

**Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. Matthias Frosch**

Kulturunabhängige 16S rRNA Analyse des subgingivalen bakteriellen Biofilms bei der aggressiven Parodontitis

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg**

**vorgelegt von
Gerhard J. Hutter
aus Ellwangen/Jagst**

Würzburg, August 2008

Referent: Prof. Dr. med U. Vogel

Korreferent: Prof. Dr. med. dent. U. Schlagenhauf

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 05. August 2008

Der Promovend ist Arzt

Ein Teil der während der Dissertation erzielten Ergebnisse ist in folgender Publikation veröffentlicht:

„Molecular analysis of bacteria in periodontitis: evaluation of clone libraries, novel phylotypes and putative pathogens“. Hutter G, Schlagenhaut U, Valenza G, Horn M, Burgemeister S, Claus H, Vogel U. Microbiology. 2003 Jan;149:67-75.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form bei einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Des weiteren erkläre ich, dass ich früher weder akademische Grade erworben noch zu erwerben versucht habe. Weder ein strafrechtliches Ermittlungsverfahren, noch ein Disziplinarverfahren wurde gegen mich eingeleitet.

Würzburg, den 28.08.08

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1 Einleitung	1
1.1 Analyse komplexer mikrobiologischer Ökosysteme	1
1.2 Parodontitis	3
1.2.1 Therapie der Parodontalerkrankungen	6
1.3 Der parodontale Biofilm	7
1.3.1 Bildung und Zusammensetzung	7
1.3.2 Kommunikation	8
1.3.3 Koadhäsion und Koaggregation	8
1.3.4 Resistenz und Persistenz	9
1.4 Die parodontale Mikroflora	10
1.5 Ziele dieser Arbeit	14
Kapitel 2 Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Bezugsquellen von Laborgeräten und Labormaterialien	15
2.1.2 Laborgeräte	16
2.1.3 Verbrauchsmaterial	17
2.1.4 Chemikalien und Reagenzien	18
2.1.5 Verwendete Kits	20
2.1.6 Zusammensetzung häufig verwendeter Lösungen	20
2.1.7 Oligonukleotide	21
2.1.8 Medien für bakterielle Kulturen	22
2.1.9 Verwendete Software	22
2.1.10 Neuentdeckte Nukleotidsequenzen	23
2.2 Methoden	23
2.2.1 Untersuchte Personen	23
2.2.2 Probenmaterial	26
2.2.2.1 Entnahme und -verarbeitung	26
2.2.2.2 DNA Aufreinigung und Amplifikation der 16S rRNA Gene	26
2.2.2.3 Eubakterielle PCR der bakteriellen DNA	26
2.2.2.4 Nachweis des Amplifikats durch elektrophoretische Auftrennung	27
2.2.2.5 Aufreinigung der PCR Produkte	27
2.2.2.6 Klonierung von 16S rRNA Genfragmenten	27
2.2.3 Amplifikation der Inserts	30
2.2.4 Sequenzierung	30
2.2.5 Sequenzanalyse	31
Kapitel 3 Ergebnisse	35
3.1 Auswertung der Klonbanken der Parodontitis	35
3.2 Vergleich der bakteriellen Spektren beider Kollektive	42
3.3 Neuartige Sequenzen	48

Kapitel 4 Diskussion	51
4.1 Untersuchungsmethoden	51
4.2 Vergleich fakultativer Pathogene anderer Studien	54
4.3 Schlussfolgerung	59
Kapitel 5 Anhang	61
Literaturverzeichnis	63
.....	70
Abkürzungen	71
Die Klonbanken der Parodontitispatienten	75
Zusammenfassung	A
Summary	B
Danksagung	C
Lebenslauf	D

Liste der Abbildungen

Kapitel 1 Einleitung	1
Abbildung 1-1. Gesundes und krankes Parodontium	4
Kapitel 2 Material und Methoden	15
Abbildung 2-1. Position eubakterieller 16S rRNA Primer am 16S rRNA Gen	27
Abbildung 2-2. Flussdiagramm der Sequenz- und phylogenetischen Analysen	32
Kapitel 3 Ergebnisse	35
Abbildung 3-1. Akkumulationskurve für Klonbanken von Parodontitispatienten	37
Abbildung 3-2. Etablierte bakterielle Arten und deren Verteilung im Patientenkollektiv	38
Abbildung 3-3. Repräsentationen bakterieller Familien nach Klonbank	41
Abbildung 3-4. Akkumulationskurve für die Klonbanken gesunder Probanden	43
Abbildung 3-5. Vergleich der identifizierten Phyla	44
Abbildung 3-6. Vergleich der identifizierten bakteriellen Familien	45
Abbildung 3-7. Bakterielle Familien parodontal Gesunder: Klonbank 27f/519r, 515f/1525r	46
Abbildung 3-8. Bakterielle Familien des gesunden und des erkrankten Kollektivs im Vergleich ..	47
Abbildung 3-9. Pylogenetischer 16S rRNA Stammbaum	49
Kapitel 4 Diskussion	51
Kapitel 5 Anhang	61

Liste der Tabellen

Kapitel 1 Einleitung	1
Kapitel 2 Material und Methoden	15
Tabelle 2-1. Bezugsquellen geordnet nach Firmen	15
Tabelle 2-2. Eubakterielle 16S rDNA spezifische Oligonukleotide	21
Tabelle 2-3. pBluescript spezifische Oligonukleotide	21
Tabelle 2-4. Oligonukleotide spezifisch für Klon 10B6	21
Tabelle 2-5. Charakterisierung des Patientenkollektivs	24
Tabelle 2-6. Charakterisierung des Kontrollkollektivs	25
Tabelle 2-7. Vergleich von Patienten- und Kontrollkollektiv	25
Kapitel 3 Ergebnisse	35
Tabelle 3-1. Eigenschaften der Klonpopulationen der Parodontitispatienten	36
Tabelle 3-2. Die Klonpopulation 27f/519r der Parodontitispatienten	39
Tabelle 3-3. Die Klonpopulation 515f/1525r der Parodontitispatienten	40
Tabelle 3-4. Fisher's exakter Test für taxonomische Familien	41
Kapitel 4 Diskussion	51
Tabelle 4-1. Vergleich mit putativen Pathogenen von Paster et al. (2001)	56
Kapitel 5 Anhang	61
Tabelle 5-1. Klone des Primerpaars 27f/519r	75
Tabelle 5-2. Klone des Primerpaars 515f/1525r	86

1 Einleitung

1.1 Analyse komplexer mikrobiologischer Ökosysteme

Nur etwa 0,1 - 1 % (derzeit ca. 4000) der natürlich vorkommenden Prokaryonten sind gegenwärtig kultivierbar (Amann *et al.*, 1995). Kultivierbare Mikroorganismen stellen also nur einen Bruchteil der mikrobiologischen Gemeinschaft und deren Vielfalt dar, die sich in den letzten ca. 3,8 Milliarden Jahre entwickelt hat. Um Bakterien mittels einer kultivierungsunabhängigen Methode zu differenzieren, bedarf es eines phylogenetischen Markermoleküls, das mit der phylogenetischen Entwicklung von Organismen korreliert. Das geeignete Markermolekül wurde in der ribosomalen RNA gefunden. Die erste erfolgreiche Anwendung dieser Methode gelang Lane, D.J. *et al.*, (1985). Carl Woese (1987) entwickelte die ersten phylogenetischen Stammbäume auf der Basis der 16S rRNA und konnte erste verwandtschaftliche Beziehungen unter den Prokaryonten herstellen. Mit der Entwicklung der PCR (polymerase chain reaction = Polymerase-Kettenreaktion) durch Saiki, R. K. *et al.*, (1988) war eine Möglichkeit geschaffen, ausgesuchte Gene oder Genfragmente aus einem DNA Gemisch zu amplifizieren und einer genauen Untersuchung zuzuführen. Weitere molekularbiologische Entwicklungen erleichterten die kulturunabhängige Identifikation von Prokaryonten zusätzlich. Kulturunabhängige Analysen bakterieller rRNA Gene haben einen Einblick ermöglicht in die Zusammensetzung gemischter mikrobieller Gemeinschaften in der Umwelt und in tierischen Lebewesen (Chapelle *et al.*, 2002; Giovannoni *et al.*, 1995; Hugenholtz *et al.*, 1998a; Kroes *et al.*, 1999; Leser *et al.*, 2002; Reysenbach *et al.*, 1992; Ward *et al.*, 1990). Die Bestimmung der rRNA hat sich als verlässlicher phylogenetischer Marker erwiesen. Gegenwärtig wird die molekular-genetische Analyse der rRNA verschiedener Habitats routinemäßig in vielen Labors weltweit angewandt. Öffentlich zugängliche Datenbanken mit umfangreichen Datensätzen können der Auswertung und phylogenetischen Analyse von rRNA Sequenzen dienen: Das *Ribosomal*

Database Project (RDP-II) der Michigan State University (<http://rdp.cme.msu.edu>) beispielsweise bietet derzeit 5000 rRNA Sequenzen; die Datenbank *ARB* (entwickelt an der TU München von Strunk und Ludwig im Jahre 1996 und öffentlich zugänglich über <http://www.biol.chemie.tu-muenchen.de/pub/ARB/>) beinhaltet derzeit 15.000 Sequenzen der 16S/18S und 23S rRNA. Eine weitere Datenbank, das RIDOM (Ribosomal Differentiation of Microorganisms) zuerst beschrieben von Harmsen *et al.*, (1999) bietet die Differenzierung medizinisch wichtiger Mikroorganismen anhand von 16S rRNA Sequenzen über einen Webserver (<http://www.ridom.de>). Diese Datenbank zeichnet sich weniger durch Umfang, als durch ihre Qualität basierend auf strenger Eingangskontrolle der gesammelten Daten aus.

Die rRNA bietet also eine Möglichkeit der Identifikation und Klassifikation von Mikroorganismen, welche sonst nur erschwert oder gar nicht kultivierbar sind. Jedoch hat die Methode auch bekannte Einschränkungen: Bestimmte Bakterien lassen sich mit der rRNA Technik nicht oder nur bedingt nachweisen, wenn sie z.B. einen hohen GC Gehalt aufweisen (Baskaran *et al.*, 1996), wenn es in der Aufbereitung nicht gelingt, die Zelle adäquat zu lysieren oder wenn ein Primer nicht oder nur bedingt an das „Template“ (der zu vervielfältigende DNA Abschnitt) anlagern kann. Einen weiteren Einfluss auf die Zusammensetzung von 16S rRNA Klonbanken konnte Chandler *et al.*, (1997) für die Konzentration der zu amplifizierenden DNA beobachten. So kann das Ergebnis der Analyse eines komplexen Bakteriengemisches ein deutliches Bias aufweisen und die Quantifizierung der nachgewiesenen Bakterien erschweren oder unmöglich machen. Durch die Anwendung eines zweiten Primerpaars kann ein derartiges Bias offensichtlich und limitiert werden (Suzuki & Giovannoni, 1996; Marchesi *et al.*, 1998). Weiterhin kann es aufgrund mehrerer Faktoren zu qualitativen Einschränkungen und dadurch zu fehlerhaften Nachweisen von Mikroorganismen kommen: Beispielsweise kann es zu einer Chimärenbildung kommen, wenn Bruchstücke von Templates in einer konservierten Region hybridisieren und dadurch ein artifizierender Genabschnitt unterschiedlicher Herkunft entstehen (Shuldiner *et al.*, 1989; Liesack *et al.*, 1991; Kopczynski *et*

al., 1994). Wird die Amplifikation von DNA mit einer nicht *proofreading* DNA-Polymerase durchgeführt, kommt es zu einer erhöhten Fehlerrate, die mit der Zahl der PCR-Zyklen exponentiell steigt (Lundberg *et al.*, 1991). Einen Einfluss haben weiterhin die Anzahl der *rrn* Operons in Abhängigkeit der Größe des Genoms (Farrelly *et al.*, 1995). Die Identifikation einer Bakterienspezies anhand einer einzigen rRNA Sequenz ist daher nicht unproblematisch, da diese *rrn* Operons untereinander über eine nachgewiesene Heterogenität verfügen. Damit eine genaue phylogenetischen Einordnung gelingen kann, sollte die Sequenzlänge größer als 350 bp sein, wenn Sequenzen der Spezies bereits vorhanden sind und deutlich länger, wenn es sich um eine bisher unbekannte Spezies handelt (Cilia *et al.*, 1996).

