervalle sind eingezeichnet (···). Zur Orientierung wurde eine Gerade mit der Steigung $m = 1$ (---) hinzugefügt.

3.7.3 Standardisierter Assoziationsindex (I_A^S)

Für die Berechnung des standardisierten Assoziationsindexes wurde jedes neue Allel mit einer fortlaufenden Nummer beziffert. Dabei wurden auch die Sequenzen mit abweichenden Mustern, wie z. B. bei den *fimA*-Untersuchungen identifiziert, als

selbständige Allele gewertet. Somit ergeben sich für *fimA* 10 Allele, *tpr* 8 Allele, *rgpB* 5 Allele, *kgp*-Häm 4 Allele und *priT* 2 Allele (Tab. 8).

Mit Hilfe des Programmes LIAN, wurde eine durchschnittliche genetische Diversität der untersuchten Gene von $0,666 \pm 0,101$ ermittelt. Der standardisierte Assoziationsindex berechnet sich mit diesen Daten zu $I_A^S = 0,0079$ und weicht damit nur geringfügig von Null ab. Die beobachtete Varianz unterscheidet sich nicht signifikant von der erwarteten Varianz (p-Wert: 0,1565), es besteht also kein Widerspruch gegen die ursprünglich angenommene Nullhypothese, die besagt, dass sich alle untersuchten Gene im „linkage equilibrium“ befinden. Der standardisierte Assoziationsindex der untersuchten Isolate liegt sehr nah an Null und ist damit ein Hinweis auf häufige Rekombinationen innerhalb der untersuchten Population. Dies wiederum bedeutet, dass die Verteilung der Allele eines untersuchten Gens nahezu unabhängig von den anderen Genen erfolgt.

4 Diskussion

Die Progressionsrate einer parodontalen Erkrankung weist eine große intraindividuelle Variabilität auf. Der durchschnittliche jährliche Attachmentverlust kann mathematisch durch eine Gauss'sche Normalverteilung beschrieben werden (6, 7). Diese Verteilung ist verantwortlich für die Prävalenz der unterschiedlichen Krankheitsbilder. Epidemiologische Daten zeigen, dass bei einem Großteil der Erwachsenen ein leichter bis mittlerer lokaler Attachmentverlust in der Mundhöhle nachweisbar ist (13, 63). Daneben gibt es aber einen kleineren Teil der Bevölkerung, von etwa 10 bis 15%, die unter einer schweren Verlaufsform der Parodontitis leiden (1). Die deutlichen Unterschiede der Progression und des Schweregrades einer Parodontitis konnten unter anderem auf Variabilitäten in der Virulenz der parodontalpathogenen Erreger zurückgeführt werden.

Im Rahmen dieser Studie wurde erstmals die Verteilung der *fimA*-Genotypen in der europäischen Bevölkerung untersucht. Studien im asiatischen Kulturkreis deuten an, dass spezifische klonale Variationen der *P. gingivalis* Fimbrien mit der Entstehung einer Parodontitis assoziiert sind, wohingegen andere Subtypen weniger virulent erscheinen (3). Die Ergebnisse dieser Studie untermauern die vorhandenen Ergebnisse, die zeigen, dass *fimA* Typ II und Typ IV mit hoher Prävalenz bei Parodontitispatienten vertreten sind. Jedoch konnte der *fimA* Typ I mit einer höheren Frequenz detektiert werden als im asiatischen Kulturkreis. Dieses Ergebnis wurde zunächst darauf zurückgeführt, dass die von Amano et al. beschriebene PCR nicht korrekt zwischen *fimA* Typ I und *fimA* Typ II differenzieren konnte, da einige *fimA* Typ I-Isolate eine Sequenzabfolge aufwiesen, die identisch mit der Primerbindestelle des Typ II ist und somit falsch positive Ergebnisse mit der *fimA* Typ II spezifischen PCR ergaben. Jedoch ist auch der *fimA* Typ I-Anteil in einer späteren Studie in welcher der *fimA* Typ I mit der „falschen“ Primerbindestelle als Typ Ib identifiziert und die falsch positiven Ergebnisse über eine neue Nachweismethode ausgeschlossen wurde (52) immer noch deutlich geringer als der in unserem Kollektiv ermittelte Anteil. Nakagawa et al., postulieren für den *fimA* Typ Ib eine Assoziation mit einer parodontalen Erkrankung, wohingegen der Typ I als weniger virulent eingestuft wird. Anhand unserer Sequenzdaten erscheint

diese Unterteilung fragwürdig, da sich die untersuchten Isolate vom Typ Ib lediglich im Bereich der Primerbindestelle durchgängig von den anderen Isolaten abheben. Alle anderen Nukleinsäuresubstitutionen im Vergleich zur Literatursequenz sind sowohl bei den Isolaten des Typs I als auch bei denen des Typs Ib gleichermaßen wieder zu finden.

Mit Hilfe rekombinanter FimA-Proteine konnte eindeutig gezeigt werden, dass sich vor allem der Fimbriotyp II funktionell von den anderen abhebt. Fim A Typ II zeigte eine größere Bindungsaffinität, ermöglicht die Invasion in Epithelzellen mit einer deutlich höheren Frequenz als andere Fimbriotypen und wird darum als virulenter eingestuft, als andere *fimA*-Genotypen (5). Dies könnte auch die hohe Prävalenz erklären, mit dem der *fimA* Typ II im Patientenkollektiv identifiziert werden konnte.

Die häufige Koexistenz verschiedener *fimA*-Subtypen innerhalb eines Individuums, wie von Amano et al., beschrieben, konnte in unserem Kollektiv und mit der neuen Nachweismethode nicht bestätigt werden. Lediglich bei zwei von insgesamt 104 untersuchten Patienten konnte eine Kolonisation mit *P. gingivalis*-Isolaten verschiedener Fimbriotypen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis stimmt auch mit vorherigen Untersuchungen überein, die zeigen konnten, dass die intraindividuelle Heterogenität von *P. gingivalis* auf einen oder maximal zwei Klone beschränkt ist (41, 68).

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die proteolytischen Enzyme der Bakterien eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Parodontitis spielen (31, 38). So weisen zum Beispiel Nullmutanten für die *rgp*-Gene von *P. gingivalis* eine deutlich verringerte Virulenz in *in vivo*-Modellen auf (22). Im Rahmen dieser Studie sollte überprüft werden, ob es unterschiedlich virulente Allele der Arg-Gingipaine in *P. gingivalis* gibt. Ally et al., (2) konnten nachweisen, dass RgpB eine schlechtere Affinität für die Substrate aufweist, als RgpA. Da die katalytischen Domänen von RgpB und HRgpA (RgpA_{cat}) nahezu identisch bezüglich ihrer Primärstruktur sind, wurden die Unterschiede in der Substratspezifität zunächst der zusätzlichen Hämagglutinin-/Adhäsindomäne im RgpA zugeschrieben. Diese Hypothese konnte durch Untersuchungen der Substratspezifität von RgpA_{cat}, der katalytischen Domäne von RgpA widerlegt werden. RgpA_{cat} wies bei verschiedenen Substraten die gleiche Spaltungskinetik auf wie HRgpA und unterschied sich deutlich von der Enzymkinetik

des RgpB. Untersuchungen der Nukleinsäurestruktur führten dies auf vier abweichende Aminosäuren im katalytischen Zentrum des RgpB zurück. Diese Substitutionen könnten die Affinität zwischen Substrat und Bindestelle verändern oder sogar Abweichungen in der Konformation der Substratbindestelle hervorrufen. Besonders hervorzuheben ist hierbei die Substitution P286S, die zur Aufhebung eines Prolinmotivs (P285, P286) am Ende der Helix 9 im RgpB führt und damit die Erreichbarkeit der S_1 Tasche für das Substrat verändern würde (2). Die Sequenzanalyse von 23 klinischen Isolaten lieferte für das *rgpA*-Gen lediglich einen Genotyp (D281, Y283, P286, N331), bei dem keine der vier fraglichen Aminosäuren im katalytischen Zentrum ausgetauscht ist. Außerdem wiesen auch die flankierenden Bereiche eine homogenere Nukleotidsequenz auf als beim *rgpB*-Gen, ein Hinweis darauf, dass *rgpA* stärker konserviert zu sein scheint als *rgpB*. In Übereinstimmung mit diesem Resultat lieferte die Untersuchung des *rgpB*-Gens in klinischen Isolaten nicht nur die von Ally et al. identifizierten Substitutionen (NSSK), sondern auch noch vier weitere Allele. Wie auch schon bei der Prävalenz der anderen Virulenzgene gesehen, werden einige Genotypen in Parodontitispatienten häufiger nachgewiesen als andere. In diesem Genlocus die *rgpB*-Allele NYPN, NSSK und NSSN. Dies könnte zunächst ein Hinweis auf eine bessere Adaptation dieser Genotypen an die Umweltbedingungen sein. In etwa 45% der untersuchten Isolate konnte der für die Struktur des katalytischen Zentrums wichtige Prolinrest identifiziert werden, in 55% der Isolate war dieser durch einen Serinrest ersetzt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung könnten wichtig für die Entwicklung alternativer Therapiestrategien sein. Im Mausmodell konnte die Immunisierung gegen RgpA vor Knochenabbau schützen, Immunisierung gegen RgpB dagegen nicht (23). Dies könnte durch eine Infektion mit einem *P. gingivalis*-Stamm hervorgerufen worden sein, der ein strukturell anderes RgpB-Protein produziert, als das für die Immunisierung verwendete. Die Existenz der verschiedenen *rgpB*-Genotypen und die daraus resultierenden verschiedenen RgpB-Proteine könnten die Effektivität der Immunisierung oder den Einsatz eines RgpB-Inhibitors drastisch verändern. Diese Ergebnisse veranschaulichen, wie wichtig die Identifizierung der verschiedenen Allele und der damit verbundenen möglichen unterschiedlichen Funktionen für das Verständnis der Pathogenese der *P. gingivalis* assoziierten Parodontitis ist.

Basierend auf der Heterogenität des *kgp*-Hämagglutinins von *P. gingivalis* konnten vier verschiedene Biotypen identifiziert werden. Lediglich bei einem von 104 untersuchten Patienten konnte eine Mischinfektion mit zwei verschiedenen *kgp*-Hämagglutinintypen festgestellt werden. Die Prävalenzen mit denen die vier unterschiedlichen Allele nachgewiesen werden konnten unterscheiden sich nicht signifikant von der durch Nadkarni et al. (50) identifizierten Verteilung ($p > 0,05$). In beiden Studien wurde der Typ 381 mit der größten Häufigkeit nachgewiesen, gefolgt von W83 und HG66 mit leicht abweichender Verteilung. Die Variante des W83 ist in beiden Studien mit dem geringsten Anteil nachgewiesen worden.