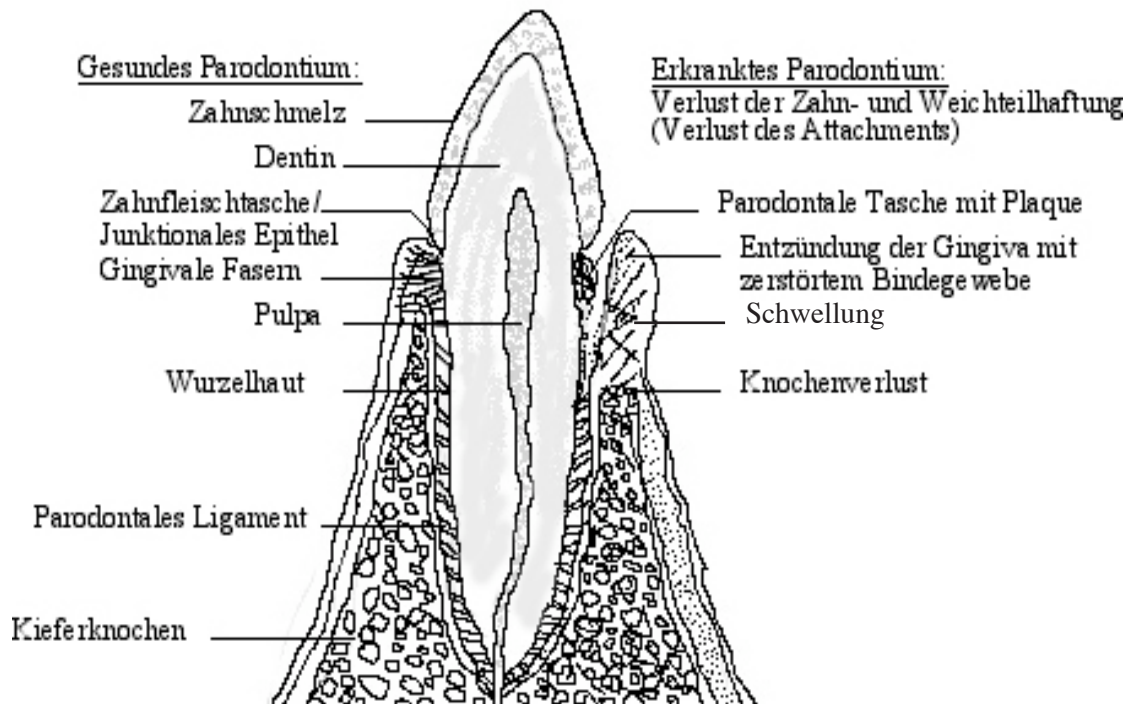
1.2 Parodontitis

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den potentiellen bakteriellen Verursachern der Parodontitis, also der Entzündung des Zahnhalteapparates. Die Vielfalt der bakteriellen Mundflora von > 500 Bakterien (Kolenbrander, 2000) ist für ihre Erforschung eine Herausforderung, insbesondere wenn sich in dieser Umgebung ein Krankheitsprozess wie die Parodontitis entwickelt. Das Parodontium besteht aus ligamentären Bindegewebsfasern, welche die Zahnwurzel mit dem umgebenden Knochen verbinden (Desmodont) und im Bereich des Zahnhalses eine Verbindung von Zahn und der umgebenden Schleimhaut (Gingiva) herstellen. Darüber bedeckt der Zahnschmelz wie eine schützende Kappe den sichtbaren Zahn. Am Übergang von Gingiva und sichtbarem Zahn verbleibt eine physiologische Zahntasche, der Sulkus, welcher bei Gesunden bis etwa 1 mm sondierbar ist und von junktionalem Epithel bedeckt ist. Die Parodontitis, eine weit verbreitete Erkrankung der Mundhöhle, ist eine meist chronisch verlaufende Entzündung des Zahnhalteapparates, die eine charakteristische bakterielle Besiedelung mit Bildung eines subgingivalen und supragingivalen Plaques (weicher oder mineralisierter Biofilm über oder unterhalb des Zahn-

fleischniveaus) aufweist. Die Parodontitis führt zur Zerstörung des bindegewebigen und knöchernen Zahnhalteapparates und im Endstadium zu Zahnverlust.

Die folgende Abbildung zeigt schematisch die Schädigung des Zahnhalteapparates:

Abbildung 1-1. Gesundes und krankes Parodontium



Die verschiedenen parodontalen Erkrankungen unterscheiden sich in Ätiologie, Verlauf und Ansprechen auf eine Therapie, aber sie zeigen alle Ähnlichkeiten in ihrer Histopathologie und Klinik (Page, R.C. und Schroeder, H.E., 1977). Page und Schroeder teilten die parodontalen Erkrankungen ein, in ein initiales, ein frühes und ein etabliertes Stadium (mit jeweils einer charakteristischen Gingivitis) und in ein fortgeschrittenes Stadium, welches das komplette Bild der Parodontitis zeigt. Im initialen und frühen Stadium erfolgt die Plaquebildung im gingivalen Sulkus und daraufhin eine verstärkte Migration von Leukozyten und Neutrophilen in das junctionale Epithel und das darunterliegende Bindegewebe. Es resultiert ein Verlust kollagener Fasern und eine Veränderung der Fibroblasten in der randständigen Gingiva. Eine Proliferation der Basalzellen des junctionalen Epithels ist zu beobachten. Im etablierten Stadium dominieren Plasmazellen. Der Bindegewebsverlust setzt sich fort und das junctionale Epithel wandert nach apikal und wandelt

sich zu Taschenepithel um. Im fortgeschrittenen Stadium tritt Knochendestruktion, Bindegewebsverlust in der Gingiva und dem parodontalen Ligament, Bildung von parodontalen Taschen und verschiedene Entzündungsreaktionen ein.

Nach der aktuellen Klassifikation durch den „International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions“ vom 30.10. bis 2.11.1999 in Oak Brook, Illinois, USA, welche auch von der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie übernommen wurde, werden acht Formen zu den parodontalen Erkrankungen gezählt (Armitage, G.C.,1999). Gemeinsam ist ihnen, dass eine anhaltende Entzündungsreaktion zu einer Schädigung des Zahnfleisches und Degradation des Parodonts führt, mit der Folge einer Ablösung des Zahnfleisches vom Zahnhals (Attachmentverlust), der Ausbildung einer parodontalen Zahntasche, welche mehr als 1 mm tief sondierbar ist, einer Zahnfleischblutung bei geringer Reizung, wie dem Sondieren der Zahntasche (bleeding on probing, BOP), der Bildung eines subgingivalen und supragingivalen Plaques, der Bildung von Eiter, des verstärkten Knochenabbaus und letztlich dem Zahnverlust.:

1. Gingivale Erkrankung (G)
2. Chronische Parodontitis (CP)
3. Aggressive Parodontitis (AP)
4. Parodontitis als Manifestation einer Systemerkrankung (PS)
5. Nekrotisierende Parodontalerkrankung (NP)
6. Parodontale Abszesse
7. Parodontitis im Zusammenhang mit endodontalen Läsionen
8. Entwicklungsbedingte oder erworbene Deformationen und Zustände

Aufgrund des Patientenkollektives in dieser Arbeit wird hier die Klassifikation der Aggressiven Parodontitis - (nach Armitage, G.C.,1999) näher erläutert: Die AP tritt meist bei Menschen auf, die

jünger als 35 Jahre sind. Entsprechend der Ausdehnung werden zwei Formen der AP unterschieden: Die lokalisierte AP, welche häufig während der Pubertät mit Befall der ersten Molaren und zentralen Inzisiven beginnt, und die generalisierte AP, bei der mehr als 30% der Zähne betroffen sind. Die AP ist gekennzeichnet durch einen rapiden Attachmentverlust und Knochendestruktion. Die betroffene Person ist abgesehen von der Parodontitis klinisch gesund. Neben einer auffälligen familiären Häufung, kann eine abnormale Phagozytenfunktion und eine erhöhte Produktion von PGE2 und IL-1 β vorliegen. Weitere klinische Zeichen können sein: Ein größeres Ausmaß an Gewebedestruktion als lokale Faktoren es erwarten ließen und eine verstärkte Besiedlung durch *A. actinomycetemcomitans* oder *P.gingivalis*. Nach dem klinisch nachweisbaren Attachmentverlust (clinical attachment loss = CAL) gibt es drei Schweregrade der AP: Leicht: CAL 1-2 mm; moderat: CAL 3-4 mm und schwer: CAL > 5 mm. Die Diagnose der AP erfolgt aufgrund klinischer, radiologischer und histologischer Befunde.

1.2.1 Therapie der Parodontalerkrankungen

Die „Guidelines for Periodontal Therapy“ der American Academy of Periodontology von 2003 empfehlen die Anleitung des Patienten zur oralen Hygiene und die Vermeidung von Risikofaktoren wie z.B. Rauchen, Diabetes mellitus, immunsupprimierende Erkrankungen und psychischer Stress. Supra- und soweit erreichbar subgingivale Plaque sollte regelmäßig entfernt werden. Falls Unregelmäßigkeiten der Zahnwurzeloberfläche vorhanden sind, sollten diese chirurgisch therapiert werden. Eine begleitende antibiotische Chemotherapie kann unter Umständen indiziert sein, sowie die Behandlung systemischer Erkrankungen, welche zur Parodontitis beitragen. Andere Zahnerkrankungen wie Karies, Kieferfehlstellungen, mangelhafte Versorgung mit Zahnprothesen usw. sollten therapiert werden. Chirurgische Resektionen im Weichteil- und Knochenbereich können notwendig sein, sowie regenerative und rekonstruktive Maßnahmen zur Defektdeckung oder chirurgisch-ästhetische und okklusalkieferchirurgische Maßnahmen. Als Ultima Ratio wird die Zahnextraktion empfohlen.

1.3 Der parodontale Biofilm

1.3.1 Bildung und Zusammensetzung

Biofilme sind eine ubiquitär verbreitete Lebensform von Mikroorganismen und können unterschiedlich zusammengesetzt sein. Gemeinsam ist den meisten Biofilmformen, dass sie aus Mikroorganismen (Bakterien, Pilze, Viren, Einzeller) und einer hydrierten, polymeren, extrazellulären Matrix, die von den Mikroorganismen selbst gebildet wird, bestehen. Im Gegensatz zu planktonischen, also freiflotierenden Bakterien, haftet ein bakterieller Biofilm an einer Oberfläche und ist zusammengesetzt aus Bakterien einer drei-dimensionalen Gemeinschaft. Die Plaquebildung oraler Oberflächen beginnt auf einer dünnen Schicht aus Mucopolysacchariden des Speichels (dem Pellicel), welches schon innerhalb von Stunden von *Actinomyceten* und *Streptococcen* und schrittweise weiteren Bakterien besiedelt wird (Moore & Moore, 1994). Oraler Biofilm kann einschichtig sein, wie der bakterielle Monolayer auf oralem Epithel, oder mehrschichtig bis zu mehreren hundert Mikrometer dick sein, z.B. wenn er auf der harten Oberfläche eines Zahns ungestört wachsen kann. Dagegen führt das ständige Abschilfern des Epithels zur Entfernung oder Verminderung des Biofilms (Kolenbrander, 2000). Die Struktur von Biofilmen ist von Kanälen durchzogen, in denen möglicherweise Nährstoffe zirkulieren können (DeBeer *et al.*, 1994). Ein Charakteristikum der Parodontitis ist der mehr oder weniger ausgeprägte Biofilm, der mit der Krankheitsausbildung einhergeht: Die Ausbildung von oralem Biofilm findet immer statt, sie allein ist jedoch nicht für parodontale Krankheit oder Gesund entscheidend. Während sich dieser Biofilm beim Gesunden meist aus gram-positiven, aerob wachsenden Bakterien zusammensetzt, supragingival und ohne Gewebstestruktion wächst, verändert sich das Keimspektrum im parodontalen Biofilm erheblich zugunsten gram-negativer und anaerob wachsender Bakterien und wächst von Gewebstestruktion begleitet subgingival. Die Ursachen der veränderten Keimzusammensetzung des parodontalen Biofilms sind ungeklärt: Diskutiert werden Faktoren wie Ernährung, orale Hygiene, Rauchen, genetische Disposition, immunologische Defekte, Alterungsprozesse und Systemerkrankungen.

1.3.2 Kommunikation

Shapiro äußerte schon 1988, dass es sich bei Bakterien um interaktive Organismen mit kollektiver Aktivität handeln müsse. Diese als *Quorum sensing* bezeichnete Fähigkeit konnte durch Devine *et al.*, 1988 bewiesen werden mit dem Nachweis von durch *Vibrio fischeri* gebildete Substanzen, die der Kommunikation der Organismen dienen. Bei verschiedenen gram-negativen Bakterien interagieren azylierte Homoserinlaktone (AHLs) als extrazelluläre Signalsubstanzen am AHL Rezeptor (Swift *et al.*, 1996). Zyklische Dipeptide, die Diketopiperazine (DKPs), sind weitere Signalsubstanzen, die wie die AHLs am AHL Rezeptor binden können (Holden *et al.*, 1999). Bakterielle Mikroorganismen, die im gesamten Mundraum in hoher Zahl physiologisch vorhanden sind, steuern dadurch die Besiedlung von Schleimhäuten und Zahnoberflächen und bilden so in kurzer Zeit Biofilme. Nachgewiesen wurde die Abhängigkeit der Biofilmregulation von AHLs durch Davies *et al.*, (1998): eine Mutante von *P. aeruginosa* mit gestörter AHL Produktion z.B. führte zu einer weniger stabilen Gestaltung des Biofilms. Über die Störung der AHL Regulation mittels halogenierter Furanone, welche von *Delisea pulchra*, einer roten Seealgenart gebildet werden, gelang Manefield *et al.*, (1999) eine Hemmung von marinem Biofilm gram-negativer Organismen.