Die verschiedenen Allele des *kgp*-Gens könnten relevant für die Virulenz der *P. gingivalis*-Stämme sein. So konnte die Bedeutung des Kgp für die Häm-Aufnahme durch Untersuchungen von *kgp*-Deletionsmutanten gezeigt werden, die im Vergleich zum Wildtyp nur schwach pigmentiert sind (64). Dieses Phänomen könnte in Zusammenhang mit der Abgabe eines 50 kDa Gingipain-Hämagglutinkomplexes in das Umgebungsmedium durch den Stamm HG66 stehen, der bei Kultivierung auf Blutagar ebenfalls eine schwache Pigmentierung aufweist, wohingegen der stark pigmentierte Stamm 381 die Kgp-Komplexe primär an der Zelloberfläche zurückhält (61). Darüber hinaus besitzen alle Biotypen, einschließlich der W83-Variante, ein putatives C-terminales Membranankerpeptid in der Kgp44-Domäne (69). Im Anschluß an das Ankerpeptid konnte bei den Stämmen HG66 und 381 eine Region von 30 weiteren Aminosäureresten in Richtung des N-Terminus identifiziert werden, die identisch mit denen des RgpB ist. Röntgenstrukturanalysen lassen vermuten, dass in diesem Bereich des Proteins eine posttranslationale Prozessierungsstelle vorliegt (20). Die Stämme W83 und W83var besitzen in diesem Bereich eine abweichende Aminosäureabfolge, was die Vermutung nahe legt, dass diese beiden Enzymkomplexe in einer anderen Form prozessiert werden. Ein weiterer Hinweis auf eine unterschiedliche Virulenz der identifizierten Biotypen könnte eine variable Region der Stämme W83 und W83var sein, die 65% Identität zu einem synthetischen Peptid aus 20 Aminosäureresten besitzt, das die Hämagglutininierung hemmen kann (36). In den anderen Stämmen konnte diese Sequenz nicht identifiziert werden. Darüber hinaus konnten auch Abweichungen in der immunologischen Reaktivität der einzelnen *P. gingivalis*-Stämme nachgewiesen werden. Das Kgp vom Stamm HG66 besitzt zwei

Kopien eines Epitops, eine in der Kgp39-Adhäsionsdomäne und eine in der variablen Region der Kgp44-Domäne. Bei anderen *P. gingivalis*-Stämmen konnte lediglich eine Kopie in der Kgp39-Domäne identifiziert werden (54). Die Untersuchungen machen deutlich, dass viele Anhaltspunkte für eine unterschiedliche Virulenz der verschiedenen *kgp*-Allele vorhanden sind, jedoch ist bislang nicht bekannt, ob die Eigenschaften der untersuchten klinischen Isolate identisch mit denen der Ihnen zugeordneten Referenzstämme sind. Um dies zu klären sind weitere Studien nötig, die eine Assoziation der verschiedenen *kgp*-Allele mit der Virulenz der klinischen Isolate zulassen.

Die Proteasen PrtT und Tpr von *P. gingivalis* sind weniger gut untersucht, als die bis hierher beschriebenen Virulenzfaktoren. Von beiden Enzymen war bislang lediglich ein Genotyp bekannt. Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass das *prtT*-Gen in mindestens zwei Varianten und das *tpr*-Gen mit sieben verschiedenen Allelen vertreten ist. Die auffallenden Unterschiede zwischen den einzelnen Allelen lässt vermuten, dass auch in diesen Proteinen basierend auf der abweichenden Nukleinsäurestruktur funktionell unterschiedliche Produkte gebildet werden könnten, wie es für das Fimbriengen oder RgpB schon beschrieben werden konnte. Um diese Hypothese zu überprüfen sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, die entweder die Funktionalität der Enzyme anhand ihrer Substratspezifität ermitteln oder die Epidemiologie der verschiedenen Allele, das heißt ihre Prävalenz in gesunden und parodontal erkrankten Menschen analysieren.

Bei den Prokaryonten sind drei verschiedene Populationsstrukturen bekannt: Klonal-strukturierte Populationen, panmiktische und epidemiologische Populationen. Diese Typen werden durch *Salmonella enterica*, *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis* dargestellt. In einer klonal strukturierten Population stellen Genotypen die Verbreitung von Evolutionsveränderungen innerhalb dieser Population dar. Sie können über viele Generationen hinweg persistieren und unterscheiden sich nur durch Mutationen und genetische Veränderungen, die innerhalb einzelner Bakterienzellen vorkommen. Jedoch sind nur wenige Bakterienpopulationen tatsächlich vollkommen klonal strukturiert und sogar beim Modellorganismus *S. enterica* konnte vereinzelt

lateralen Gentransfer nachgewiesen werden (45). Panmiktische Populationen sind im Gegensatz dazu so variabel, dass identische Stämme nur bei Isolaten aus Quellen mit direktem Kontakt zueinander gefunden werden. In panmiktischen Populationen sind alle vorkommenden Gene hinsichtlich ihrer Kombinationsmöglichkeit völlig dem Zufall unterworfen.

Die im Rahmen dieser Studie erhaltenen Ergebnisse unterstützen die Annahme einer eher panmiktisch geprägten Struktur der untersuchten *P. gingivalis*-Population. Hierfür spricht, dass die untersuchte *P. gingivalis*-Population durch eine hohe Diversität gekennzeichnet ist. Dies drückt sich zum einen durch die Identifizierung von 82 unterschiedlichen Genotypen bei lediglich 108 untersuchten Isolaten aus. Sowohl die Berechnung der „Coverage“ als auch die Rarefaction-Analyse zeigen deutlich, dass mit den bislang identifizierten Genotypen die Diversität der *P. gingivalis*-Population längst nicht vollständig erfasst ist. Unterstützt wird diese Hypothese weiterhin durch den standardisierten Assoziationsindex $I_A^S = 0,0079$, der sich nicht signifikant von Null unterscheidet. Damit kann davon ausgegangen werden, dass sich die untersuchte Population nahe dem „linkage equilibrium“ befindet, das heißt, die Allele aller untersuchten Gene hinsichtlich ihrer Kombinationsmöglichkeiten hauptsächlich dem Zufall unterworfen sind. Obwohl im Rahmen dieser Studie erstmals Allele von Virulenzfaktoren untersucht wurde, denen eine funktionelle Variabilität nachgewiesen wurde beziehungsweise zugeschrieben werden könnte (*tpr*, *prrT*), sind die Ergebnisse in Übereinstimmung mit denen früherer Studien, in denen noch sensiblere Meßmethoden eingesetzt wurden. Hierzu zählen z. B. Restriktionsenzymanalysen oder Multilokus Sequencing-Methoden, bei denen auch einzelne Basenaustausche (Punktmutationen) in die Auswertung eingehen (37). Mit allen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Populationsstruktur von *P. gingivalis*-Population durch häufige Rekombination charakterisiert ist. Ein Vorteil der ausgeprägten Diversität könnte die mögliche Umgehung der Wirtsabwehr sein, wie es für das *rgpB*-Gen auch schon diskutiert wurde. Darüber hinaus sichert eine hohe Rekombinationsrate das Vorkommen von Stämmen, die optimal an veränderte Standortbedingungen angepasst sind.

Basierend auf diesen Ergebnissen stellt sich die Frage, wo die Rekombination zwischen verschiedenen *P. gingivalis*-Stämmen stattfinden kann. Die parodontalen Taschen von Parodontitispatienten könnten günstige Bedingungen für einen horizontalen Gentransfer

und Rekombination zwischen verschiedenen *P. gingivalis*-Stämmen bieten. Obwohl gezeigt werden konnte, dass *P. gingivalis* befähigt ist *in vitro* fremde DNA durch Transformation aufzunehmen (70), sind bislang wenige Studien durchgeführt worden, die Hinweise auf einen horizontalen Gentransfer *in vivo* liefern konnten (26). Allerdings ergab die Untersuchung von 104 Parodontitispatienten lediglich bei zwei Patienten eine Mischinfektion mit mehreren Klonen. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit früheren Studienergebnissen, bei denen ebenfalls eine sehr geringe intraindividuelle Heterogenität festgestellt werden konnte. Die intraindividuelle Rekombination erscheint nach momentaner Datenlage nicht sehr wahrscheinlich.

Bislang konnte keine Korrelation zwischen dem parodontalen Status eines Wirtsorganismus und einem speziellen *P. gingivalis*-Genotyp nachgewiesen werden. Die Virulenz von *P. gingivalis* lässt sich nicht durch eine distinkte Evolutionslinie definieren, vielmehr scheinen verschiedene Genotypen, unter Ihnen vielleicht sogar einige mit erhöhtem pathogenen Potential erfolgreich in der menschlichen Bevölkerung etabliert zu sein. Häufige Rekombinationen helfen bei der schnellen Verbreitung der für die Bakterienpopulation günstigen Eigenschaften. Weitere Experimente zur Untersuchung der Rekombination bei parodontalpathogenen Erregern *in vivo* könnten das Verständnis der Rekombinationsmechanismen erweitern und den Hintergrund der genetischen Variationen in dieser wichtigen Bakteriengruppe aufklären.

Literaturverzeichnis

1. **Alabandar JM, Kingman A.** 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
2. **Ally N, Whisstock, JC, Sieprawska-Lupa M, Potempa J, Le Bonniec BF, Travis J. Pike RN.** 2003. Characterization of the specificity of Arginine-specific gingipains from *Porphyromonas gingivalis* reveals active site differences between different forms of the enzymes. *Biochem* **42**:11693-11700
3. **Amano A, Kuboniwa M, Nakagawa I, Akiyama S, Morisaki I, Hamada S.** 2000. Prevalence of specific genotypes of *Porphyromonas gingivalis fimA* and periodontal health status. *J Dent Res* **79**:1664-1668
4. **Amano A, Nakagawa I, Kataoka K, Morisaki I, Hamada S.** 1999. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with *fimA* genotypes in periodontitis patients. *J Clin Microbiol* **37**:1426-1430
5. **Amano A, Nakagawa I, Okahashi N, Hamada N.** 2004. Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *J Periodont Res* **39**:136-142
6. **Baelum V, Luan WM, Chen X, Fejerskov O.** 1997a. Predictors of destructive periodontal disease incidence and progression in adult and elderly Chinese. *Community Dent Oral Epidemiol* **25**:265-272
7. **Baelum V. Luan WM. Chen X. Fejerskov O.** 1997b. Predictors of tooth loss over 10 years in adult and elderly Chinese. *Community Dent Oral Epidemiol* **25**:265-272
8. **Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Roopenian DC.** 2000. Hererogeneity of *Porphyromonas gingivalis* strains in the induction of alveolar bone loss in mice. *Oral Microbiol Immunol* **15**:27-32

9. **Beikler T, Peters U, Ehmke B, Flemmig TF.** 2003. Sequence analysis of *kgp* in *Porphyromonas gingivalis* isolates from periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* **18**:393-397
10. **Beikler T, Peters U, Prior K, Ehmke b, Flemmig TF.** (2005) Sequence variations in *rgpA* and *rgpB* of *porphyromonas gingivalis* in periodontitis. *J Periodont Res* **40**:193-198
11. **Bodinka A, Schmidt H, Henkel B, Flemmig TF, Klaiber B, Karch H.** 1994. Polymerase chain reaction for the identification of *Porphyromonas gingivalis* collagenase genes. *Oral Microbiol Immunol* **9**:161-165
12. **Bourgeau G, Lapointe H, Peloquin P, Mayrand, D.** 1992. Cloning, expression, and sequencing of a protease gene (*tpr*) from *Porphyromonas gingivalis* W83 in *Escherichia coli*. *Infect Immun* **60**:3186-3192
13. **Brown LJ, Loe H.** 1993. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. *Periodontol 2000* **2**:57-71
14. **Chen C & Slots J.** 1994. Clonal analysis of *Porphyromonas gingivalis* by the arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* **9**:99-103
15. **Clark WB, Loe H.** 1993. Mechanisms of initiation and progression of periodontal diseases. *Periodontol 2000* **2**: 72-82
16. **Curtis MA, Kuramitsu HK, Lanz M, Macrina FL, Nakayama K, Potempa J, Reynolds ED, Aduse-Opoku J.** 1999. Molecular genetics and nomenclature of proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res* **34**:464-472
17. **Cutler CW, Kalmar JR, Genco CA.** 1995. Pathogenic strategies of the oral anaerobe, *Porphyromonas gingivalis*. *Trends Microbiol* **3**:45-51
18. **Darveau RP, Tanner A, Page RC.** 1997. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol 2000* **14**:12-32
19. **Daspher SG, Kandasamy S, O'Brien-Simpson N, Reynolds EC.** 1998. Amino acid and peptide uptake by *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res* **77**:1133 (abstr.)