1.3.3 Koadhäsion und Koaggregation

Orale Biofilme bestehen aus unterschiedlichen Bakterien, die sich je nach Substratangebot und ihren Bedürfnissen entsprechend zusammenlagern. Je nach Substratangebot, welches u.a. durch die Diffusion innerhalb eines Biofilms bestimmt wird, haben die Bakterien einen gesteigerten oder reduzierten Stoffwechsel und vermehren sich entsprechend. Intermittierend lösen sich Bakterien aus dem Verband in die Umgebung, werden also zu planktonischen Bakterien, die z.B. im menschlichen Körper eine Bakteriämie erzeugen können. Bestimmte Bakterien sind in der Lage mit anderen Bakterien spezifisch eine Koaggregation einzugehen. Sie haften aneinander und bilden sogenannte Komplexe (oder Cluster), um gegenseitig von metabolischen Stoffwechselprodukten

zu profitieren. *Fusobacterium nucleatum* stellt dabei eine Besonderheit dar, denn es ist in der Lage mit jedem bekannten oralen Bakterium zu koaggregieren (Kolenbrander *et al.*, 1989). Eine besonders wichtige Koaggregation für Anaerobier ist diese mit Sauerstoff verbrauchenden oder Sauerstoff toleranten (fakultativ anaeroben) Spezies, wodurch strikt anaerobe Spezies wie z.B. *F. nucleatum* in einem aeroben Milieu überleben können.

1.3.4 Resistenz und Persistenz

Costerton postulierte, dass etwa 60% aller humanen Infektionen mit der Bildung eines Biofilms einhergehen (Costerton *et al.*, 1999). Auch wenn diese Zahlen übertrieben sein mögen, zählen prominente Krankheitsbilder wie die Mukoviszidose, viele nosokomiale Infektionen (diese sind häufig mit Fremdkörpern wie Kathetern assoziiert), die Osteomyelitis und auch die Parodontitis hierzu. Der Organismus verfügt über unterschiedliche Mittel, um Biofilm zu kontrollieren. Dies sind mechanische Abwehrmaßnahmen, wie z.B. der Speichel, oder die Nahrung selbst, welche mit der Zerkleinerung durch die Kaumechanik oralen Biofilm entfernen kann, und immunologische Abwehrmaßnahmen wie antibakterielle Stoffe des Speichels (z.B. Lysozym und Laktoperoxidase), sowie von den Gefäßen des umgebenden Gewebes heran transportierte Immunabwehrzellen (Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen), Entzündungsmediatoren, Antikörper und Komplement. Im Falle parodontaler Biofilme sind auch Hygienemaßnahmen wie das Zähneputzen oder professionelle Zahnreinigung wirksam, welche die mikrobielle Besiedlung oraler Oberflächen zu stören. Häufig ist die Entfernung einer bewachsenen Fremdkörperoberfläche, z.B. ein Katheter bei Katheter-assoziierten Infekten, notwendig. Die Zahnextraktion in der Parodontitis gilt jedoch als Ultima ratio.

Biofilm ist gekennzeichnet durch eine hohe Umweltresistenz z.B. gegenüber Antikörpern, Phagozyten, Oxidanzien und Antibiotika, welche auf den chemisch - physikalischen Eigenschaften der extrazellulären Matrix beruht. Diese verlangsamt die Diffusion z.B. antimikrobieller Oxidanzien,

wie sie von Phagozyten stammen, und deaktiviert sie schon in den äußeren Schichten des Biofilms (DeBeer *et al.*, 1994). Costerton ist überzeugt, dass andere Wege in der Bekämpfung von Biofilm-induzierten Infektionen beschritten werden müssen, als beispielsweise die Anwendung von Antibiotika, welche anhand planktonischer Bakterienmodelle entwickelt wurden (Costerton *et al.*, 1999). Antimikrobielle Substanzen können demnach nur eingeschränkt und außerhalb des Biofilms wirksam sein, wo sie das Zielgebiet ausreichend penetrieren können. Eine Beseitigung bestehenden Biofilms durch Antibiose ist also aufgrund der Impermeabilität von Biofilm nicht möglich. Costerton *et al.*, (1999) hat die Persistenz von Biofilm-assoziierten Infektionen näher betrachtet. Bakterien, welche sich in einem minimierten Stoffwechszustand befinden, sind gegenüber Umwelteinflüssen besonders resistent. Sie werden als VBNC bezeichnet („viable but non-culturable“), da sie besonders schwierig oder gar nicht kultivierbar sind. Verbessern sich deren Umweltbedingungen können sie aktiv und krankheitsauslösend werden. Ein weiterer Faktor der Resistenz und Persistenz von Biofilm ist der Gentransfer und die gesteigerte Genexpression der Mikroorganismen unter Biofilmbedingungen, welcher unter verschiedenen bakteriellen Spezies stattfinden kann und so die Pathogenitätsfaktoren steigert, die wiederum das Bestehen des gesamten Biofilms verbessern können (Davies, J. *et al.*, 1994; Ralph & McClelland, 1994). Bestimmte orale Bakterien sind in der Lage in die Epithelien einzudringen (Lamont *et al.*, 1992) und entziehen sich so einer extrazellulären Abwehr.

1.4 Die parodontale Mikroflora

Um die Ursachen der Parodontitis untersuchen zu können, ist die Identifikation möglicher beteiligter Bakterien notwendig. Bis vor wenigen Jahren waren dazu umfangreiche Kultivierungsversuche notwendig: Dzink J.L. *et al.*, (1988) konnte mittels kulturabhängiger Methoden folgende Bakterien mit einer progressiven Parodontitis assoziieren: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (nach Reklassifikation durch Nørskov-Lauritsen, N. und Mogens Kilian, M. (2006): vormals

Actinobacillus actinomycetemcomitans), *Campylobacter rectus*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* und *Tannerella forsythensis* (vormals *Bacteroides forsythensis*). Moore & Moore, (1994) untersuchten mittels kultureller Methoden 51.000 (!) Proben aus dem gingivalen Sulkus von parodontal gesunden und kranken Menschen, und konnten 509 verschiedene Bakterien, mit einer Bakterienmenge in den parodontalen Taschen bis fast 10^9 / mg nachweisen. Sie stellten fest, dass möglicherweise 28 verschiedene Bakterien, dazu weitere fünf *Treponema spp.* und eine *Mycoplasma sp.* eine Rolle bei der Entwicklung parodontaler Erkrankungen spielen. Als Initiator gingivaler Entzündung und parodontaler Erkrankungen wurde *F. nucleatum* fast immer verantwortlich gemacht. Dabei geht die Erkrankung von Zahnfleisch und Parodontium einher mit einer qualitativen und quantitativen Veränderung in der Zusammensetzung der oralen Mikroflora: Bei der Parodontitis nimmt die Zahl der Bakterien ab, welche bei Zahngesundheit dominieren (meist gram-positive, aerobe Spezies) und es treten vor allem gram-negative, sowie anaerobe und fakultativ anaerobe Bakterien in den Vordergrund.

Mittels Kultur unabhängiger „Schachbrett“ DNA-DNA Hybridisierung untersuchten Socransky *et al.*, (1998) über 13000 (!) Plaqueproben und konnte einen mikrobiologischen Komplex (oder Cluster) bestehend aus *Tannerella forsythensis*, *Porphyromonas gingivalis* und *Treponema denticola* nachweisen, welcher in einer strikten Relation mit der Ausprägung der Parodontitis steht und eng mit einem Komplex aus *F. nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros* und *Eubacterium nodatum* in Verbindung steht. Mit parodontaler Gesundheit dagegen sind folgende zwei Komplexe assoziiert, bestehend aus *Veillonella parvula* und *Actinomyces odontolyticus* bzw. *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* und *Streptococcus sanguis* sind.

Mittels DNA-Sequenzierung des 16S rRNA Gens wurden innerhalb der medizinisch wichtigen Gemeinschaften besonders die Mundflora untersucht (Choi *et al.*, 1994, 1996; Dewhirst *et al.*, 2000; Dymock *et al.*, 1996; Harper Owen *et al.*, 1999; Hugenholtz *et al.*, 1998a; Jung *et al.*, 2000;

Kroes *et al.*, 1999; Paster *et al.*, 2001; Rolph *et al.*, 2001; Sakamoto *et al.*, 2000; Socransky *et al.*, 1994; Spratt *et al.*, 1999; Tanner *et al.*, 1994; Wade *et al.*, 1997; Ximenez-Fyvie *et al.*, 2000). Mehrere Studien oraler Bakterien haben die überwältigende Vielfalt von Spezies in der mikrobiologischen Gemeinschaft aufgezeigt, die mit der Parodontitis assoziiert werden. Kroes *et al.*, (1999) konnten bei einem Patienten, welcher an einer milden Gingivitis litt, mittels einer Sequenzanalyse klonierter 16S rRNA-Fragmente 59 verschiedene Phylotypen (definiert als eine Gruppe von Sequenzen mit einer Ähnlichkeit von mindestens 99%) nachweisen, welche zu den *Bacilli*, *Clostridia*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* und *Epsilonproteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Spirochaetes* und *Chlamydiales* gezählt wurden. Sakamoto *et al.*, (2000) fand bei zwei Patienten mit adulter bzw. rapid fortschreitender Parodontitis Bakterien gehörend zu *Bacilli*, *Clostridia*, *Actinobacteria*, *Alpha-*, *Beta-* und *Epsilonproteobacteria*, *Bacteroidetes* und *Spirochaetes*. Darüber hinaus wurde, während der Durchführung dieser Dissertation, von Paster *et al.*, (2001) eine sehr umfangreiche Studie an 31 Individuen mit vier verschiedenen Formen der Parodontitis bzw. Gingivitis durchgeführt. Elf der Personen litten an einer refraktären Form der Parodontitis, neun an Parodontitis, vier an einer akuten, nekrotisierend-ulzerativen Form, zwei Probanden litten an einer HIV assoziierten Gingivitis; fünf weitere Personen wiesen keine Erkrankung des Zahnhalteapparates auf. Diese Studie konnte Bakterien der Klassen *Deferribacteres* und *Mollicutes* nachweisen und erbrachte aufgrund der Verwendung *Spirochaetes*- und *Bacteroidetes*-spezifischer Primer Aufschluss über die Diversität von *Treponema spp.* und *Bacteroidetes* in der Parodontitis. Die Autoren entdeckten in subgingivalen, bakteriellen Plaques 347 Phylotypen, von denen 40% bisher unbeschrieben waren.

Eine Studie von Kumar *et al.* (2003) untersuchte die Assoziation bisher unbekannter Phylotypen mit chronischer Parodontitis: Die Autoren entwickelten Spezies-spezifische Primer für 39 bakterielle Spezies oder Phylotypen, welche in vorausgegangenen Studien im Zusammenhang mit einer Parodontitis entdeckt wurden, anhand ihrer in GenBank veröffentlichten 16S rRNA Sequenzen.

Diese Primer wurden verwendet, um Material aus dem Sulkus von 66 Personen mit chronischer Parodontitis bzw. von 66 gesunden Personen auf das Vorkommen der 39 bakteriellen Spezies oder Phylotypen zu überprüfen. Eine Assoziation mit chronischer Parodontitis wurde festgestellt für folgende bisher unbekannte Spezies oder Phylotypen (mit zugehörigem Phylum in Klammern): die Klone D084 und BH017 (*Deferribacteres*), AU126 (*Bacteroidetes*), *Megasphaera* BB166, X112 (*OP11*) und I025 (*TM7*), sowie die Spezies *Eubacterium saphenum*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella denticola* und *Cryptobacterium curtum*. Eine Assoziation mit parodontaler Zahngesundheit konnte für die Klone W090 (*Deferribacteres*) und BU063 (*Bacteroidetes*) und die Spezies *Atopobium rimae* und *Atopobium parvulum* nachgewiesen werden.

Die Kenntnis der beteiligten Mikroorganismen ist die mikrobiologische Grundlage, um die Krankheitsentwicklung einer biofilm-assoziierten Erkrankung zu verstehen. Die molekulare Analyse komplexer Lebensgemeinschaften erlaubt die Erstellung von Datenbanken. Hierbei ist zu betonen, dass die Verifikation der Befunde durch Visualisierung *in situ* wünschenswert ist. Die Forschungsgruppe um U. Göbel und A. Moter entwickelte eine Technik, die es erstmals erlaubte, oralen Biofilm *in-situ* unter Bedingungen menschlicher, parodontaler Erkrankung entstehen zu lassen und seine komplexe Struktur zu visualisieren (Wecke *et al.*, 2000). Bei 12 Patienten mit rapid fortschreitender Parodontitis wurden feine, mit unterschiedlichen Materialien bestückte Plastikträger in parodontale Taschen eingelegt und fixiert. Die Materialien bestanden entweder aus Polytetrafluorethylen, Gold oder Dentin und verblieben dort für 3 oder 6 Tage. Die Oberflächen waren danach von einem Biofilm überzogen, bestehend und gebildet von den Mikroorganismen, die an den Krankheitsprozessen beteiligt waren. Mittels Elektronenmikroskop und FISH konnte die räumliche Struktur der gebildeten Plaques analysiert werden und Rückschlüsse auf den zeitlichen Verlauf der Besiedlung, sowie auf die Interaktion der beteiligten Mikroorganismen gezogen werden. Die Autoren verwendeten eubakterielle und Treponemen-spezifische Sonden. Sie konnten zeigen, dass sich nur in den Eingangsbereichen der parodontalen Taschen gram-positive Bakterien fanden,

während die Taschen in der Tiefe von gram-negativen Stäbchen und Treponemen dominiert werden. Der Biofilm zeigte markante Besiedlungsmuster und unterschiedliche bakterielle Morphologien, welche näher untersucht werden müssen, um die beteiligten Bakterien und deren Interaktion beurteilen zu können.

1.5 Ziele dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird die möglichst vollständige, kulturunabhängige Identifikation und Genotypisierung parodontaler Mikroflora der fortgeschrittenen Parodontitis eines einheitlichen Patientenkollektivs angestrebt. Dieses setzte sich zusammen aus 26 Patienten mit aggressiver Parodontitis im Vergleich zu einem parodontal gesunden Kontrollkollektiv von sechs Personen. Die Genotypisierung erfolgte durch kulturunabhängige 16S rRNA Gensequenzierung mittels zweier universeller Primerpaare. Die daraus resultierende Datenbank sollte mit publizierten Untersuchungen verglichen werden, um eine Assoziation von Phylotypen mit Krankheitsprozessen zu erhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bezugsquellen von Laborgeräten und Labormaterialien

Die Bezugsquellen der verwendeten Laborprodukte sind in Tabelle 2-1 zusammengefasst:

Tabelle 2-1. Bezugsquellen geordnet nach Firmen*

ABI Perkin-Elmer (Weiterstadt)	Herolab (Wiesloch)
Ambion (Auston, USA)	Hitachi (San Jose, CA, USA)
Amersham Biotech (Freiburg)	ICN Biomedicals (Aurora, USA)
AppliChem (Darmstadt)	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
Bauknecht (Schorndorf)	Julabo Labortechnik (Seelbach)
Bayer (Leverkusen)	Keutz (Reiskirchen)
B.Braun (Melsungen)	Leica (Bensheim)
Becton-Dickinson (Heidelberg)	Life Technologies (Karlsruhe)
Beckman (München)	Merck (Darmstadt)
bioMérieux (Marcy l'Etoile, Frankreich)	Merck Biosciences (Darmstadt)
BioRad (München)	Mettler (Greifensee, Schweiz)
Biometra (Göttingen)	MWG Biotech (Ebersberg)
Böttger (Bodenmais)	nerbe plus (Winsen)
Branson (Danburg)	New Brunswick Laboratory (Edison, NJ, USA)
Braun Melsungen AG (Melsungen)	New England Biolabs (Schwalbach)
Difco Laboratories (Augsburg)	neoLab (Heidelberg)
eppendorf (Hamburg)	Peq-lab (Erlangen)
Eurogentec (Seraing, Belgien)	QIAGEN (Hilden)
Gelaire (Mailand, Italien)	Retsch (Haan)
Genheimer Kältetechnik (Hettstadt)	Roche (Mannheim)
GibcoBRL (Paisley, GB)	Roth (Karlsruhe)
Grant Instruments (Cambridge, GB)	Sarstedt (Nümbrecht)
Greiner (Nürtingen)	Savant (New York, USA)
Grünenthal (Aachen)	Serva (Heidelberg)
Hartenstein (Würzburg)	Sigma (München)
Heinse & Ziller (Würzburg)	Sigma-Ark (Darmstadt)
Heraeus (Hanau)	Stratagene (Amsterdam, Niederlande)

* Ortsangabe in Klammern; in Deutschland, wenn nicht anders vermerkt.

2.1.2 Laborgeräte

- Anaerobiertöpfe (Merck)
- Brutschränke: KB 500 und B5060 E-CO2 (Heraeus)
- Elektroporationsgeräte: Gene Pulser, Pulse Controller (BioRad)
- Gel-Dokumentationssystem: MidiDoc (Herolab)
- Gel-Elektrophoresekammern: DNA Subcell, Wide Mini-Subcell (BioRad), Flachgelelektrophoresekammern Mini und Maxi (Keutz)
- Heizblöcke: BT1 und BT3 (Grant Instruments)
- Hybridisierungsöfen: DUO-Therm OV5 (Biometra)
- Kühlgeräte: Kühlschrank +4 °C (Liebherr), Kühltruhe -20 °C (Liebherr), Kühltruhe -80 °C (Revco)
- Mikrowellenheizgerät: MWS 1820 Duo (Bauknecht)
- PCR Geräte: Thermocycler TR 3, Personal Cycler und TRIO (Biometra); Primus 96 (MWG Biotech)
- pH-Meter: Digitales Labor-pH-Meter (Hartenstein)
- Schüttelinkubatoren: Certomat H / U (B.Braun), G-25 (New Brunswick Laboratory)
- Sequenzierautomaten: ABI Prism 377 und ABI Prism 310 (ABI Perkin Elmer)
- Sicherheitswerkbank: BSB 4A (Gelaire)
- Spannungsgeräte: Gene Power Supply GPS 200/400 (Amersham Biotech), Power Supply 200/2.0 (Biorad), Power Supply 3000Xi (BioRad), Power-Supply E431 und E321 (Consort)
- Spektrophotometer: U-2000 (Hitachi)

- Ultraschallgerät: Sonifier II Ultraschall Desintegrator Modell 250 mit Standard-Mikrospitze, konisch, 3mm (Branson)
- Vakuumtrockenzentrifuge: Speed Vac Plus, SC110A (Savant)
- Vortex Mixer VM-300 (neoLab)
- Waagen: Sartorius Portable (Heinse & Ziller), Mettler P-1200 (Mettler)
- Wasserbad: Julabo SW 20 (Julabo Labortechnik)
- Zentrifugen: Biofuge 15, Biofuge 15R, Omnifuge2.0 RS, Megafuge 1.0 (Heraeus)

2.1.3 Verbrauchsmaterial

- Anaerobiermedium Genbox (bioMérieux, Best.: 96124)
- Reaktionsgefäße 0,5 / 1,5 / 2,0-ml (Böttger, Best.: 02.053.0100 / 02.023.0100.01 / 02.043.0100)
- 15 / 50-ml-Zentrifugengefäße, steril Falcon (Sarstedt, Best.: 62.554.502 / 62.547.254)
- Centri-Sep Spin Columns (ABI Perkin Elmer, Best.: 401762)
- Dispenser-Tips, steril für Eppendorf-Multipetten - 0,5 / 1,25 / 2,5 ml (nerbe plus, Best.: 07.012.8000 / 07.022.8000 / 07.032.8000)
- Einfrierröhrchen 1ml Cryotubes (Nunc, Best.: 375353)
- Elektroporationsküvetten, 0,2 cm (Eurogentec, Best.: CE0002-50)
- Genetic Analyzer Produkte (ABI Perkin Elmer): Sample tubes 0,5 ml (Best.: 401957), Septa für 0,5 ml tubes (Best.: 401956), Buffer Vials mit Adaptoren (Best.: 401955)
- Glasbeads (Sigma, Best.: G-4649)
- 14-ml-Greiner Röhrchen, steril (Noras, Best.: 187261)

- Nalgene Filter 0,20 μm Nalgene (Hartenstein, Best.: 2904520)
- Nuclease-freie Microfuge-Cups - 0,2ml, steril (nerbe plus, Best.: 04.022.1100)
- Photometer Plastikküvetten (Sarstedt, Best.: 67.742)
- Pipettenspitzen - 10 μl / 100 μl / 1000 μl (Sarstedt, Best.: 70.1115 / 70.760.002 / 70.762)
- Pipettenspitzen mit Filter - 10 μl / 100 μl / 1000 μl (Hartenstein, Best.: FA10/100/1000)
- Zellkulturschalen U-Form, Nunclon Surface - 12 / 24 / 96 well (Becton-Dickinson, Best.: 150628 / 143982 / 163320)

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

- Acrylamid (30 %) rotioaphorese Gel30 (Roth, Best.: 3029.1)
- Agarose NEEO (Roth, Best.: 2267.4)
- Ampicillin Binotal (Grünenthal, Best.: 671573)
- Big Dye Terminator Sequencing Standard (ABI Perkin Elmer, Best.: 4304154); Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v.2.0 (ABI Perkin Elmer, Best.:4314415)
- Borsäure z.A. (Merck, Best.: 1.00165.1000)
- Bromphenolblau (AppliChem, Best.: A3640)
- Dimethylformamid (Merck, Best.: 8.22275.2500)
- DNA-Polymerasen (ABI Perkin Elmer): Ampli *Taq*-Gold with Gene Amp 5000 U (Best.:N8080249), Ampli *Taq* with Gene Amp 5000U (Best.: N808-0156)
- dNTP Mix 4 x 2 mM (Stratagene, Best.: 200415); dNTP Set - 10mM Solutions (Amersham Biotech, Best.: 27-2032-01)
- EDTA-disodium (Serva, Best.: 11280)

- Eisessig 100 % (Merck, Best.: 1.00063.2500)
- Ethanol abs. z.A. (Merck, Best.: 1.00938.1000)
- Ethidiumbromid - 1 % in Aqua dest. (Merck, Best.: 1.11608.0030)
- Formamid (Merck Biosciences, Best.: 344206)
- Hefeextrakt (Difco, Best.: 0127-07-1)
- Genetic Analyzer Puffer mit EDTA (ABI Perkin Elmer, Best.:402824)
- D (+) Glucose (Merck, Best.: 1.08342.1000)
- GC-Medium Base (Difco, Best.: 228950)
- Glycerin 87 % (Merck, Best.: 1.04094.1000)
- Größenstandard für Gelelektrophorese Smart-Ladder (Eurogentec, Best.: MW170002)
- IPTG (AppliChem, Best.: A 1008)
- Lennox L: LB Broth Base (Invitrogen, Best.: 22700-025); LB Agar (Invitrogen, Best.: 12780)
- MgCl₂ (Merck, Best.: 1.05832.1000)
- MgSO₄ (AppliChem, Best.: A1037)
- Mineralöl (Sigma, Best.:400-5)
- Multivitaminlösung für Flüssigmedien PolyVitex (bioMérieux, Best.: 55651)
- NaCl (AppliChem, Best.: A1371.1000)
- N-Lauroylsarcosine (Sigma, Best.: L-5125)
- Parafilm „M“ American National Can (Hartenstein, Best.: PF10)
- Performance Optimized Polymer 6 with TSR - POP 6 (ABI Perkin Elmer, Best.: 402844)
- Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol - 25 : 24 : 1 (AppliChem, Best.: A0889)

- 2-Propranol (Merck, Best.: 1.09634.2500)
- Proteose Peptone (Difco, Best.:211684)
- Salzsäure 25 % (Merck, Best.: 1.00312.2500)
- SDS (AppliChem, Best.: A1502)
- Tris Ultra (Roth, Best.: 5429.3)
- Tween20 (Merck, Best.: 8822184)
- Wasser für HPLC (Merck, Best.: 1.15333.2500)
- X-Gal (AppliChem, Best.: A 1007)

2.1.5 Verwendete Kits

- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Best.: 51104)
- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Best.: 28104)
- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Best.: 28704)
- PCR-ScriptTM Amp Cloning Kit (Stratagene, Best.: 211190-5; accession no. U46017)

2.1.6 Zusammensetzung häufig verwendeter Lösungen

- GEBS (pH 8.0): 20 % Glycerin, 50mM EDTA, 0,05 % Bromphenol, 0,5 % N-Lauroylsarkosin
- 10x PBS (pH 7.4): PBS Dulbecco (Biochrom, Kat. L182-10) mit Aqua bid. ad 1000ml
- 20x SSC (pH 7.0): 3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat
- TE (10/1): 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0)
- 1x TBE (pH 8.3): 100 mM Tris-HCl, 100 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA

2.1.7 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide dieser Arbeit wurden synthetisiert und bezogen von Sigma-Ark (Darmstadt).