20. **Eichinger A, Beisel HG, Jacob U, Huber R, Medrano FJ, Banbula A, Potempa J, Travis J, Bode W.** 1999. Crystal structure of gingipain R: an Arg-specific bacterial cysteine proteinase with a caspase-like fold. *EMBO J* **18**:5453-5462
21. **Fornig RY, Champagne C, Simpson W, Genco CA.** 2000. Environmental cues and gene expression in *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Dis* **6**:351-365
22. **Genco CA, Odusanya BM, Potempa J, Mikolajczyk-Pawlinska J, Travis J.** 1998. A peptide domain on gingipain R which confers immunity against *Porphyromonas gingivalis* infection in mice. *Infect. Immun* **66**:4108-4114
23. **Gibson FC, Genco CA.** 2001. Prevention of *Porphyromonas gingivalis*-induced oral bone loss following immunization with gingipain. *Infect. Immun* **69**:7959-7963
24. **Good IJ.** 1953. The population frequencies of species and the estimation to the population parameters. *Biometrika.* **40**:237-264
25. **Grenier D, Mayrand D.** 1988. Selected characteristics of pathogenic and nonpathogenic strains of *Bacteroides gingivalis*. *J Clin Periodontol* **15**:145-155
26. **Hanley SA, Aduse-Opoku J, Curtis MA.** 1999. A 55-kilodalton immunodominant antigen of *Porphyromonas gingivalis* W50 has arisen via horizontal gene transfer. *Infect Immun* **67**:1157-1171
27. **Haubold B, Hudson RR.** [Online] LIAN 3.1 Fachhochschule Weihenstephan, Bioinformationszentrum, Deutschland <http://adenine.biz.fh-weihenstephan.de/lian/> [Letzter Zugriff: 25.Oktober 2005]
28. **Haubold B, Hudson RR.** 2000. LIAN 3.0: Detecting linkage disequilibrium in multilocus data. *Bioinformatics* **16**(9):847-848
29. **Hintermann E, Haake SK, Christen U, Sharabi A, Quaranta V.** 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

30. **Holland, SM.** 1999. [Online.] Analytic Rarefaction 1.3. University of Georgia, Athens. <http://www.uga.edu/~strata/software/AnRareReadme.html>. [Letzter Zugriff: 24. Oktober 2005]
31. **Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA.** 1999. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000 **20**:168-238
32. **Huang GTJ, Kim D, Lee, JKH, Kuramitsu K, Haake SK.** 2001. Interleukin-8 and intracellular 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
33. **Imamura T, Potempa J, Pike RN, Moore JN, Barton MH, Travis J.** 1995. 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
34. **Jagels MA, Travis J, Potempa J, Pike R, Hugli RE.** 1996. Proteolytic inactivation of the leukocyte C5a receptor by proteinases derived from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun* **64**:1984-1991
35. **Katz J, Ward DC, Michalek, SM.** 1996. Effect of host responses in the pathogenicity of strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* **11**:309-318
36. **Kelly CG, Booth V, Kendal H, Slaney JM, Curtis MA, Lehner T.** 1997. The relationship between colonization and haemagglutination inhibiting and B cell epitopes of *Porphyromonas gingivalis*. *Clin Exp. Immunol* **110**:285-291
37. **Koehler A, Karch H, Beikler T, Flemmig TF, Suerbaum S, Schmidt H.** (2003) Multilocus sequence analysis of *Porphyromonas gingivalis* indicates frequent recombination. *Microbiol* 149:2407-2415
38. **Kuramitsu HK.** 1998. Proteases of *Porphyromonas gingivalis*: what do not they do? *Oral Microbiol Immunol*. **13**:263-270
39. **Lamont RJ, Jenkinson HF.** 1998. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:1244-1263

40. **Loos BG, Dyer DW, Whittam TS, Selander RK.** 1993. Genetic structure of populations of *Porphyromonas gingivalis* associated with periodontitis and other oral infections. *Infect Immun* **61**:204-212
41. **Loos BG, Dyer DW.** 1992. Restriction fragment length polymorphism analysis of the fimbriin locus, *fimA*, of *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res* **71**:1173-1181
42. **Loos BG, Mayrand D, Genco RJ, Dickinson PD.** 1990. Genetic heterogeneity of *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* by genomic DNA-fingerprinting. *J Dent Res* **69**(8):1448-93
43. **Lu B, McBride BC.** 1998. Expression of the *tpr* protease gene of *Porphyromonas gingivalis* is regulated by peptide nutrients. *Infect Immunol* **66**:5147-5156
44. **Marsh PC, McKee, AS, McDermid AS, Dowsett AB.** 1989. Ultrastructure and enzyme activities of a virulent and an avirulent variant of *Bacteroides gingivalis* W50. *FEMS Microbiol Lett* **59**:181-185
45. **Maynard-Smith J, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG.** 1993. How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:4383-4388
46. **Menard C, Brousseau R, Mouton C.** 1992. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primer (AP-PCR) to strain identification of *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett* **74**:163-168
47. **Menard C, Gosselin P, Duhaime JF, Mouton C.** 1994. Polymerase chain reaction using arbitrary primer for the design and construction of a DNA probe specific for *Porphyromonas gingivalis*. *Res Microbiol* **145**:595-602
48. **Menard C, Moutan C.** (1995) Clonal diversity of the taxon *Porphyromonas gingivalis* assessed by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Infect Immun* **63**(7):2522-2531
49. **Mikolajczyk-Pawlinska J, Kocrula T, Pavloff N, Pemberton PA, Kiefer MC, Travis J, Potempa J.** 1998. Genetic variations of *Porphyromonas gingivalis* genes encoding gingipains, cystein proteinases with arginine or lysine specificity. *Biol Chem* **237**:205-211

- 50. Nadkarni MA, Nguyen KA, Chapple CC, DeCarlo AA, Jacques NA, Hunter N.** 2004. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* Biotypes Defined by Alleles of the *kgp* (Lys-Gingipain) Gene. *J Clin Microbiol* **42(8)**:3873-3876
- 51. Nakagawa I, Amano A, Kimura RK, Nakamura T, Kawabata S, Hamada S.** 2000. Distribution and molecular characterization of *Porphyromonas gingivalis* carrying a new type of *fimA* gene. *J Clin Microbiol* **38**:1909-1914
- 52. Nakagawa I, Amano A, Ohara-Nemoto Y, Endoh N, Morisaki I, Kimura S, Kawabata S, Hamada S.** 2002. Identification of a new variant of *fimA* gene of *Porphyromonas gingivalis* and its distribution in adults and disabled populations with periodontitis. *J Periodont Res.* **37**:425-432
- 53. Nelson D, Potempa J, Kordula T, Travis J.** 1999. Purification and Characterization of a Novel Cysteine Proteinase (Periodontain) from *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem.* **274(18)**:12245-12251
- 54. O'Brien-Simpson NM, Black CL, Bhogal PS, Cleal SM, Slakeski N, Higgins TJ, Reynold EC.** 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
- 55. Özmeric N, Preus NR, Olsen I.** 2000. Genetic diversity of *Porphyromonas gingivalis* and its possible importance to pathogenicity. *Acta Odontol Scand* **58**:183-187
- 56. Park YS, Lu C, Mazur C, McBride BC.** 1997. Inducible expression of a *Porphyromonas gingivalis* W83 membrane-associated protease. *Infect Immun* **65**:1101-1104
- 57. Park YS, McBride BC.** 1992. Cloning of a *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* protease and characterization of its product. *FEMS Microbiol Lett* **92**:273-278
- 58. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE.** 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* Jun;**183(12)**:3770-83.

59. **Potempa J, Banbula A, Travis J.** 2000. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontol* 2000 **24**:153-192
60. **Potempa J, Pavloff N, Travis J.** 1995a. *Porphyromonas gingivalis* a proteinase/gene accounting audit. *Trends Microbiol* **3**: 420-434
61. **Potempa J, Pike R, Travis J.** 1995b. The multiple forms of trypsin-like activity present in various strains of *Porphyromonas gingivalis* are due to the presence of either Arg-gingipain or Lys-gingipain. *Infect Immun* **63**:1176-1781
62. **Rath, J., K. Y. Wu, G. J. Herndl, and E. F. DeLong.** 1998. High phylogenetic diversity in a marine-snow-associated bacterial assemblage. *Aquat Microb Eco* **14**:261-269
63. **Sheiham A.** 1997. Is the chemical prevention of gingivitis necessary to prevent severe periodontitis? *Periodontol* 2000 **15**:15-24
64. **Shi Y, Ratnayake DB, Okamoto K, Abe N, Yamamoto K Nakayama K.** 1999. Genetic analyses 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
65. **Smalley JW, Birss AJ, Kay HM, McKee AS, Marsh PD.** 1998. The distribution of trypsin-like enzyme activity in cultures of a virulent and an avirulent strain of *Bacteroides gingivalis* W50. *Oral Microbiol Immunol* **4**:178-181
66. **Socransky SS, Martin L.** 1992. Ribotyping of *Porphyromonas gingivalis* and *Campylobacter rectus*. *J Dent Res.* **71**:246
67. **Takahashi Y, Yoshimura F, Kasanami M, Kato H.** 1992. Detection of fimbriin gene (*fimA*) in *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* by Southern blot analysis. *J Periodontal Res* **27**:599-603
68. **Van Steenberg TJ, Petit MD, Scholte LH, van der Velden U, De Graaf J.** 1993. Transmission of *Porphyromonas gingivalis* between spouses. *J Clin Periodontol* **20**:340-345

- 69. Veith PD, Talbo GH, Slakeski N, Dashper SG, Moore C, Paolini RA, Reynolds E.** 2002. Major outer membrane proteins and proteolytic processing of RgpA and Kgp of *Porphyromonas gingivalis* W50. *Biochem J* **363**:105-115
- 70. Yoshimoto H, Takahashi Y, Hamada N, Umemoto T.** 1993. Genetic transformation of *Porphyromonas gingivalis* by electroporation. *Oral Microbiol Immunol* **8**:208-212

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin der Poliklinik für Parodontologie am Universitätsklinikum Münster. Ich bedanke mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Flemmig danke ich für das in mich gesetzte Vertrauen und den mir gewährten Freiraum bei der Durchführung der Arbeiten. Ebenso für seine stete Unterstützung durch die Schaffung von besten Rahmenbedingungen für meine fachliche wie auch persönliche Weiterentwicklung. Herrn Prof. Dr. Karch danke ich für die Übernahme des Koreferates und die gute Zusammenarbeit mit seinem Institut im Bereich der Sequenzierung.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Dr. Beikler und Dr. Ulrike Peters, die mir mit Ihrem medizinischen und wissenschaftlichen Sachverstand stets mit Rat und Tat zur Seite standen! In vielen horizonterweiternden Diskussionen schafften sie es neben guten und hilfreichen fachlichen Gesprächen auch meinen Blick für weitere Dimensionen menschlichen Daseins offen zu halten.

Eine von mir hoch geschätzte Unterstützung war und ist das freundliche Klima im Forschungslabor der Parodontologie. Dafür danke ich Anette Eickhoff, Margard Karpisch-Tölke, Anja Schultes und Beate Walters ganz herzlich!

Last but not least danke ich an dieser Stelle ganz besonders meiner Familie. Meinen Eltern, ohne deren Unterstützung mir die Ausbildung, in der Form wie ich sie genießen konnte, nicht möglich gewesen wäre. Und meinem Mann Klaus für die stetige moralische Unterstützung und seine Geduld, mit der er meine Stimmungsschwankungen, die das Projekt „Promotion“ vor allem in den letzten Wochen mit sich gebracht hat, ertragen hat.

Münster im Dezember 2005

Karola Prior

Anhang

Tab. 9: Für die *P. gingivalis*-Identifizierung bzw. die Sequenz- und Restriktionsanalysen verwendete Primer.

Primer	Sequenz	Referenz
<i>prtC</i>		
Coll-1	5` - ACA ATC CAC GAG ACC ATC - 3`	Bodinka et al., 1994
Coll-2	5` - GAT TCC CTT GCC TAC ATA - 3`	Bodinka et al., 1994
<i>fimA</i>		
fimA-1F	5` - CTG TGT GTT TAT GGC AAA CTT C - 3`	Amano et al., 1999
fimA-2F	5` - ACA ACT ATA CTT ATG ACA ATG G - 3`	Amano et al., 1999
fimA-3F	5` - ATT ACA CCT ACA CAG GTG AGG C - 3`	Amano et al., 1999
fimA-4F	5` - CTA TTC AGG TGC TAT TAC CCA A - 3`	Amano et al., 1999
fimA-1R,2R,3R,4R	5` - AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A - 3`	Amano et al., 1999
fimA-5F	5` - AAC AAC AGT CTC CTT GAC AGT G - 3`	Nakagawa et al., 2000
fimA-5R	5` - TAT TGG GGG TCG AAC GTT ACT GTC - 3`	Nakagawa et al., 2000
FimA-F	5` - CCG GAG CAC AAC ATA ATC TG - 3`	diese Studie
FimA-R	5` - GCT CCC TGT ATT CCG ATA TAG - 3`	diese Studie
FimA-seq0	5` - AAT CTG AAC GAA CTG CGA CG - 3`	diese Studie
FimA-seq1	5` - TTC ATC CGA CAA TCC TGT GTG - 3`	diese Studie
FimA-seq2	5` - GGT CTA CGT CCT ACT ATT CTA TGT - 3`	diese Studie
FimA-seq3	5` - GAC CAG CAA TTC GAA TCG TG - 3`	diese Studie
FimA-seq4	5` - TGG CAA GAC TCT TGC AGA G - 3`	diese Studie
FimA-seq5	5` - GAG GCT GCA GGG TTG ATC ATG - 3`	diese Studie
FimA-seq6	5` - GAA GCA ATC TAA TTT GTT CGG - 3`	diese Studie
FimA-seq7	5` - GAC AGT GGA AGA GGC CGA CG - 3`	diese Studie
FimA-seq8	5` - CGT CGG CCT CTT CCA CTG TC - 3`	diese Studie
<i>prtT</i>		
PrtT-F1	5` - ATA GCC TTC TAA GCT ATC GG - 3`	diese Studie
PrtT-F2	5` - GTA TTA TGC CGG TGC AGA CG - 3`	diese Studie
PrtT-F11	5` - GGA TTT CTC CTC GTC GCA G - 3`	diese Studie
PrtT-F12	5` - GTC ACT ACA AGT GGC CGG AG - 3`	diese Studie
PrtT-F13	5` - TTG GGA AGA CAT TAT CGG AG - 3`	diese Studie
PrtT-F14	5` - CCT TGG CAG ACA TTT AGT AG - 3`	diese Studie
PrtT-F15	5` - CGA AAT AGT GGC TAT AAA GG - 3`	diese Studie
PrtT-F16	5` - CAA TCC TGC TCA CGA CTA TG - 3`	diese Studie
PrtT-F21	5` - ATG CAT CGG ATC CGA TCT TG - 3`	diese Studie
PrtT-F22	5` - ATT CAG GCA CAT TCG GTG AG - 3`	diese Studie
PrtT-F31	5` - GAT TCG TAA GGA ACT GGC AG - 3`	diese Studie
PrtT-F32	5` - ACC TGT GTA TTA TGC CGG TG - 3`	diese Studie
PrtT-R1	5` - CAA TGA CAT AAA GCG GCA TG - 3`	diese Studie
PrtT-R2	5` - CAG GTC AAG TGC TTC ATC AG - 3`	diese Studie
PrtT-R11	5` - AAG ATC GGA TCC GAT GCA TG - 3`	diese Studie
PrtT-R12	5` - CCT TTA TAG CCA CTA TTT CG - 3`	diese Studie
<i>tpr</i> PG0938		
Tpr-F1	5` - GTC GTG ATA ACG TTC GGC TG - 3`	diese Studie
Tpr-F2	5` - ATT CGG CTG TTC GGG TCT CG - 3`	diese Studie
Tpr-F3	5` - CAG ACA CAC ATT TTC AGG TG - 3`	diese Studie
Tpr-R1	5` - AGT GTA TGC TCC GAT ATG GAG - 3`	diese Studie
Tpr-R2	5` - TTA GAG CCT GTT GCC TGA CG - 3`	diese Studie
Tpr-S2	5` - GTA AGA GCC TAA AGT CAC AG - 3`	diese Studie

Primer	Sequenz	Referenz
Tpr-S3	5` - AGG CGA CTC TGT ATT AAG AG - 3`	diese Studie
Tpr-S4	5` - TCG CTG GCG ATT GTT ACA TG - 3`	diese Studie
Tpr-S5	5` - GAG CTG AGT GGA GAT AGC TG - 3`	diese Studie
Tpr-S21	5` - AAC GGA GGA TAC TGG CCG GC - 3`	diese Studie
Tpr-S22	5` - ATG CCA ATT GGA AAT TCC C - 3`	diese Studie
Tpr-S23	5` - AGC ATA CCA TGC CTA TAC AG - 3`	diese Studie
Tpr-SR1	5` - TTC TCC GTT GAA CCA ATA GC - 3`	diese Studie
Tpr-SR2	5` - TGT TGA GGA GTA AGA TGG GC - 3`	diese Studie
<i>rgpA (rgp1)</i>		
Rgp1-F1	5` - ATA CGG AGC GAG GAA GCA TAC G - 3`	diese Studie
Rgp1-R2	5` - GCT GAT TGG CTT AGT AGG TGA G - 3`	diese Studie
Rgp1-seq1	5` - GGC GAC CGA TTC ATA CTC TG - 3`	diese Studie
Rgp1-seq2	5` - GAA ATC GTC ATA ACG TGC AGG C - 3`	diese Studie
Rgp1-seq3	5` - TAC GCC GTC TTC TTC GAA GG - 3`	diese Studie
Rgp1-seq4	5` - GCC ATC GGC ATC GAT AGT AG - 3`	diese Studie
Rgp1-seq5	5` - ATT CCG GGA GCA TTT CCA GG - 3`	diese Studie
Rgp1-seq6	5` - TTG CTT GAG GAG CAG CAA TTG - 3`	diese Studie
Rgp1-seq7	5` - CTG TCA GAT TGA TTG TAG CTG - 3`	diese Studie
Rgp1-seq8	5` - CAT TCA CAC AAG CTA CGT CG - 3`	diese Studie
Rgp1-seq9	5` - AGC ATT AGC TGT AAC GGG AG - 3`	diese Studie
Rgp1-seq10	5` - CCT TGG AGG GTG CAA TCA GG - 3`	diese Studie
Rgp1-seq11	5` - CTG TGT ACT TAA CTT CCA CG - 3`	diese Studie
Rgp1-seq12	5` - CAC GTA CAT CGT TTG CAG GTT C - 3`	diese Studie
Rgp1-seq13	5` - GTG GAA AGA CCG AAT CTT GC - 3`	diese Studie
Rgp1-seq14	5` - GCA TCG TTA CCG GTC GAA G - 3`	diese Studie
Rgp1-seq15	5` - CGC AAT ACT CAT GAT TGC CTG - 3`	diese Studie
Rgp1-seq16	5` - CGC TGC GAG CGG TAT TAG TG - 3`	diese Studie
Rgp1-seq17	5` - GCT ATG ATA GCA ACA GTA CC - 3`	diese Studie
Rgp1-seq18	5` - GAG CCA TTT GTC TTC CGT GG - 3`	diese Studie
Rgp1-seq19	5` - GAT GCG CAA CGT CTT TGT C - 3`	diese Studie
Rgp1-seq21	5` - TAT ACC GGC CGG AAC TTA TG - 3`	diese Studie
Rgp1-seq22	5` - TGC CTC ATG GAA GAC GAT CG - 3`	diese Studie
Rgp1-seq31	5` - GAG ACT ATC GGC ACC TAC AG - 3`	diese Studie
Rgp1-seq32	5` - GAG GAA TGG CAT TTG CGC AG - 3`	diese Studie
Rgp1-seqI	5` - CGT GGA AGT TAA GTA CAC AG - 3`	diese Studie
Rgp1-seqII	5` - GAA CCT GCA AAC GAT GTA CGT G - 3`	diese Studie
Rgp1-seqIII	5` - GCA AGA TTC GGT CTT TCC AC - 3`	diese Studie
Rgp1-seqIV	5` - CTT CGA CCG GTA ACG ATG C - 3`	diese Studie
Rgp1-seqV	5` - CAG GCA ATC ATG AGT ATT GCG - 3`	diese Studie
Rgp1-seqVI	5` - CAC TAA TAC CGC TCG CAG CG - 3`	diese Studie
Rgp1-seqVII	5` - GGT ACT GTT GCT ATC ATA GC - 3`	diese Studie
Rgp1-seqVIII	5` - CCA CGG AAG ACA AAT GGC TC - 3`	diese Studie
Rgp1-seqIX	5` - GAC AAA GAC GTT GCG CAT C - 3`	diese Studie
<i>rgpB (rgp2)</i>		
Rgp2-F2	5` - CGT TCG CAG TTC TTA CCA TG - 3`	diese Studie
Rgp2-R2	5` - ATC CAC AGG TTG GAT CGA GC - 3`	diese Studie
Rgp2-seq1	5` - GAG CAG CTC TTC AAT GAG - 3`	diese Studie
Rgp2-seq2	5` - CTA CGT GTA CGG ACA GAG - 3`	diese Studie
Rgp2-seq3	5` - AAC CAA CGC GGT CTC CGT AC - 3`	diese Studie
Rgp2-seq4	5` - GGG GAT CAA ATC CAC CAG G - 3`	diese Studie
Rgp2-seq5	5` - GTA CGT CTC ACT TCG GCA CC - 3`	diese Studie
Rgp2-seq6	5` - AAA GAT GGT AAA CCG ACA GG - 3`	diese Studie
Rgp2-seq7	5` - TAC GCT CTC TGA CGA TGG TG - 3`	diese Studie
Rgp2-seqI	5` - GTA GCC CTT GCG CAC CAT GG - 3`	diese Studie