In Tabelle 2-2, 2-3 und 2-4 sind die benutzten Oligonukleotide mit Bezeichnung und deren erste publizierte Verwendung bzw. deren Ursprung aufgeführt.

Tabelle 2-2. Eubakterielle 16S rDNA spezifische Oligonukleotide

Bezeichnung \diamond	Referenz ¹	Position [†]	Nukleotidsequenz (5'>3') [^]	bp	T _M [*]
27f	Lane, 1991	8 - 27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	20	58
519r	Lane, 1991	537 - 519	GWATTACCGCGGCKGCTG	18	58
515f	Kroes <i>et al.</i> , 1999	497 - 515	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	19	64
1525r	Kroes <i>et al.</i> , 1999	1541 - 1525	AAGGAGGTGWTCCARCC	17	52

Erklärung: \diamond f=forward, r= reverse (Leserichtung); ¹ GenBank accession-no.: J01695; [†] Position nach 16S rDNA von E.coli; [^] NC-IUB Gruppencode für Redundanzen: M = A oder C; W = A oder T; R = A oder G;
* berechnet mit der Formel: T_M=[2 * (A+T) + 4 * (G+C)] °C

Tabelle 2-3. pBluescript spezifische Oligonukleotide

Bezeichnung \diamond	Referenz ¹	Position \ddagger	Nukleotidsequenz (5'>3')	bp	T _M [*]
KB9 (f)	Stratagene	628 - 647	AATACGACTCACTATAGGGC	20	58
329 (r)	Stratagene	814 - 795	ACCATGATTACGCCAAGC	18	54

Erklärung: \diamond f=forward, r= reverse (Leserichtung); ¹ GenBank accession-no.: -;
 \ddagger die Primer umschließen die MCS (657 - 759) von pPCR-ScriptTM Amp SK (+);
* berechnet mit der Formel: T_M=[2 * (A+T) + 4 * (G+C)] °C

Tabelle 2-4. Oligonukleotide spezifisch für Klon 10B6

Bezeichnung \diamond	Referenz ¹	Position \ddagger	Nukleotidsequenz (5'>3')	bp	T _M [*]
GV1 (r)	diese Studie	258–240	GATCATCGACTTGGGGGTC	20	58
GV2 (f)	diese Studie	241–259	ACCCCAAGTCGATGATCG	18	54

Erklärung: \diamond f=forward, r= reverse (Leserichtung); ¹ GenBank accession-no.: AJ428412;
[†] Position nach 16S rDNA von E.coli;
* berechnet mit der Formel: T_M=[2 * (A+T) + 4 * (G+C)] °C

2.1.8 Medien für bakterielle Kulturen

- BHI + Supplement B: 3,7 % Brain-Heart-Infusion (Difco, Best.: 0037-07) + 1 % Supplement B (Difco, Best.: 227610)
- Einfriermedium: Standard I Nährbouillon (Merck, Best.: 1.07882.500) + 20 % Glycerin
- Kanamycin-Vancomycin Agar + 5 % Schafblut (Beckton-Dickinson, Best.: 221735)
- LB-Agar + Ampicillin [100 µg/ml]
- SOB: 2 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl
- SOC: SOB + 20 mM Glukose, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂
- Thioglycolat: 2,98% Thioglycolat Bouillon (Oxoid, Best.: CM173) + 0,1 ‰ Vitamin K (Sigma, Best.: V 3501) + 0,05 ‰ Hemin (Fluka, Best.: 5280)
- VE Agar: Schädler Agar + 5 % Schafblut (Difco, Best.: 0403-17-4)

2.1.9 Verwendete Software

1. ARB v. Beta 011107 (Autor: W. Ludwig, TU München) zur phylogenetischen Analyse
2. BioDiversity Pro v. 2.0 (Autor: N. McAlece) zur Berechnung der Biodiversität
3. Bioedit v. 5.0 (Autor: T. Hall, NCSU, USA) für Alignment und Editierung der Sequenzlänge
4. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Standalone Server v.2.2.4. Linux zur Datenbank Analyse (NCBI, USA)
5. Mega v. 2.1 (Autoren: Kumar, Tamura, Jakobson, Nei) zur Konversion von Alignmentformaten zwischen Megalign und Bioedit
6. Megalign von Lasergene v. 5.0 (GATC Biotech AG, Konstanz) zur Phylotypbestimmung
7. Zur Erstellung der Dissertation wurde Framemaker v. 7.0 von Adobe verwendet.

2.1.10 Neuentdeckte Nukleotidsequenzen

Die in dieser Studie entdeckten, neuen Sequenzen wurden den Datenbanken für 16S rRNA Nukleotidsequenzen von EMBL bzw. *Genbank* hinzugefügt: Die Sequenz von Klon 10B6 erhielt EMBL Eingangsnummer AJ428412. Die folgenden Klone erhielten GenBank Eingangsnummern (jeweils in Klammern): Der orale Klon *1B13* (AF515487); *2B14* (AF515488); *2B16* (AF515489); *3B5* (AF515490); *3B9* (AF515491); *3B18* (AF515492); *1A13* (AF515493); *1D7* (AF515494); *10B11* (AF515495); *21B4* (AF515496); *24B14* (AF515497); *28B11* (AF515498); *29B17* (AF515499); *29D19* (AF515500).

2.2 Methoden

2.2.1 Untersuchte Personen

Die beteiligten Personen des Patienten- und des Kontrollkollektivs, welche sich jeweils zum Zeitpunkt der Probenentnahme aus unterschiedlichen Gründen in ambulanter Behandlung in der Zahnklinik der Universität Würzburg befanden, wurden nach Aufklärung und Einwilligung in die Studie aufgenommen. Die behandelnden Ärzte der Abteilung für Parodontologie stellten die Diagnose und führten die zahnärztlichen Untersuchungen sowie die Probenentnahmen durch. Die untersuchten Proben des Studienkollektivs stammten von 26 Patienten (15 weibliche, 11 männliche), bei welchen die Diagnose einer Parodontitis marginalis gestellt wurde. Das mittlere Alter lag bei 46 - 49 Jahren (Umfang = 22-73 Jahre). Diese Patienten wiesen alle mehrfache fortgeschrittene parodontale Läsionen auf. Die mittlere Taschentiefe betrug 8,1 mm (Standardabweichung = 1,9; Umfang = 5-12 mm; Median = 8 mm). *Bleeding on probing* (BOP), also das Auslösen einer Blutung durch das Sondieren einer parodontalen Schleimhauttasche, konnte bei allen bis auf zwei Patienten beobachtet werden. Eiterung aus der Tiefe der parodontalen Läsion fand sich bei 13 von 26 Patienten. 13 Patienten rauchten regelmäßig. Vier Patienten wurden zwei Monate zuvor erfolglos mittels subgingivalem „Scaling and root planing“ (Abschaben von Plaque und teilweise Zahnma-

terial im Bereich der betroffenen Zahnhäse) mit begleitender systemischer Antibiose (Amoxicillin und Metronidazol oder Metronidazol alleine) behandelt. Weitere Proben wurden von sechs Personen einer Kontrollgruppe parodontal gesunder Individuen untersucht: Diese Gruppe bestand aus drei weiblichen und drei männlichen Personen. Das mittlere Alter lag bei 37-43 Jahre (Umfang = 23-49 Jahre). Die Taschentiefe der Stelle der Probenentnahme betrug <3 mm. Eine Eiterung fand sich nicht. BOP bei 2-7% aller untersuchten Stellen; alle Probanden waren Nichtraucher und erhielten keine antimikrobielle Therapie acht Wochen vor der Probenentnahme.

Die folgenden Tabellen 2-5 und 2-6 geben einen Überblick über die Zusammensetzung des Patienten- bzw. Kontrollkollektiv:

Tabelle 2-5. Charakterisierung des Patientenkollektivs

Pat.-Nummer	Geschlecht	Alter (a)	Taschentiefe (mm)	Eiter	BOP‡	Rauchen
1	männlich	40	9	ja	ja	ja
2	weiblich	54	10	ja	ja	nein
3	weiblich	37	9	nein	nein	ja
5	männlich	37	5	nein	ja	nein
6	weiblich	48	9	ja	ja	ja
7	männlich	53	8	nein	ja	ja
8	weiblich	51	9	ja	ja	ja
9	weiblich	75	7	nein	ja	ja
10	weiblich	61	8	ja	ja	nein
11	weiblich	55	7	nein	ja	ja
12	männlich	66	11	ja	ja	ja
13	weiblich	45	6	nein	ja	nein
14	weiblich	35	7	ja	ja	nein
15	weiblich	24	6	ja	ja	ja
16	weiblich	53	8	ja	ja	nein
20	männlich	26	6	nein	ja	nein
21	männlich	43	11	ja	ja	ja
22	männlich	72	9	nein	ja	nein
23	männlich	62	9	nein	ja	nein
24	männlich	31	5	nein	ja	nein
25	weiblich	48	10	ja	ja	ja

Pat.-Nummer	Geschlecht	Alter (a)	Taschentiefe (mm)	Eiter	BOP‡	Rauchen
26	männlich	53	5	nein	nein	ja
27	weiblich	24	9	nein	ja	nein
28	weiblich	68	12	ja	ja	nein
29	männlich	61	7	ja	ja	nein
30	weiblich	47	7	nein	ja	ja

(a) in Jahren zum Zeitpunkt der Probenentnahme; ‡ *Bleeding on probing*

Tabelle 2-6. Charakterisierung des Kontrollkollektivs

Pat.-Nummer	Geschlecht	Alter (a)	Taschentiefe (mm)	Eiter	BOP	Rauchen
39	weiblich	35	2	nein	nein	nein
40	männlich	24	2	nein	nein	nein
41	männlich	50	1	nein	nein	nein
44	männlich	38	1	nein	nein	nein
45	weiblich	44	2	nein	nein	nein
48	weiblich	47	1	nein	nein	nein

(a) in Jahren zum Zeitpunkt der Probenentnahme; ‡ *Bleeding on probing*

Tabelle 2-7 zeigt den Vergleich von Patienten- und Kontrollkollektiv. Im parodontal gesunden Kontrollkollektiv fanden sich keine Blutungen oder Eiterungen.

Tabelle 2-7. Vergleich von Patienten- und Kontrollkollektiv

Eigenschaften	Patienten	Kontrollgruppe
Anzahl (n)	26	6
Alter (Jahre)	22 - 73	23 - 49
Frauen/Männer (n/n)	15/11	3/3
Taschentiefe $\bar{\sigma}$ (mm)	8.1	<3
Blutung beim Sondieren (n)	24	0
Eiterung (n)	13	0
Raucher (n)	13	0

2.2.2 Probenmaterial

2.2.2.1 Entnahme und -verarbeitung

Subgingivale Proben wurden durch das Einführen einer sterilen Papierspitze in parodontale Schleimhauttaschen gewonnen. Pro Person wurde eine einzelne Tasche untersucht. Die Papierspitzen wurden nach Probenentnahme in 300 μ l 10 mM Tris/1 mM EDTA (TE pH 8,0) Pufferlösung überführt. Das Probenmaterial wurde dann sofort in das Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg transportiert. Dort wurden sie für eine Minute gevortext (Vortex Mixer VM-300), die DNA wurde dann sofort extrahiert oder bei -20 °C eingefroren.

2.2.2.2 DNA Aufreinigung und Amplifikation der 16S rRNA Gene

DNA wurde aus einem Elutionsvolumen von 200 μ l des Ausgangsmaterials (300 μ l einer bakteriellen Suspension in TE Pufferlösung) mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

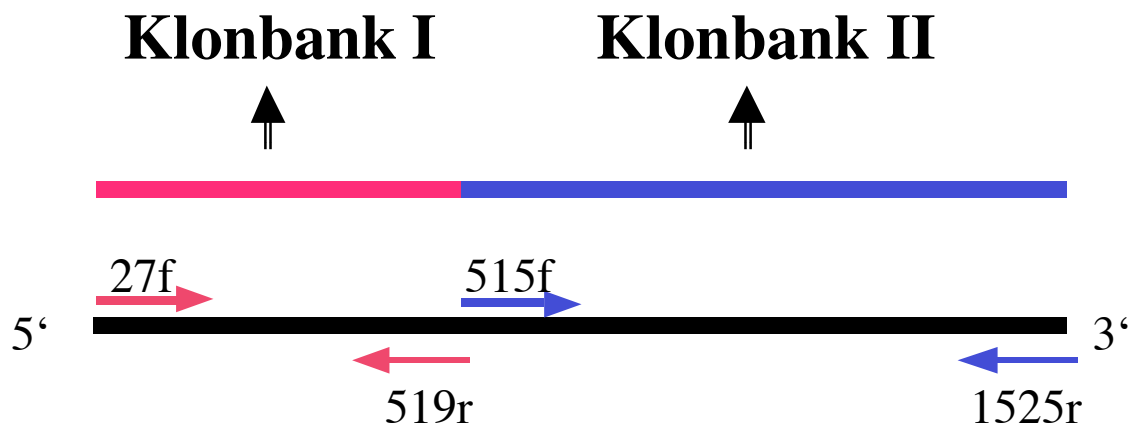
2.2.2.3 Eubakterielle PCR der bakteriellen DNA

10 μ l Aliquots der DNA Lösung wurden zur partiellen Amplifikation der 16S rRNA Gene verwendet. Mittels eubakterieller (universeller) Primer wurde die DNA der 16S rRNA der Bakterien vervielfältigt. Die verwendeten Primer hybridisieren an Positionen, die bei allen Bakterien identisch sind. Die verwendeten Oligonukleotide für diese PCR (27f mit 519r; 515f mit 1525r; GV1r mit GV2f) wurden bereits im Abschnitt „2.1 Material“ beschrieben.