Primer	Sequenz	Referenz
Rgp2-seqII	5' - GGT GCC GAA GTG AGA CGT AC - 3'	diese Studie
Rgp2-seqIII	5' - CTC TGT CCG TAC ACG TAG - 3'	diese Studie
Rgp2-seqIV	5 - ACC GTC TTT CAC GAT AGC AG - 3'	diese Studie
Rgp2-seqV	5' - TGT ATA CGT CTT GCC TTC AG - 3'	diese Studie
<i>kgp</i> -Adhäsine		
Kgp-2R	5' - GCT CTT ATC CGG CAT GGT AG - 3'	Beikler et al., 2003
Kgp-4F	5' - GAA CTG ACG AAC ATC ATT G - 3'	Beikler et al., 2003
Kgp-4R	5' - TTG ACA CGA GTC ATT ACC TC - 3'	Beikler et al., 2003
Kgp-5F	5' - CTG TGT TAC AGC TCA ATT C - 3'	Beikler et al., 2003
Kgp-5R	5' - GCT GGC ATT AGC AAC ACC TG - 3'	Beikler et al., 2003
Kgp-6F	5' - TCT GCC GGT TCT TAC GTA G - 3'	Beikler et al., 2003
Kgp-6R	5' - CGA ATG TAT TGT GAT CGG C - 3'	Beikler et al., 2003
Kgp-1gF	5' - CGA ACC TGC AAA CGA TGT ACG TG - 3'	Beikler et al., 2003
Kgp-1gR	5' - CAT CCA ATG CTG TCC ACC CTG TG - 3'	Beikler et al., 2003
Kgp-7F	5' - AAG CCA AGG TTG TGC TCG CAG CA - 3'	Beikler et al., 2003
Kgp-7R	5' - GGC TGT GTA CTT AAC TTC CAC GC - 3'	Beikler et al., 2003
Kgp-8F	5' - CCT ATA CAG TCT ATC GTG ACG G - 3'	Beikler et al., 2003
Kgp-8R	5' - CGT GAA GTT GGA TGC ATC GTT ACC - 3'	Beikler et al., 2003
Kgp-9F	5' - TGA CAA CTA TCT GAT AAC ACC GG - 3'	Beikler et al., 2003
Kgp-9R	5' - GAG ATG AGA TAG TTA TCA GGA TTC - 3'	Beikler et al., 2003
Kgp-10F	5' - AAT GGA CTA CTA TCG ATG CCG ATG G - 3'	Beikler et al., 2003
Kgp-12F	5' - GCT TTC CGT CAC TAC AAT TGC TCG G - 3'	Beikler et al., 2003
Kgp-13F	5' - TCA TGA GTA TTG CGT GGA AG - 3'	Beikler et al., 2003
Kgp-16F	5' - GAT CAC GGT AAC TTG CCA AG - 3'	diese Studie
Kgp-21F	5' - ACC AGC CTG TTT CCA ACT TG - 3'	diese Studie
Kgp-22F	5' - AAG GTT GTG CTC GCA GCA G - 3'	diese Studie
Kgp-23F	5' - CCT GCA TCC GGA AAG ATG TG - 3'	diese Studie
Kgp-24F	5' - GAA CCT GAC CGG TAG TGC AG - 3'	diese Studie
Kgp-25F	5' - TCG TAT ACA GGG TAC TTG G - 3'	diese Studie
Kgp-26F	5' - AAC GCC GGA GAC TTC ACG G - 3'	diese Studie
Kgp-en11	5' - ACA AAG TCT CCG AGT CCA AG - 3'	diese Studie
Kgp-en12	5' - GTG TCT GCA CAA AGT CTC CG - 3'	diese Studie
Kgp-en13	5' - CTC TGA GAC AAT TAC AGA CC - 3'	diese Studie
Kgp-en14	5' - CAT ACT CTG AGA CAA TTA CAG - 3'	diese Studie
Kgp-F42	5' - GAA GAC GGC GTA GCT ACG GGC - 3'	diese Studie
Kgp-R81	5' - ACC ATG ACT GCA TAG TAG CC - 3'	diese Studie

In den folgenden Tabellen sind die im Vergleich zur Referenzsequenz auftretenden Basenaustausche im jeweiligen klinischen Isolat aufgeführt. Die Nummerierung der Basen entspricht der Nukleinsäurenummerierung der aufgeführten Referenzsequenz.

Tab. 10: Nukleinsäurepolymorphismen der als *fimA* Typ I identifizierten *P. gingivalis*-Isolate im Vergleich zur *fimA* Typ I-Literatursequenz D17794.

bp	D17794	87	493	117	479	211	127	337	373	44	23	278	59	10	26	357
46	G						A								A	
47	G				A		A						A	A	A	
51-55ins	-				agatt		agatt	agatt			agatt		agatt	agatt	agatt	
61	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
94	C	T		T												T
134	G													A		
136	T						C								C	
196	C					T			T	T		T				
211	A					T						T				
227	T				C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
245	G				A		A	A			A		A	A	A	

bp	D17794	87	493	117	479	211	127	337	373	44	23	278	59	10	26	357
246	T				Δ	Δ	A	A			A	Δ	A	A	A	
247	T				Δ	Δ						Δ				
248	G				Δ	Δ						Δ				
249	G				Δ	Δ	C	C			C	Δ	C	C	C	
250	C				Δ	Δ	G	G			G	Δ	G	G	G	
251	G				Δ	Δ						Δ				
252	A						G									G
253	T				A	A	A	A			A	A	A	A	A	A
317	A						G	G			G		G	G	G	G
324	C						T	T			T		T	T	T	T
347	G						A	A			A		A	A	A	A
402	C						A									A
407	G						A									A
410	C						T									T
414	T						C									C
462	C										A		A	A		
465	A												G	G		
469	C							T	T	T		T				
479	G				A											
484	G				T		T	T	T	T		T				
505	A							G			G					
555	C			G				A	A	A	A	G	A	A		
582	A										C		C	C		
584	C						G									G
592	G							A	A	A						
604	T			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
623	A						C									
640	A			G	G			G	G	G	G	G	G	G	G	G
652	C							T	T	T						
731	A			G								G				
738	T			C				C	C	C		C				
739	A			G	G	G		G	G	G	G	G	G	G	G	G
798i	-											ACC				
800	G			A		A	A					A			A	A
802	C					T									T	T
817	G					T									T	T
818	C						T									
824	C			T	T	T	T					T	T	T	T	T
833	A			G	G	G	G					G	G	G	G	G
839	G					A									A	A
848	G			A	A	A	A					A	A	A	A	A
856	T				A						A		A	A		
902	G				A	A	A								A	A
962	G															
965	T				C	C	C								C	C
968	G				A	A	A								A	A
974	G				A	A	A								A	A
988	T				A	A	A								A	A
1014	C				G	G	G								A	A
1016	G					C	C								C	C
1033	C					T	T									
1077	G							A	A	A	A	A	A	A	A	A
1078	C							T	T	T	T	T	T	T	T	T
1079	A							G	G	G	G	G	G	G	G	G
1080	A							G	G	G	G	G	G	G	G	G
1087	G										A		A	A		
1130	T							C	C	C	C	C	C	C		
1138	T							C	C	C						
1251	C							T	T	T						

Tab. 11: Nukleinsäurepolymorphismen innerhalb der als *fimA* Typ II und IIb (Alignment mit *fimA* Typ I im Bereich zwischen nt 493 und nt 584) identifizierten Genotypen im Vergleich zur Literatursequenz D17797 (Lit).

bp	Lit	41	85	91	297	486	307	338	275	1	21	36	72	281	83	423
<i>fimA</i> Typ II																
46	G															
47	G	A					A	A	A						A	A
55ins			agatt	agatt	agatt	agatt				agatt	agatt	agatt				
89	C									T	T	T				
119	G									A	A	A				
131	T			C									C	C	C	
164	G															
173	C	T														
191	T								C				C	C	C	C
206	A		T	T	T	T			T							
222	C															
239ins													aatgcg	aatgcg	aatgcg	gttggc
240	G									A	A	A				

bp	Lit	41	85	91	297	486	307	338	275	1	21	36	72	281	83	423
241 ins										tcg	tcg	tcg				
242	A									g	g	g				T
249	T												G			
252	A															
254	G									A	A	A				
263	G	A								A	A	A				
264	T									C	C	C				
306	A												G	G	G	
313	C												T	T	T	
336	G													A	A	
391	A	C	C	C	C	C	C			C	C	C				C
396	A	G	G	G	G	G	G			G	G	G				G
399	T	C	C	C	C	C	C			C	C	C				C
403	C	T	T	T	T	T	T			T	T	T				T
451	C															
454	A															
463	A								G							
468	G	A	A	A	A	A	A									
473	G	T	T	T	T	T	T									
485	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
489	G												T			
493																
499	A								T	Alignment mit	Alignment mit	Alignment mit	Alignment mit	Alignment mit	Alignment mit	Alignment mit
500	G		C	C	C	C	C			<i>fimA</i> Typ I	<i>fimA</i> Typ I	<i>fimA</i> Typ I	<i>fimA</i> Typ I	<i>fimA</i> Typ I	<i>fimA</i> Typ I	<i>fimA</i> Typ I
569	A							T		(493-584 bp)	(493-584 bp)	(493-584 bp)	(493-584 bp)	(493-584 bp)	(493-584 bp)	(493-584 bp)
570	A								A							
571	G	G														
584																
590	A									G	G	G	G	G	G	G
596	T								A	A	A	A	A	A	A	A
602	T	C														
605	C	T														
608	G	T														
611	T	G														
620	A	G														
624	A	G														
630	C	A														
631	A	C														
632	G		A	A	A	A	A									
638	T	C	C	C	C	C	C		C		C	C				C
640	C	A	A	A	A	A	A		A		A	A				A
642	T		A													
649	T	C							nd	C	C	C			C	C
650	T	G	G	G	G	G	G		nd	G	G	G				G
691	T															
702	G	A												G		
735	A	G														
736	G															
768	A				G			A								
769	A	C														
775	A		G	G		G	G									
780	G				A											
786	T		A	A	A	A	A									
792	G	A														
835-845i	18 nt	18 nt	18 nt	18 nt	18 nt	18 nt	18 nt									
849	G	A	A	A	A	A	A									
854	A	G	G	G	G	G	G									
855	C	A	A	A	A	A	A									
857	A	G														
860	T	A	A	A	A	A	A									
869	T	C	C	C	C	C	C									
898	G															
929	C	T	T	T	T	T	T	A								A
951	A	G	G	G	G	G	G									
953	T	A	A	A	A	A	A									
954	C								G							
957	T		C	C												
963	T		C	C	C	C	C									
977	A									G	G	G	G	G	G	
986	C														T	
1011	A	G														
1014	A	G	G	G	G	G	G		G							
1031	C	T	T	T	T	T	T		T							
1128	T		C	C	C	C	C									
1136	T		C	C	C	C	C									
1197	C		A	A	A	A	A									

i Insertion eines oder mehrerer Nukleotide
nt Nukleotide

Tab.12: Sequenzabweichungen der als *fimA* Typ III identifizierten *P. gingivalis*-Isolate im Vergleich zur Literatursequenz D17800.

bp	D17800	15	53
15	A		
47	G		A
56-60 del	AGATT		-
178	T		
188	G		

bp	D17800	15	53
274	G		
275	T		
280	C		
301	A		
324	C		
334	G		
336	C		
359	A		
382	C		
421	G		
582	A		
609	G	A	A
747	A		G
780	C		A
790	A		T
797	A		T
820	C		
847-855	GCCTTCCAA		
860	G		
865	A		
866	C		
868	A		
871	T		
880	T		
932	A	G	G
964	T		
965	C		
1126	A		G
1159	T		
1225	C		

Tab. 13: Nukleinsäurepolymorphismen innerhalb der als *fimA* Typ IVa und IVb identifizierten Genotypen im Vergleich zur Literatursequenz D17797 (Lit).

bp	D17802	16	5	30	45	68	46	67	77				
						<i>fimA</i> Typ IVa				<i>fimA</i> Typ IVb			
46	G	A											
47	A					G	G	G	G				
51	A			C	C								
55i						AGATT							
174	A						G	G	G				
179	G						A	A	A				
186	G						A	A	A				
215	C	T		T	T								
218	A						T	T	T				
222	G						A	A	A				
224	G						C	C	C				
227	T						C	C	C				
241	G						A	A	A				
246	G						A	A	A				
254	C						T	T	T				
266	A						G	G	G				
294	A						G	G	G				
305	G						T	T	T				
325	C						A	A	A				
328	A						G	G	G				
335	T						C	C	C				
365	A						T	T	T				
395	T			C	C		C	C	C				
524	G			A			A	A	A				
553	A			G			G	G	G				
561	A	G		G	G		G	G	G				
636	G						A	A	A				
674	C	T	T	T	T	T	T	T	T				
683	C				A								
851	T	A											
854	G	A											
1021	G			A	A								

Tab. 14: Sequenzabweichungen der als *fimA* Typ V identifizierten *P. gingivalis*-Isolate im Vergleich zur Literatursequenz AB027294.

bp	AB027294	133	358	187	242
45i	-	G	G	G	G

bp	AB027294	133	358	187	242
62i	-	A	A	A	A
836i	-	TAC		TAC	TAC
854	G	A	A	A	A
1018	G	A		A	A
1158	G			A	A
1161	G			A	A

Tab. 15: Nukleinsäurepolymorphismen im *rgpA*-Gen der untersuchten *P. gingivalis*-Isolate aus Patientenproben im Vergleich zur *rgpA*-Literatursequenz (Lit; U15282).

bp	Lit	1	5	7	10	21	23	26	30	36	41	44	45	46	53	59	67	68	72	77	83	85	88	91
650	C	T			T	T		T	T	T			T	T	T			T			T		T	T
657	C	G			G	G		G	G	G			G	G	G			G			G		G	G
735	C	T			T	T	T	G	T	T			T	T	T			T	T	T	T		T	T
750	G	T			T	T		T	T	T			T	T	T			T	T	T	T		T	T
847	T	C			C	C		C	C	C			C	C	C			C			C		C	C
857	T				C	C		C	C	C			C	C	C			C			C		C	C
864	T	C			C	C		C	C	C			C	C	C			C			C		C	C
869	T	C			C	C		C	C	C			C	C	C			C			C		C	C
902	T				C	C		C	C	C			C	C	C			C			C		C	C
906	G	A			A	A		A	A	A			A	A	A			A			A		A	A
1050	C	G			G	G		G	G	G			G	G	G			G			G		G	G
1137	G																						G	A
1143	C	G			G	G		G	G	G			G	G	G			G			G		G	G
1145	G	C			C	C		C	C	C			C	C	C			C			C		C	C
1182	C				T			T					T								T		T	T
1189	G													C										
1230	T													C										
1265	C											T												
1305	C							T																
1401	C																							T
1470	G																				T		A	
1539	A	G			G	G		G	G	G			G	G	G			G			G		G	G
1623	G	A			A	A		A	A	A			A	A	A			A			A		A	A
1671	C																						A	A
1800	G								A												A		A	A
1818	C	T			T	T			T	T				T	T						A		A	T
1834	G																							T
1855	G								A												A		A	A
1914	A																							A
1944	C																							
2073	T	C	2074		C	C			C	C	C			C	C						C			C
2097	C																							
2134	G																							
2148	G									A														
2163	C				T																			T
2224	T																							T
2241	G																							T
2246	T				C																			T
2265	T				A					A														T
2346	T	C																						T
2379	A				T																			T
2381	T																							T
2384	G																							T
2386	A																							T
2388	G																							T
2391	T																							T
2394	C				T	T																		T
2406	C				A	A																		T
2407	C				T	T																		T
2433	G																							T
2448	T																							T
2520	T	C	C																					T
2562	T																							T
2595	G				T	T																		T
2616	T																							T
2643	T																							T
2668	C																							T
2686	A																							T
2742	A																							T
2794	T																							T
2933	A																							T
2946	C	T	T		T	T																		T
2961	A	T	T		T	T																		T
2968	A																							T
2976	T				C																			T
2988	G																							T
3003	A				C	C																		T
3036	C																							T
3064	T																							T
3070	C																							T
3135	T	C	C		C	C																		T
3246	T				C																			T
3282	T	G	G		G	G																		T
3329	T																							T
3381	T																							T
3555	T																							T
3580	A				C	C																		T

bp	Lit	1	5	7	10	21	23	26	30	36	41	44	45	46	53	59	67	68	72	77	83	85	88	91
3625	A	G			G	G	G	G	G	G		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
3627	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
3633	T		C	C																				
3768	G													A										
3771	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T			T	T	T	T	T				T	T	T	T
3798-3803					del			ins			ins	del				del	ins		ins	ins				del
3804	A																					G	G	G
3810																						A	A	A
3816	G																					A	A	A
3822	G																					A	A	A
38233																							del	
828																								
3828	C				G		G	G									G						G	T
3837	A											T										T	T	
3837-3839	aac		del																					
3840	A																							
3846	C								G															
3869	C			A																				
3894	A										T											T		T
3918	G			A			A	A									A						A	
4101	C																							
4113	G																		A	C				
4155	G		A	A																				
4162	T									C														
4204	G																							
4263	A			G																				
4347	C	T	A	A		T	T	T	T	T		A	T	T	T	T	T	T	A		A	T	T	T
4404	G	A	A	A		A	A	A	A	A		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
4433	G																							
4441	C																							
4466	G																					A	A	A
4475	A		G	G																		A	A	A
4476	C		A	A																		A	A	A
4485	A				G																			G
4499	C						G										G							
4510	G	A				A	A		A	A			A	A	A	A	A	A			A	A	A	A
4511	C	G				G	G		G	G			G	G	G	G	G	G			G	G	G	G
4525	A																							
4584	G		T																					
4614	C				A																			A
4638	G				A																			A
4663	A														A									
4683	T			C											G									
4739	C											T												
4750	A		G	G	G											G					G		G	G
4797	G							A																
4845	T		C	C											C									
4923	G																							
4932	C						T	T												T				T
4935	T																							
4954	C																							
4992	A		G	G			T									G					G	G	G	T
4998	T	C			C	G			C	C											T			G
5007	T				C																			C
5046	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
5047	G		A	A	A	A	A	A	A	A		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
5048	A	T				T							T	T										
5049	G		A	A	A	A	A	A	A	A		A	T	T										
5052	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T		A	T	T										A
5065	A		G	G	G	G	G	G					T	T										A
5071	C		T	T	T	T	T	T																T
5076	T		A	A	A	A	A	A	A	A		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
5107	C	G			G	G							A	G	G		A							A
5118	C	T			T	T								T										T
5119	G													T										
5157	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
5161	A	G			G	G							G	G	G									G
5172	T	C			C	C							C	C	C									C
5202	T	C																						C
5205	C								T				T											
5220	T	G	G	G		G				G	G		G	G							G	G	G	G
5235	T																							
5259	C																							C
5262	A																							T
5274	A																							G
5323	A																							
5361	T																							
5367	A		G	G				G											C					
5380	A	G				G	G			G	G		G	G	G	G	G	G						G
5394	G																							
5442	A				G																			G
5472	A																							
5475	T	G	G	G		G																		G
5478	A		C	C																				G
5481	C		T	T																				G
5484	C		T	T																				G
5486	G		C	C																				G
5487	T		C	C																				G
5490	T		A	A																				G
5493	T		A	A																				G
5691	T							C	C															C
5694	A							G	G															G
5697	C							G	G															G

bp	Lit	1	5	7	10	21	23	26	30	36	41	44	45	46	53	59	67	68	72	77	83	85	88	91	
5799	C			T								T												T	
5852	C			T																					
5892	T		A	A			A	A				A					A		A					A	
5901	G																							T	
5964	C		G					G																	
5976	A						G					G					G		G	G				G	
6012	C			T			T					T					T		T					T	
6055	G						A					A					G		G					A	
6057	A						C					C					C		C					C	
6064	T						A					A					A		A					A	

Tab. 16: Mutationen im *rgpB*-Gen klinischer *P. gingivalis*-Isolate im Vergleich zur Literatursequenz AF007124 (Lit).

bp	Lit.	1	5	7	21	23	26	30	36	41	44	45	53	59	67	68	72	77	85	91				
995	C									T														T
1081	G/A		G								G			G			G							G
1325	G							A				A												
1391	C/T		C	C		C	C				C			C		C					C			C
1424	G								T							A					A			
1433	T					C								C										
1451	C								T		T			T										
1457	C	T			T																		T	T
1646	C			A												A						A		
1668	G					A			A															
1784	C/T			C						C														
1821	G		A	A											A		A		A					A
1874	C									T														
1880	A									G					G		G		G					
1892	A									T					T		T		T					
1895	A									G					G		G		G					
1898	T		C	C																				C
2006	G										A	A												
2039	T			C			C	C	C	C	C	C									C			C
2057	C		T				T																	
2062	C		A		A																			
2072	T		C																					
2075	T		A			A	A																	
2081	T								C	C	C										C			
2088	C								G		G										G			
2100	A/G														A	A	A				A			
2109	A		G		G	G	G		G															
2129	C		T		T		T								T		T							
2150	T	C								C	C										C			
2164	T	C	C		C	C	C			C	C										C			
2169	C	G	G		G	G	G			G	G										C			
2177	C	A	A		A	A	A			A	A										G			
2207	G							A					A		A		A						A	
2212	C			T				T	T			T	T	T	T		T					T	T	T
2231	A	T	T	T	T	T	T		T	T	T										T			
2242	C	T																			T			
2248	G		T		T	T	T			T	T										T			
2256	C	T																			T			
2312	T	C																			T			
2345	G							A					A		A		A							
2347	A							T					T		T		T							
2350	A							G					G		G		G							
2352	G							A					A		A		A							
2354	A		G	G	G	G	G	G	G	G	G		G	G	G		G					G	G	G
2357	A							T							T		T							
2360	T							C							C									
2372	C			A		A	A				A			A							A		A	A
2373	C					T		T						T										
2399	A	G	G	G	G		G	G	G	G	G		G	G	G		G				G	G	G	G
2414	T		C																					
2443	C	A		A					A	A	A		A		C						C			A
2450	T	A		A					A	A	A		A								A			A
2451	T	C		C					C	C	C		C								C			C
2528	A	T	T	T	T		T	T	T	T	T		T	T	T		T						T	T
2531	T				A					A														
2561	G	T	T	T			T					T			T									T
2570	T						C																	C
2588	G	T	T	T	T		T			T	T			T										T
2609	A				T					T														260
2615	C	T		T										T										0
2621	C		T								T													nd
2630	C		G								G													nd
2652	A	G	G	G	G		G		G	G	G		G	G			G					G		nd
2732	T	C	C					C		C	C		C	C			C							nd

bp	Lit.	1	5	7	21	23	26	30	36	41	44	45	53	59	67	68	72	77	85	91	
2830	A				G				G												283
2975	T					A		A			A	A			A				A		7
3026	A						G			G	G										
3045	G															A			A		
3092	G				A				A												