Ein 50 μ l PCR Mix beinhaltete 0,4 μ l (2 U) AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), jeweils 1 μ l der entsprechenden Primer Lösung (10 μ M), 3 μ l MgCl₂ (25 mM), 1 μ l dNTP (2,5 mM aller dNTP; PeqLab Biotechnologie), 5 μ l einer 10x PCR Pufferlösung II (Applied Biosystems) und 10 μ l extrahierter DNA. Die PCR Bedingungen für das Primerpaar 27f/519r (zur Erstellung von Klonbank I) und 515f/1525r (für Klonbank II) waren wie folgt: initiale Denaturierung bei 95 °C für 10 min, gefolgt von einem Denaturierungsszyklen bei 94 °C für 30 s, mit einem Annealingschritt für

eine Minute bei 55 °C (27f/519r) bzw. 58 °C (515f/1525r), und einem Extensionsschritt bei 72 °C für 1,5 min. Für 27f/519r wurden 26 Zyklen, für 515f/1525r 36 Zyklen gewählt, danach erfolgte abschließend ein Extensionsschritt bei 72 °C für 20 min. In Abbildung 2-1 sind die beiden erstellten Klonbanken schematisch dargestellt.

Abbildung 2-1. Position eubakterieller 16S rRNA Primer am 16S rRNA Gen



2.2.2.4 Nachweis des Amplifikats durch elektrophoretische Auftrennung

Ein 0,8 %-iges Agarosegel in 1x TBE wurde zum gelelektrophoretischen Nachweis der Amplifikation verwendet. Die DNA Nachweisgröße beträgt ca. 0,8 bis 8 kb.

2.2.2.5 Aufreinigung der PCR Produkte

DNA wurde aus 40 µl des PCR Produkts mit QIAquick PCR Purification Kit(Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.2.2.6 Klonierung von 16S rRNA Genfragmenten

Das hier aufgereinigte PCR-Produkt wurde mit dem Vektor *pPCR-Script Amp SK(+)* (GenBank Accession Nr. U46017 - ein 2961 bp langes Plasmid) ligiert. Verwendet wurde das *PCR-Script Amp Cloning Kit* von Stratagene nach Angaben des Herstellers. Es beruht auf dem *pBluescript SK(+)* Plasmidvektor mit einer vom Hersteller (Stratagene) zusätzlich eingefügten selten schneidenden *SrfI*-Schnittstelle innerhalb der multiplen Klonierungsseite (*MCS - multi cloning site*).

Diese Schnittstelle verhindert in Gegenwart des *SrfI* Enzyms, dass sich der Vektor bei der Ligation ohne ein Insert verschließt. Erst das Einfügen eines Genabschnitts zerstört die *SrfI* Schnittstelle, da diese Schnittstelle in den Genfragmenten in der Regel nicht vorkommt. Dadurch kommt es zu einer erfolgreichen Ligation, der Vektor ist rekombiniert. Da der Vektor PCR-Produkte mit blunden, also glatten Enden ligiert („blunt end“ Ligation), ist ein vorausgehender Arbeitsschritt notwendig, das *Polishing*. Beim *Polishing* entstehen blunde PCR-Produkte unter Verwendung der DNA Polymerase *Pfu*, welche den inkompletten Strang mit dNTPs auffüllt. Danach erfolgt die Ligation. Dabei werden DNA-Fragmente durch Bildung von Phosphodiester-Bindungen mit Hilfe der T4 DNA Ligase miteinander verknüpft. Um eine Selektion der Klone zu ermöglichen, trägt der verwendete Vektor das Gen für Ampicillin-Resistenz *Amp(r)*, sowie das Gen für die β -Galactosidase *lacZ*. *lacZ* katalysiert die Hydrolyse des Substrats X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid), was eine Blaufärbung des Mediums zur Folge hat. Bei korrekter Ligation des PCR-Produkts mit dem Vektor wird das Gen für die X-Gal Verwertung inaktiviert. Weiße Kolonien auf LB-Platten mit Ampicillin werden somit von Zellen gebildet, die einen Vektor enthalten, in den das PCR-Produkt erfolgreich integriert wurde, d.h. das *lacZ* Gen ist zerstört, es findet keine Verwertung von X-Gal statt.

1. polishing: Für den Polishing-Ansatz wurde 10 μ l gereinigtes PCR Produkt, 1 μ l dNTP Mix (10 mM, d.h. 2,5 mM jeweils), 1,3 μ l des 10x Polishingbuffers, 1 μ l Pfu DNA Polymerase in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Nach vorsichtigem Mischen wurde anzentrifugiert, mit 20 μ l Öl überschichtet und für 30 min bei 72 °C inkubiert. Danach kann der Ansatz für die Ligationreaktion verwendet werden.
2. Ligation: Für den Ligationansatz wurde der Reihe nach in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert: 1 μ l *pPCR-Script Amp SK(+)* cloning Vektor (10 ng/ μ l), 1 μ l 10x Reaktionspuffer, 0,5 μ l 10 mM rATP, 4 μ l PCR Produkt aus der *Polishing* Reaktion, 1 μ l *SrfI* Restriktionsenzym (5 U/ μ l), 1 μ l T4 DNA Ligase (4 U/ μ l), 1,5 μ l Ampuwa (total 10 μ l).

3. Aufreinigung: Nach schnellem Abzentrifugieren bleibt der Ansatz für 1 Stunde bei RT stehen. Der rekombinierte Vektor wurde danach mittels Phenolextraktion durch Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol gewonnen (abweichend vom Protokoll des Herstellers - Stratagene) und mittels Ethanolfällung aufgereinigt. Die DNA war danach geeignet für den nächsten Arbeitsschritt.
4. Transformation: Mittels Elektroporation wurde die Plasmid DNA in elektroschock-kompetente E.coli DH5 α nach Standardprotokoll transformiert (Hanahan, D., 1985): Elektroporationsküvetten wurden mit 500 μ l +4 °C kaltem Ampuwa gefüllt und auf Eis gestellt. Das Elektroporationsgerät wurde wie folgt eingestellt: Widerstand 400 Ohm, Kapazität 25 μ FD, Spannung 2,5 V. Im 37 °C Brutschrank wurde SOC Nährlösung vorgewärmt, es wurden flammengebogene Glasspatel, X-Gal/IPTG, ampicillinhaltige Agarplatten und die transformationskompetenten Zellen bereitgestellt. Zu 4 μ l Ligationsansatz in 0,5 ml Reaktionsgefäß wurden jeweils 40 μ l der Zellsuspension in die entleerten Glasküvette gegeben und elektroporiert. Danach wurden die Zellen in je 1ml vorgewärmtem SOC in gestopften Reagenzgläsern aufgenommen, und für 1 h in den Schüttler bei 37 °C und 200 rpm gestellt. Zwischenzeitlich wurden Agarplatten mit je 6 μ l IPTG, 8 μ l X-Gal, 36 μ l DMF beschichtet, unter dem Abzug getrocknet und danach im 37 °C Brutschrank für eine halbe Stunde vorgewärmt. Die Agarplatten wurden mit SOC-Zellsuspension zu 20 μ l, 200 μ l und 800 μ l Mengen beschichtet. Es folgte die Übernachtskultur im 37 °C Brutschrank.
5. Selektion der transformierten Bakterien: Bei potentiell erfolgreichen Zelltransfektanten ist das *lacZ* Gen nicht mehr funktionsfähig und sie wachsen auf den mit X-Gal/IPTG getränkten Agarplatten nicht blau, sondern weiß (*Blue-white screening* - siehe Vektorbeschreibung). Zum Selektieren wurden sterile Zahnstocher verwendet. Zellen rekombinierter Kolonien wurden ausgewählt für die PCR mit Vektorenprimer. Der PCR-Ansatz (jeweils 50 μ l), wurde in speziellen 0,2 ml Microtubes vorgelegt.

2.2.3 Amplifikation der Inserts

Für die Klone der erfolgreich elektroporierten Bakterien wurden die Vektorprimer KB9 und 329 verwendet. Der Ansatz wurde im Reinraum auf Eis pipettiert, um Kontamination zu vermeiden. Je Klon wurden 50 μl des PCR-Ansatzes vorgelegt. Pipetten, Pipettenspitzen und Ampuwa wurde im Reinraum bereitgestellt.

Der PCR-Ansatz (für 20 Klone inklusive vier negativer Kontrollansätze) setzte sich zusammen aus: 895 μl Ampuwa, 125 μl 10x Puffer, 125 μl dNTP (2 mM), 75 μl MgCl_2 (25 mM), 12,5 μl Primer KB9 (20 μM), 12,5 μl Primer 329 (20 μM), 5 μl Taq (total 1250 μl). Die PCR Konditionen für das PCR Gerät Primus 96 waren wie folgt: 10 min 94 °C; 36x [1 min 50 °C, 1 min 30 sek 72 °C, 1 min 94 °C]; 1 min 50 °C; 10 min 72 °C; dann Haltetemperatur 25 °C.

2.2.4 Sequenzierung

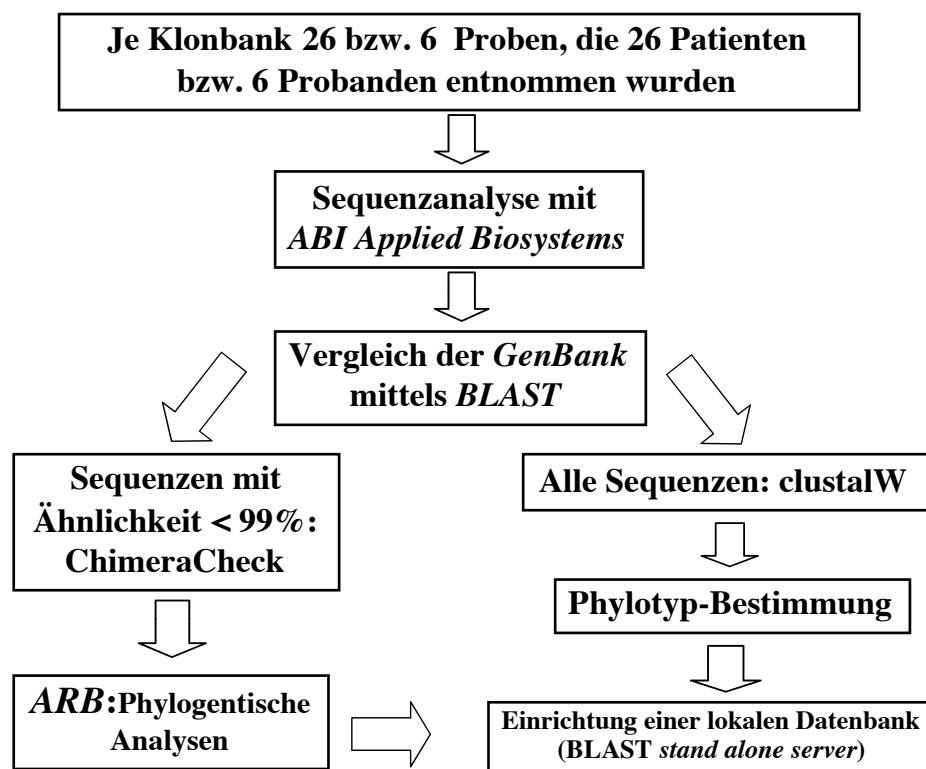
Dieser Arbeitsschritt erfolgte im DNA-Labor des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie. Die PCR Produkte wurden der Sequenzierung mittels 27f bzw. 515f zugeführt. Zusätzlich wurde der Gegenstrang der Plasmide, welche ein transformiertes Genfragment („Insert“) mit weniger als 97% Identität zu Einträgen in GenBank trugen, mit dem Primer 519r bzw. 1525r sequenziert. Die PCR Produkte, welche durch ein Plasmid mit einem 515f/1525r Genabschnitt gewonnen wurden, wurden mittels eines DNA Sequenzierautomaten des Typs *ABI prism model 377* (Applied Biosystems) sequenziert. Aus Gründen der Organisation im Zusammenhang mit der Durchführung der Diagnostik am Institut für Hygiene und Mikrobiologie wurden PCR Produkte, welche durch ein Plasmid mit einem 27f/519r Genabschnitt gewonnen wurden, mit einem DNA Sequenzierautomaten *ABI prism model 310* aufgearbeitet.