Tab. 17: Mutationen im Hämagglutininanteils des *kgp*-Gens klinischer *P. gingivalis*-Isolate im Vergleich zur Literatursequenz U68468.

bp	U	U68468						AY559244						AF017059						U54691			
		44	45	46	53	68	77	1	21	30	5	36	59	83	91	67	72	85	7	26	88	10	41
1784i	-	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
1807	C	T		T		T						T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
1813	G											A			A								
1822	C											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
1831	A											G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
1834	G											A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
1836	C											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
1837	C											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
1849	C											A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
1855	T											A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
1858	C											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
1860	C											A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
1861	C											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
1862	T											A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
1863	A											G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
1871	C											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
1873	T											C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1874	A											C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1877	A											G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
1882	C											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
1887	A											C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1894	C											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
1900	T												C		C		C		C		C		C
1902	C											G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
1904	G											A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
1906	A											G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
1912	T											C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1921	T											C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1927	T											G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
1933	C											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
1939	A											C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1942	T											C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1950	G											A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
1951	T											C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1954	C											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
1956	C											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
1957	T											C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1963	T											C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1975	C											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
1978	C											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
1981	T											C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1987	C											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
1999	T											A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2003	G											A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2011	C											A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2038	A											C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
2039	T											G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
2047	A											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
2053	G											A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2054	T											C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
2055	C											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
2056	G											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
2062	C											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
2063	G											A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2065	C											A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2066	A											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
2072	G											C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
2086	A											G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
2116	G											C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
2126	G											A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2147	C											G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
2148	C											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
2158	C											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
2161	T											C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
2169	T											C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
2170	A																						
2173	G											A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2179	T											C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
2182	C											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
2194	T											G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
2221	G											A											
2257	C	A	A	A	A	A	A					G											
2269	C	A	A	A	A	A						A											
2316	A																						
2335	A																						
2350	A																						
2356	T	C	C	C	C	C		T	T			C											
2383	C	T	T	T	T	T		C	C														

bp	U	44	45	46	53	68	77 U68468	1	21	30	5	36	59	83 AY559244	91	67	72	85 AF017059	7	26	88	10 U54691	41
2395	T							T	T		T	T	T	T	T	T	T		T	T	T	T	T
2397	G	A	A	A	A	A	A			A								A					
2398	A									T													
2411	A	G	G	G	G	G	G											G					
2416	C																	T					
2422	C							T	T		T	T	T	T	T	T	T		T		T	T	T
2461	C							T	T		T	T	T	T	T	T	T		T		T	T	T
2467	T							C	C		C	C	C	C	C	C	C		C		C	C	C
2497	G							A	A		A	A	A	A	A	A	A		A		A	A	A
2509	T							C	C		C	C	C	C	C	C	C		C		C	C	C
2521	T													C	T								
2525	C													T	A								
2550	G																						
2554	T						G	C	C		C	C					G	C		C		C	C
2646	A																						
2674	T																	C		C		C	C
2695	T																						
2698	C							T			T										T		T
2710	T																						
2733	C													T	T		T						
2737	A													T	C		T						
2758	T													C	A		C						C
2773	T			A									A	A	A	A	A						A
2780	A																					G	G
2812	T				A						A	A		A	A	A	A						A
2815	C													A	A	A	A						
2830	G																					A	G
2838	C			G				G	G		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
2890	T					G																	
2929	C																						
2932	A																						
3019	C																						
3022	T										A										T		
3050	A							G	G		G	G	G		G	G	G						
3130	A																						
3142	A		G																				
3145	T		G																				
3148	A		C					G	G		G	G	G										
3151	C		T																				
3154	C		T																				
3156	G		C																				
3157	T		C																				
3160	T		A																				
3163	T		A																				
3228	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
3244	T																						
3361	T				C	C							C	C	C			C		C	C	C	C
3364	A				G	G		G			G		G	G	G	G	G	C		G	G	G	G
3367	C				G	G		G	C		G		G	G	G	G	G			G	G	G	G
3389	A		C		C													C					
3403	G					A								A						A			
3434	G																					A	A
3463	T				G										G						G		
3490	G	A	A				A				A	A	A	A	A						G	A	A
3547	G						A																
3557	C					T																	
3562	C	A	A			A				A	A	A		A	A					T	A	A	A
3565	C	T	T			T				T	T	T		T	T					T	T	T	T
3580	T						C		C				C									T	T
3631 i	0	+6	+6	0	0	0	+6	+6	12	+6	+6	+6	+6	+6	+6	0	0	0	+6	12	+6	+6	0
3640	A						T		T		T	T	T	-3	T		-3		-3				T
3673	T																G		G				
3676	C																A		A				
3679	A																T		T				
3697	A						T	T			T	T		T	T						T	T	T
3721	A	G	G	G		G	G	G	G	G	G	G					G		G	G	G	G	G
3778	G																						
3848	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C					C	C	C	C	C	C	C
3863	G																						
3865	G																						
3958	G	A	A	A	A	A					A	A											
4066	A		GA	AG							G	C									A	A	
4150	T	C	CT				C				C	C										C	C
4207	A																					G	G
4209	C																						T
4245	A						G																
4248	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
4278	A						G	G	G	G	G	G											
4279	C						A															G	G
4288	A																						
4313	G							A	G		A	G		A	A			A					
4314	C																						
4387	G	T	T				T																
4417	C																						
4441	G																					A	A
4486	T			C																		C	
4545	C																						
4553	A	T	G	G	G	G	G				G	G	G		G	A						G	G
4600	G																						
4609	C					T	T																
4645	G	A																					
4726	A	G	G	G	G	G	G				G	G	G		G	G	G	C	G	G	G	G	G
4735	T	C	C	C	C	C	C				C	C	C		C	C					C	C	C
4738	T																						

bp	U	44	45	46	53	68	77	1	21	30	5	36	59	83	91	67	72	85	7	26	88	10	41	
		U68468						AY559244						AF017059						U54691				
4757	C															T		T	T			A	A	A
4795	G																				A	C	C	A
4801	T																					C	C	
4810	T																							
4822	G	T	T	T	T					T		T												
4849	G	A	A	A	A				A	A	A	A	A	A						A	A			
4850	G															A								A
4851	T	A	A	A	A				A	A	A	A	A	A	A	A				A	A	A	A	A
4852	G															A								A
4855	T	C	C	C	C				C	C	C	C	C	C	C	C				C	C			A
4868	A															G								G
4874	C															T								G
4879	A	A	A	A	A				A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
4895	A															C								
4905	A															C								
4910	C	G	G	G	G		G				G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
4913																								
4921	C	T	T	T	T		T	T	T	T	T	T	T	T	T									T
4927	C	T	T	T	T	C	C	C	C	C	T	T	T	T	T									T
4953																								C
5248	T	A	A	A	A	T	T	A	A	A	A	A	A	A	A									
5266	T	C	C	C	C	T	T	C	C	C	C	C	C	C	C									
5422	C	T	T	T	T	C	C	T	T	T	T	T	T	T	T									
5436	G	C	C	C	C	G	G	C	C	C	C	C	C	C	C									
5437	C	T	T	T	T	C	C	T	T	T	T	T	T	T	T									
5484	G	A	A	A	A	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A									
5501																								
5522	C			A																				
5647	T	C	C	C	C			C	C		C	C												
5651																								
5665	T	G	G	G	G				G		G	G	G			G								
5689	G	A	A	A	A				A		A	A	A	A		A								
5695	A																							
5704	T	G	G	G	G				G			G												
5759	C																							
5767	G	C	C		C			C	C	C		C	C	C			G	C	C	C	C	C	C	C
5779	G																							
5788	C																							
5804	T																							
5815	C																							
5832	G	A																						
5839	T																							
5858	A																							
5860	C																							
5867	T	A	A		A				A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Tab. 18: Identifizierte Nukleinsäurepolymorphismen im *prtT*-Gen von 23 *Pg*-Isolaten aus Patientenproben (Isolat-Nr. angegeben) im Vergleich zur Literatursequenz S75942 (S).

bp	S	1	5	7	10	21	23	26	30	36	45	46	53	59	67	68	72	77	83	85	88	91	41	44	
		<i>prtT</i> Typ A																						<i>prtT</i> Typ B	
73	Ins	60	60			60	60	61d	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	61d	60	60		
93d	C	C	C			C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
103	C	-	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
105	A		C					C	C	C	C	C	C	C	C					C		C			T
110	G		T					T	T	T	T	T	T	T	T					T					
120	Ins	A	A					A	A	A	A	A	A	A	A					A					
145	G	A	A			A	A		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A					A
188	G		A						A	A	A	A	A	A	A					A					A
192	T																								
193	T																								
194	T																								
196	C								T	T															T
244	C	T	T			T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
247d	G	-	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
252	T	A	A			A	A		A											A		A			A
267	G						A							A						A					
270	T		C			C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
332	Ins	G	G			G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
336	C																								
365	A		T																						
366d	A	-	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
409	T	A	A			A			A	A			A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
422	A		G			G			G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
450	A	G				G			G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
453	C																								
467	G																								
478	G	A				A			A	A															A
481	G	A				A			A	A															A
535	A	G				G			G	G															A
550	G						A							A											A
703 i	T					Δ	T						T	T	T	Δ				T	T	T	T	T	T
715	C					T				T															
717	T								C																C
738	T						C																		
779	C	T				T			T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
796	G	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ
807	G	C	Δ	Δ	C	C	Δ	Δ	C	C	C	Δ	Δ	Δ	Δ	C	Δ	Δ	Δ	Δ	C	Δ	Δ	Δ	Δ