Ein Sequenzieransatz bestand aus ca. 100 ng aufgereinigtes PCR-Produkt (Konzentrationsbestimmung nach Agarosegel-Elektrophorese, siehe oben), 1 μl Primer (10 μM) sowie Ampuwa ad 8 μl .

2.2.5 Sequenzanalyse

Die Arbeitsschritte der Sequenzanalyse sind im Anschluss dieses Abschnittes schematisch in einem Flussdiagramm dargestellt (siehe Abb. 2-2): Nach visueller Prüfung der Chromatogramme der Nukleotidsequenzen, welche von den *ABI* DNA-Sequenzierautomaten ausgegeben wurden, erfolgte das Editieren der Sequenzdaten mit Hilfe des Sequenzanalyseprogramms 373A (Applied Biosystems). Die DNA Sequenzen wurden anschließend mit denen der GenBank unter Verwendung des BLAST Servers verglichen, welcher durch das *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Bethesda, MD, USA) bereitgestellt wird. Sequenzen mit einer Ähnlichkeit kleiner als 99% zu den Einträgen in GenBank wurden mit dem Computerprogramm CHIMERA CHECK des Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>) auf chimäre Strukturen hin untersucht. Zu einer Chimärenbildung kann es kommen, wenn Bruchstücke von Genfragmenten in einer konservierten Region hybridisieren und dadurch zwei artifizielle Genabschnitte unterschiedlicher Herkunft entstehen. Ein einzigartiger Phylotyp wurde definiert als Gruppe von Sequenzen, welche untereinander eine Ähnlichkeit von mindestens 99% besitzen (nach Kroes *et al.*, 1999; Paster *et al.*, 2001). Die Bestimmung von Phylotypen erfolgte durch *Alignment* (d.h. vergleichende Ausrichtung) der Sequenzen nach dem CLUSTAL W Algorithmus, welcher im Sequenzanalyseprogramm von Lasergene (DNASTAR) verwendet wird. Der statistische Umfang C (C für Coverage) der Genbanken wurde nach Giovannoni *et al.*, (1995) nach der Gleichung $C = [1 - (n_{\text{singletons}} / N_{\text{clones}})] \times 100$ berechnet. Dabei steht $n_{\text{singletons}}$ für die Zahl der nur einmal nachgewiesenen Spezies, N_{clones} steht für die Anzahl der gefundenen Klone (also mehrfach gefundener Sequenzen). Die Formel berechnet den Umfang einer Stichprobe einer mikrobiologischen Umgebungsprobe. Dies ermöglicht eine Abschätzung der Diversität eines Habitats und Aussagen über die Gewichtung des Stichprobenergebnisses.

Abbildung 2-2. Flussdiagramm der Sequenz- und phylogenetischen Analysen



Ein lokaler BLAST Server (für das Betriebssystem Linux) wurde eingerichtet, um Sequenzen mit der lokalen Datenbank zu vergleichen. Die Software für den Server wird auf der Internetseite von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) bereitgestellt. 16S rRNA Gensequenzen, welche eine Ähnlichkeit von weniger als 97 % mit Sequenzen öffentlicher Datenbanken besaßen, wurde mithilfe der Software *ARB* (<http://www.arb-home.de>) der rRNA Sequenzdatenbank der Technischen Universität München hinzugefügt; die Datenbank umfasst 15.000 veröffentlichte und unveröffentlichte homologe Primärstrukturen der *ss* rRNA. Die phylogenetische Zuordnung der in dieser Studie gefundenen Sequenzen geschah nach folgenden Schritten: Initial wurden phylogenetische Stammbäume der 16S rRNA Gensequenzen (ausschließlich mit Längen > 1000 bp) berechnet; verwendet wurden die in *ARB* integrierten Methoden *Neighbour-joining* (Distanz-basierte Methode mit *Jukes-Cantor Korrektur*: einer Gewichtung nach einem Substitutionsmodell) zur additiven Baum-Rekonstruktion, sowie *Maximum-Parsimony* bzw. *Maximum likelihood* (jeweils Charakter-basierte Methoden) zur Baum-Rekonstruktion mit geringsten Nukleotidveränderungen, bzw. maximaler Wahrscheinlichkeit der evolutionären Änderungen. Vor der Integration der gefun-

denen Sequenzen wurde ein Alignment dieser Sequenzen mit der Software FAST ALIGNER, Version 1.03 (ARB) durchgeführt. Die Alignments wurden dann manuell durch visuelle Inspektion und Vergleich der Sekundärstruktur verfeinert. Daraufhin wurden diese partiellen Sequenzen im ARB Modus „parsimony interactive“ den entsprechenden Bäumen hinzugefügt, ohne deren Topologie zu verändern. Um die Zuverlässigkeit der Baumstrukturen zu überprüfen, wurden Analysen mit und ohne Filterung von hochvariablen Positionen durchgeführt („branch-swapping“). Die so durchgeführten Analysen wurden von unserem Kooperationspartner Matthias Horn, *Microbial Ecology Group*, jetzt Universität Wien, fortgeführt. M. Horn erstellte anhand seiner Analysen die in der Publikation zu findenden Stammbäume (Hutter *et. al.*, 2003). Die Taxonomie, welche in diesem Bericht verwendet wurde, bezieht sich auf „Taxonomic Outline of the Procaryotic Genera“, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2. Edition, Veröffentlichung 1.0, April 2001 (<http://www.cme.msu.edu/bergeys/>).

3 Ergebnisse

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der Analyse für das erkrankte und das gesunde Kollektiv und deren Vergleich untereinander beschrieben. Die Sequenzdaten der Klonpopulationen (27f/519r und 515f/1525r), welche für das parodontal erkrankte Kollektiv erhoben wurden, sind zusätzlich im Anhang tabellarisch aufgelistet.

3.1 Auswertung der Klonbanken der Parodontitis

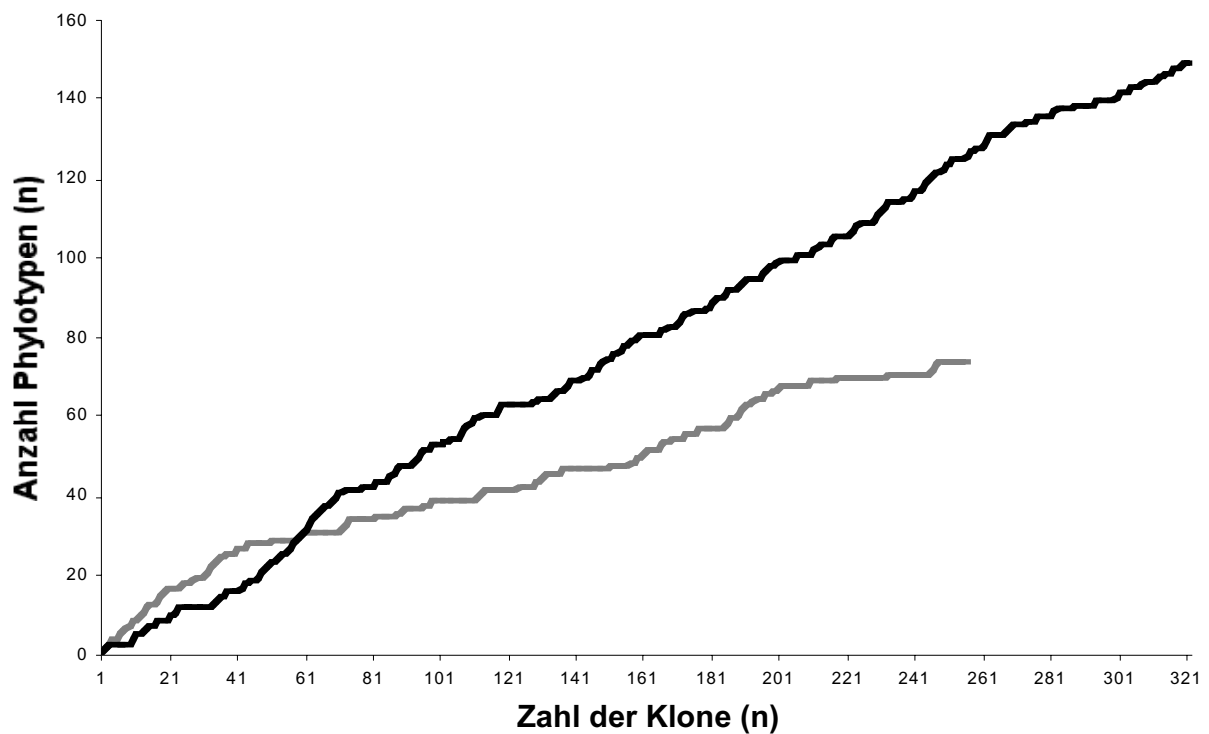
26 Proben von 26 Patienten mit zumeist fortgeschrittener Parodontitis marginalis wurden mittels 16S rRNA Klonbanken und Sequenzierung der Klone analysiert. Von jeder Probe wurden PCR Produkte zweier Primerpaare - 27f/519r und 515f/1525r - unabhängig voneinander verarbeitet. Tabelle 3-1 zeigt die Eigenschaften der untersuchten Klone von Parodontitispatienten, welche mit den 27f/519r bzw. 515f/1525r Klonbanken gefunden wurden. Klonbank 27f/519r setzt sich aus 322 Klonen zusammen, Klonbank 515f/1525r aus 256 Klonen. Deren Sequenzlänge in Basenpaaren (*bp*) ist als Mittelwert mit Standardabweichung und Umfang (in Klammern) angegeben. Die Klone für das Primerpaar 27f/519r bzw. 515f/1525r konnten 148 bzw. 75 Phylotypen zugeordnet werden, definiert als $\geq 99\%$ Sequenzähnlichkeit untereinander, von welchen 110 bzw. 40 nur einmalig nachgewiesen werden konnten. Die 27f/519r Klonbank enthielt also mehr einmalig auftretende Phylotypen als die 515f/1525r Klonbank. Die Anzahl der Klone pro Phylotyp ist als Reichweite und Mittelwert angegeben. Als Treffer in GenBank wurde $\geq 99\%$ Sequenzähnlichkeit vorausgesetzt. Als nichtidentifizierte Sequenz wurde eine $< 97\%$ Ähnlichkeit mit der nächststehenden Sequenz in GenBank vorausgesetzt. Die Anzahl der Klone pro taxonomischer Familie ist als Reichweite und Mittelwert angegeben. Die Berechnung der Diversität der beiden Klonbanken oder der Umfang *C* (*C* für Coverage) nach Giovannoni *et al.*, (1995) ergab einen niedrigeren Umfang

(C) der 515f/1525r Klonbank, trotz größerer Zahl der Klone in der Klonbank 27f/519r (66% vs. 84%), berechnet nach folgender Gleichung: $C = [1 - (n_{\text{singletons}}/N_{\text{clones}})] \times 100$. Dabei steht $n_{\text{singletons}}$ für die Zahl der nur einmal nachgewiesenen Phylotypen, N_{clones} steht für die Anzahl der gefundenen Klone (also mehrfach gefundener Sequenzen).