bp	S	1	5	7	10	21	23	26	30	36	45	46	53	59	67	68	72	77	83	85	88	91	41	44
808	C	A	C	C	A	A	C	C	A	A	A	C	C	A	C	A	C	C	C	A	A	C	C	C
814	G			A			A					A					A						A	A
829	A	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
836	A		G																					
838	A		G																					
846	T																	C						
890	C				T																T			
931	A				C																C			
944	C		T																					
946	T		C					C	C		C	C	C		C				C	C		C		C
954	A	T				T				T						T								
981	C				T																	T		
994	G			A	A		A										A				A			
1073	G																A					A		
1077	C				T		G										A					T		
1128	G	A		A	A	A	A	A	A	A	A		A		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
1132	G			A	A	A	A	A	A	A	A						A	A	A	A	A	A	A	A
1143	G	A		A	A	A	A	A	A	A	A		A		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
1158	C	T		T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
1213	A			G				G	G			G												
1221	A			G				G	G			G												
1222	G			A				A	A			A												
1224	C			T				T	T			T												
1225	A			G				G	G			G												
1233	A																						G	
1236	G																				A			
1239	C							T																T
1248	A			G								G												
1310	G									A						A								
1380	C	T				T	T		T	T	T		T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
1433	A	G	G		G	G	G	G	G	G	G		G	G	T	T	G	T	T	T	G	G	G	G
1439	A																							
1447	G												A											
1471	C												A											
1472	A																				T			
1485	A																							C
1491	T																							G
1494	G																							C
1497	C																							C
1500	T																							A
1501	A																							C
1507	A																							G
1508	G																							A
1509	C																							A
1512	G																							C
1523	A																							C
1524	C																							C
1525	A																							A
1527	C																							G
1528	A																							T
1529	G													A										G
1530	T																							A
1532	T																							A
1534	G																							A
1535	G																							A
1536	T																							A
1537	A																							C
1543	C																							G
1551	A																							A
1554	A																							G
1560	C																							C
1561	T																							A
1563	A																							C
1576	A																							C
1578	A																							C
1584	C																							A
1587	C																							A
1657	C	A	A			A	A			A						A								
1711	C																	T						
1721	A							G			G						G							
1915/1916	Ins										CG	CA					GG							
1925/1926	Ins										CG	CA					GG							
1976	C	A				A	A																	
1988	C			T	T														T				T	
1989	A			C	C														C				C	
2041	A																							G
2067	C			T				T						T										
2091	T																A							
2118	T		C	C	C		C																	
2121	C		T				T																	C
2142	G								A		A													
2185	G				A																			
2204	C									T														
2206	G																T							
2271	A																	G	G					A
2280	C										T		T	T			T	T						
2286	A						T				G		G	G			G	G						G
2295	A						G				G		G	G			G	G						
2298	G						A				A		A	A			A	A						
2370	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
2416	A																				C			

bp	S	1	5	7	10	21	23	26	30	36	45	46	53	59	67	68	72	77	83	85	88	91	41	44	
2430	T		C	C											C				C		C	C	C	C	C
2518	G								A		A														
2569	G																					C			
2574	C													T	T					T			T		
2577	C												T												
2589	G							A										A							
2611	G	T			T	T	T		T	T	T		T	C	C	T	T		A						
2657	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
2709	G													A	A					A	A	C	A	C	C
2712	T	C			C	C	C		C		C		C	C	C				C	A	C	A	C	C	
2718	C														T				A	C	T		C	T	
2829	T																								
2835	C								T		T											C			
2851	A									T														T	
2870	T		A	A								A												A	A
2917	C			A															A					A	A
2922	G			A																				A	A
3048	G																		A						
3060	T	C		C	C	C	C		C	C	C		C			C					C			C	
3084	G																				T				
3105	C												T												
3118	G	A			A	A																			
3128	Ins																					T	A	T	T
3192	C														T					T		T			T
3188	C								T		T										T				
3247	C	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ
3338	C			T																				Δ	Δ
3340	C	C	T	C	C	T	T	C	T	C	T	C	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T
3352	G					T	T							T	T					T		T	T	T	T
3366	C									A						A									
3367	G								A		A											A			
3382	G																	T							
3385	T		A			A	A	A	A	A	A	A	A	T	G	A	A	T	G	A	A	A	A	A	A
3388	G										A														
3390	G													T					T						
3391	A													C					C						
3396	C													T					T						
3399	A													C					C						
3415	A			G																					G
3416	C		T				T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
3429	T																								
3439	A									G															
3429	T																		C						

Δ Deletion einer Base im Vergleich zur Referenzsequenz
 Ins; i Insertion einer Base im Vergleich zur Referenzsequenz

Tab. 19: Über Sequenzierung ermittelte Subtypen des *tpr*-Gens in klinischen Isolaten von *Porphyromonas gingivalis* im Vergleich zur Literaturssequenz M84471.

bp	M	5	10	23	26	59	85	88	91	44	83	68	77	72	67	46	7	45	41	30	53	36	21	1	
		Typ M					Pg44		Pg83	Pg68	Pg77				Pg7				Pg36						
204	G						A	A																	
236	G										A		A	A	A	A							A	A	A
246	G										A												A	A	A
249	A										G												G	G	G
288	G																						A	A	A
309	A									G				G	G	G							G	G	G
313	A												G	G	G	G		G	G	G	G	G	G	G	G
317	C										T												G	G	G
321	A											G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
324	A											G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
344	C											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
355	G												A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
367	T												C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
377	C											A						T	T	T	T	T	T	T	T
378	A											C													
381	G																	C	C	C	C	C	C	C	C
403	A																		G						
405	T											A													
409	G											A													
410	T											A													
411	C											C													
420	A												G	G	G	G			G	G	G		G	G	G
441	C				T																		G	G	G
448	A										G														
468	C											T	T	T	T	T	T				T	T	T	T	T
477	T											C													
496iii	---									TAT	TAT		TAT	TAT	TAT	TAT									
497	C											G													
500	A											G													
511	G											C													
517	A											G					G	G	G	G	G		G	G	G
529	G											A					A	A	A	A	A		A	A	A
532	C											A													
533	A																						G	G	G
534	A																						G	G	G
543	G												A	A	A	A	A	A	A	A	A		A	A	A
546	C											T													
563	T											C											C	C	C

bp	M	5	10	23	26	59	85	88	91	44	83	68	77	72	67	46	7	45	41	30	53	36	21	1	
Typ M											Pg44	Pg83	Pg68	Pg77					Pg7				Pg36		
573	G											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
574	A											G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
575	C											G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
577	C											A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
592	G											A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
607	C											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
608	T											A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
614	C											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
616	T											C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
618	C											A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
644	A											G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
645	A											G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
658	G											A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
660	T											C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
682	C											A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
717	A											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
718	C																								
733	A											G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
753	G												A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
760	C											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
781	G																								
784	G									A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
787	A									C	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
788	A									C	C	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
789	T									C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
816	C																								
819	C									T		T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
825	A									G		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
840	C										T														
843	C									T		T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
844	T									C		C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
846	G									C		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
852	C										T		T	T	T	T									
856	G											A													
861	T									C		C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
864	A											G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
868	A									G		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
869	T											A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
871	G											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
872	C																								
875	G											C													
876	C											C													
880	T											G													
885	C																								
886	A																								
888	G																								
890	T																								
897	T																								
912	T																								
919	T																								
920	G																								
921	G																								
926	C																								
952	A																								
957	T																								
958	A																								
959	A																								
962	A																								
986	A																								
987	C																								
990	C																								
997	C																								
999	C																								
1000	T																								
1002	T																								
1003	A																								
1004	A																								
1005	A																								
1009	A																								
1010	C																								
1012	T																								
1015	G																								
1017	C																								
1018	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1019	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1020	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1023	G	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	T	T	T	
1024	C											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
1026	G											A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
1029	G											A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
1032	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
1038	T											C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
1040	C											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
1041	C											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
1063	G											C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
1064	A											T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
1078	G											C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
1098	T											C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
1099	C											A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
1110	C																								
1116	A																								
1122	C																								
1131	T																								
1140	A																								

bp	M	5	10	23	26	59	85	88	91	44	83	68	77	72	67	46	7	45	41	30	53	36	21	1	
Typ M											Pg44	Pg83	Pg68	Pg77	Pg7	Pg36									
1146	A											G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
1176	C		T																						
1181	A											T	T	T	T								T	T	T
1183	A											G	G	G	G										
1192	C											A	A	A	A								G	G	G
1193	T											A	A	A	A										
1194	A											T	T	T	T										
1197	G											T	T	T	T										
1201	G											T	T	T	T										
1202	G											C	C	C	C								C	C	C
1203	A											C	C	C	C								C	C	C
1204	G											C	C	C	C								C	C	C
1205	G											T	T	T	T										
1210	T											T	T	T	T										
1211	G											A	A	A	A								A	A	A
1212	G											T	T	T	T								T	T	T
1213	C											A	A	A	A										
1214	C											G	G	G	G										
1218	G											T	T	T	T								C	C	C
1230	C											T	T	T	T								C	C	C
1233	G											T	T	T	T								C	C	C
1245	T											C	C	C	C								C	C	C
1247	G											C	C	C	C										
1248	C											T	T	T	T								T	T	T
1255	A											T	T	T	T										
1256	C											G	G	G	G										
1257	C											-	-	-	-										
1258	T											-	-	-	-										
1259	C											A	A	A	A								A	A	A
1261	T											G	G	G	G								G	G	G
1262	C											-	-	-	-								A	A	A
1263	G											A	A	A	A								-	-	-
1264	G											-	-	-	-								-	-	-
1265	G											-	-	-	-								-	-	-
1266	A											C	C	C	C								T	T	T
1267	A											-	-	-	-								T	T	T
1269	A											T	T	T	T								T	T	T
1270	C											T	T	T	T								T	T	T
1271	T											A	A	A	A								A	A	A
1271iiii	-											G	A	A	A								A	A	A
1272	C											acgctg	A	A	A										
1274	T											C													
1275	G											A													
1281	T											C													
1282	T											C													
1283	C											G													
1284	T											A													
1286	T											A													
1287	C											A											T	T	T
1294	C											G													
1295	T											A											A	A	A
1296	G											T											A	A	A
1297	T											A											A	A	A
1299	A											A													
1302	G											T													
1304	T											G													
1309	T											C													
1310	T											C													
1314	G											A													
1315	A											T											G	G	G
1316	A											T													
1318	A											T													
1319	G											G													
1321	A											C											A	A	A
1322	T											C													
1327	T											A											G	G	G
1329	T											A											G	G	G
1330	A											T											G	G	G
1331	G											T											A	A	A
1332	T											C													
1333	T											C											A	A	A
1343	T											C													
1345	A											A											A	A	A
1346	A											G											T	T	T
1347	A											T													
1350	G											C													
1356	G											A											T	T	T
1360	G											T											T	T	T
1361	T											C											C	C	C
1364	C											G													
1365	C											G													
1366	C											-													
1367	C											-													
1368	A											-													
1369	T											-													
1370	G											-											A		A
1371	C											-													
1372	T											-											A	A	A
1373	G											-											A	A	A
1374	G											-											C	C	C
1376	A											C											C	C	C
1377	G											C											T	T	T
1378	C											A											T	T	T
1380	T											A											T	T	T

bp	M	5	10	23	26	59	85	88	91	44	83	68	77	72	67	46	7	45	41	30	53	36	21	1		
Typ M											Pg44	Pg83	Pg68	Pg77				Pg7					Pg36			
1381	C											A														
1382	T											A														
1383	A											G														
1384	C																									
1385	C											A														
1386	T																									
1387	C																									
1388	C											A														
1389	T											-														
1390	A											-														
1391	T											-														
1392	G											-														
1396	C																									
1397	C																									
1405	G																									
1406	C																									
1408	G											T														
1409	C											C														
1411	T											A														
1412	A																									
1416	T																									
1431	G											G														
1436	A																									
1441	G											A														
1442	T											T														
1447	A											A														
1452	A											T														
1454	C										T	T														
1460	A											A														
1462	C											T														
1474	A											A														
1480	T											G														
1481	G											C														
1482	G											A														
1486	G											T														
1487	T											T														
1488	G											A														
1489	A											G														
1490	C											G														
1512	C											A														
1518	G		T									T														
1535	T			T								T														
1536	C											G														
1545	T											A														
1548	T											C														
1550	T											A														
1551	G											A														
1556	G											A														
1557	G											A														
1573	G											C														
1584	T											A														
1593	C											C														
1597	C											T														
1602	T																									
1608	G											A														
1609	A																									
1612	G											C														
1614	G											A														
1617	C																									
1621	T											C														
1623	G																									
1631	C																									
1640	A											G														
1643	G											T														