Tabelle 3-1. Eigenschaften der Klonpopulationen der Parodontitispatienten

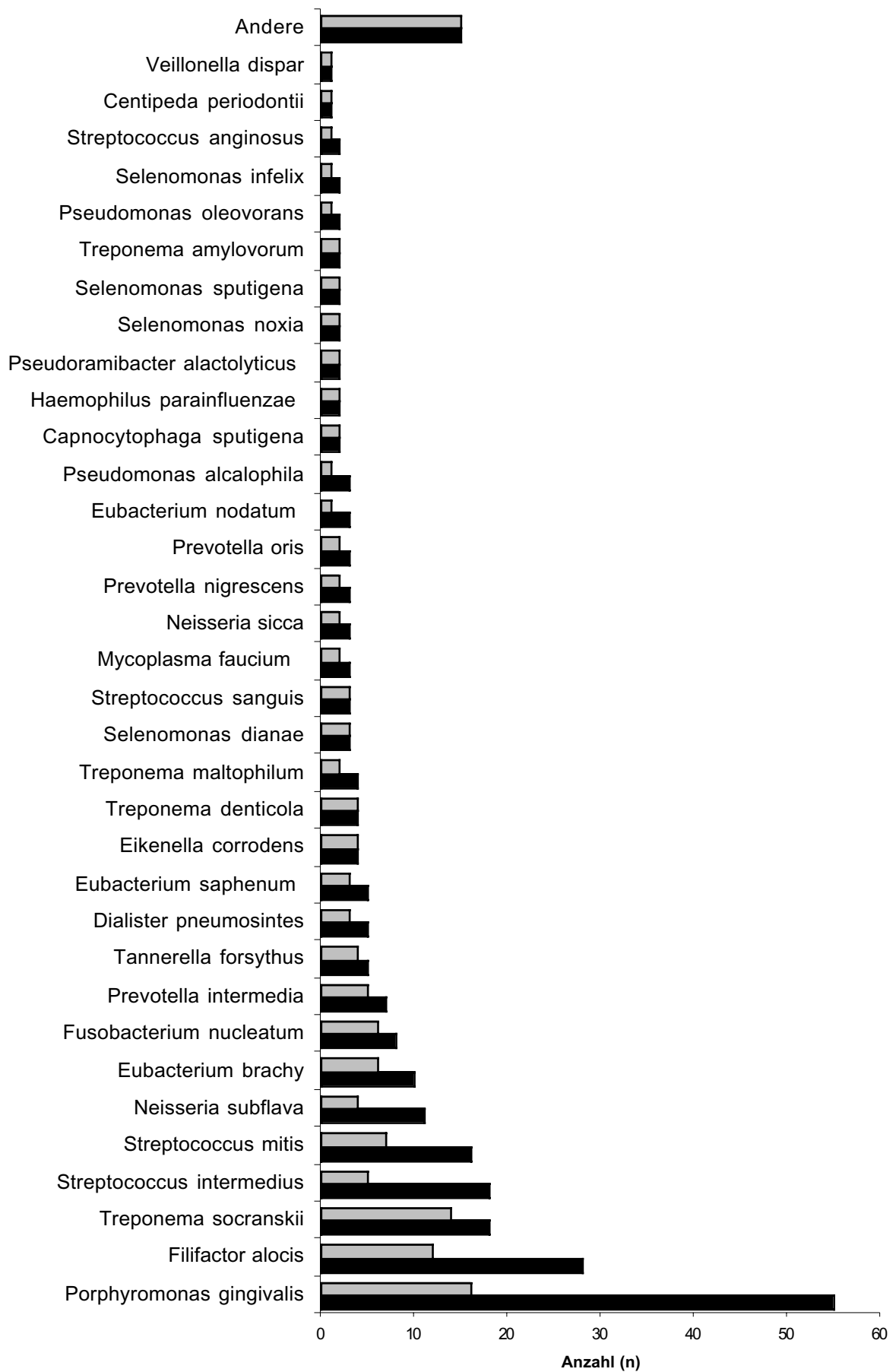
Eigenschaften	Klonbanken	
	27f/519r	515f/1525r
Personen; Proben (<i>n</i>)	26; 26	26; 26
Klone (<i>n</i>)	322	256
Sequenzlänge (<i>bp</i>)	405±61 (245-540)	630±95 (429-990)
Phylotypen (<i>n</i>)	148	75
Einmalige Phylotypen (<i>n</i>)	110	40
Umfang (<i>C</i>) (%)	66	84
Klone pro Phylotyp (<i>n</i> ; Mittelwert)	1-58; 2,2	1-21; 3,3
Familien (<i>taxonomisch</i> , <i>n</i>)	23	17
Klone pro taxonomischer Familie (<i>n</i>)	1-75; 12	1-48; 17
Treffer in GenBank (%)	59	84
Nichtidentifizierte Sequenzen (<i>n</i>)	12	2

Die unterschiedliche Diversität der Klonbanken wird anschaulich in den Akkumulationskurven für gefundene Phylotypen bei zunehmender Zahl der Untersuchungen der jeweiligen Klonbank (siehe Abb. 3-1): Die Klonbank 27f/519r wird durch schwarze Linie, 515f/1525r durch die graue Linie repräsentiert. Die graue Kurve flacht schnell ab, da die Klonpopulation wenig divers ist, während der Anstieg der schwarzen Kurve annähernd linear ist, hier also mit der Bestimmung weiterer, noch nicht gefundener Phylotypen bei Fortsetzung der Untersuchungen zu rechnen ist.

Abbildung 3-1. Akkumulationskurve für Klonbanken von Parodontitispatienten (schwarz 27f/519r; grau 515f/1525r)

Die nachfolgende Abbildung 3-2 zeigt etablierte bakteriellen Spezies des Patientenkollektivs, deren Sequenz mindestens zu 99% mit der GenBank Datenbank übereinstimmen. Die schwarzen Balken stellen die Häufigkeit der Klone, die hellen Balken die Zahl der Patienten dar, bei denen diese Keime nachgewiesen wurden. Das Keimspektrum der an Parodontitis erkrankten Personen ist verglichen mit dem der gesunden Probanden deutlich diverser. 34 Spezies wurden mehr als einmal in der gesamten Klonpopulation gefunden. Sequenzen identisch mit *Porphyromonas gingivalis* konnten 55 mal bei 16 von 26 Patienten, Sequenzen identisch mit *Filifactor alocis* konnten 28 mal bei 12 Patienten und Sequenzen identisch mit *Treponema socranskii* konnten 18 mal bei 14 Patienten nachgewiesen werden. Es sei anzumerken, dass aufgrund des technischen Bias, welcher der PCR von multibakteriellen Proben eigen ist, die obigen Zahlenverhältnis nur näherungsweise den Proportionen an Spezies in der gemischt-bakteriellen Population entsprechen können.

Abbildung 3-2. Etablierte bakterielle Arten (schwarze Balken) und deren Verteilung im Patientenkollektiv (grau)



Die Diversität im parodontalen Biofilm wird erneut in den Tabellen 3-2 und 3-3 deutlich, in denen die Sequenzen den bakteriellen Familien zuordnen werden.

Tabelle 3-2. Die Klonpopulation 27f/519r der Parodontitispatienten

Familien	Klone (n)	Identität (%);Umfang	Phylotypen (n)
<i>Porphyromonadaceae</i>	75	99,0; 92–100	10
<i>Prevotellaceae</i>	48	97,8; 96–100	21
<i>Fusobacteriaceae</i>	49	98,2; 97–99	24
<i>Spirochaetaceae</i>	24	98,4; 95–100	17
<i>Bacteroidaceae</i>	21	98,6; 97–100	7
<i>Neisseriaceae</i>	15	98,8; 97–99	6
<i>Eubacteriaceae</i>	9	97,8; 95–100	4
<i>Streptococcaceae</i>	9	98,8; 97–100	6
<i>Campylobacteraceae</i>	8	98,1; 97–99	5
<i>Flavobacteriaceae</i>	7	98,3; 96–100	5
<i>Deferribacteraceae</i>	6	98,6; 97–100	5
<i>Acidaminococcaceae</i>	5	98,3; 97–99	5
<i>Lachnospiraceae</i>	4	–; 89–98	4
<i>Pasteurellaceae</i>	4	–; 98–99	3
<i>Mycoplasmataceae</i>	3	–; 98–99	1
<i>Enterobacteriaceae</i>	2	–; 97–100	1
<i>Pseudomonadaceae</i>	2	–; 99–99	1
<i>Peptostreptococcaceae</i>	2	–; 97–99	2
<i>Actinomycetaceae</i>	1	99	1
<i>Coriobacteriaceae</i>	1	98	1
<i>Desulfobaceae</i>	1	98	1
<i>Desulfomicrobiaceae</i>	1	100	1
<i>Holosporaceae</i>	1	100	1
<i>Micrococcaceae</i>	1	98	1
<i>Staphylococcaceae</i>	1	98	1

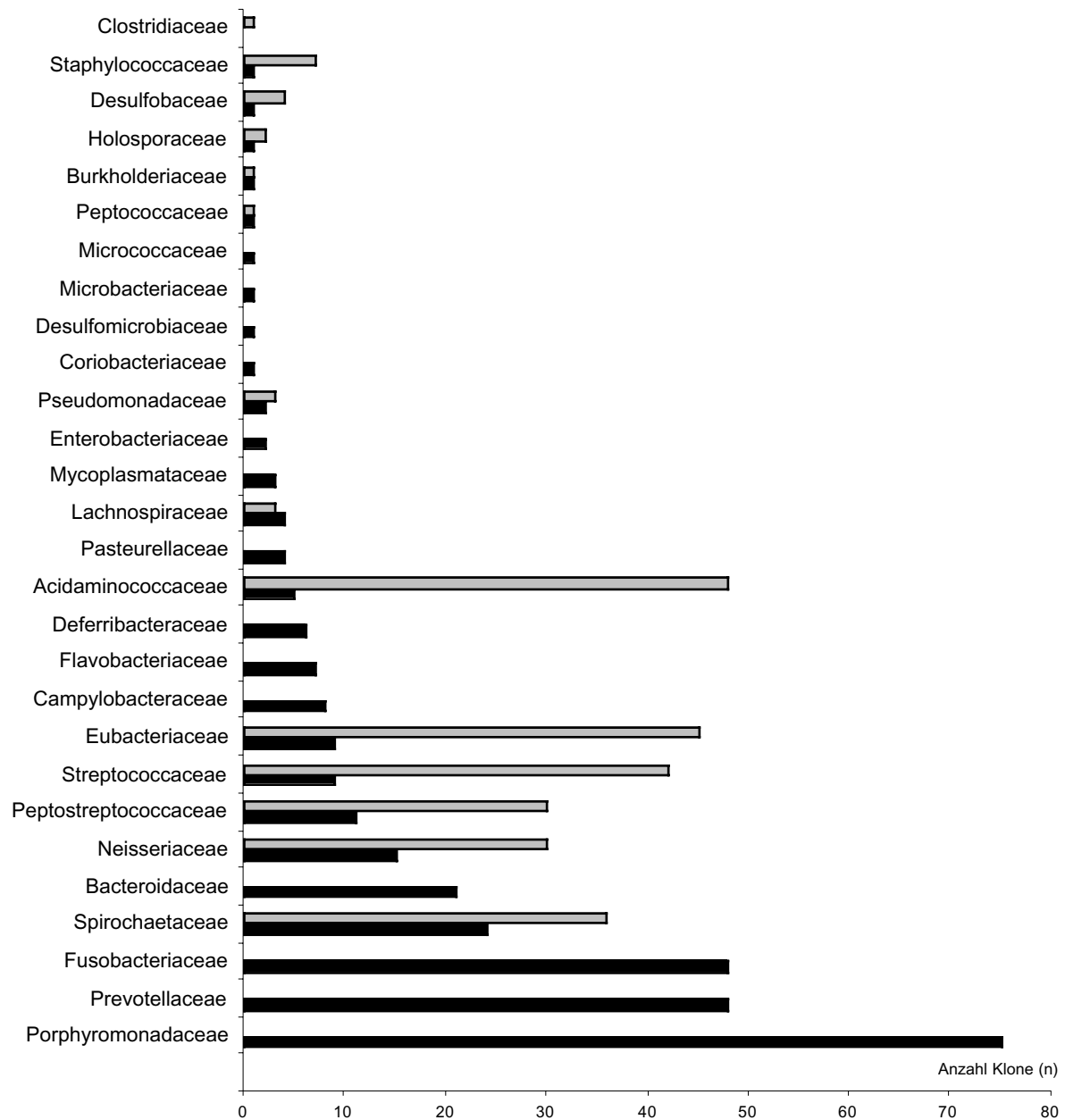
Tabelle 3-3. Die Klonpopulation 515f/1525r der Parodontitispatienten

Familien	Klone (n)	Identität (%); Umfang	Phylotypen (n)
<i>Acidaminococcaceae</i>	48	99,0; 97–100	15
<i>Eubacteriaceae</i>	46	98,6; 97–100	13
<i>Streptococcaceae</i>	41	99,1; 97–100	7
<i>Spirochaetaceae</i>	36	99,1; 98–100	13
<i>Neisseriaceae</i>	30	98,9; 97–100	8
<i>Peptostreptococcaceae</i>	30	99,2; 97–100	4
<i>Staphylococcaceae</i>	7	99,1; 99–100	2
<i>Desulfobaceae</i>	4	–; 98–99	2
<i>Lachnospiraceae</i>	3	–; 93–99	3
<i>Pseudomonadaceae</i>	3	–; 99–99	1
<i>Aerococcaceae</i>	2	–; 98–99,	1
<i>Peptococcaceae</i>	1	99	1
<i>Holosporaceae</i>	1	100	1
<i>Burkholderiaceae</i>	1	99	1
<i>Clostridiaceae</i>	1	94	1

Die beiden Klonbanken des parodontal erkrankten Kollektivs beinhalten Sequenzen einer beträchtlichen Anzahl unterschiedlicher bakterieller Familien. Die Repräsentation der Familien *Porphyromonadaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Prevotellaceae*, *Bacteroidaceae*, *Eubacteriaceae*, *Streptococcaceae* und *Acidaminococcaceae* in den Klonbanken unterschied sich dabei signifikant. Die Signifikanz der Ergebnisse nach Taxonomie für die jeweilige Klonbank wurde dazu mithilfe des Fisher's Exakt Testes ermittelt (siehe Tabelle 3-4).

Um die vorangegangenen Tabellen schematisch zu veranschaulichen, sind deren Daten in der Abbildung 3-3 in einem Diagramm dargestellt (schwarze Balken Primerpaar 27f/519r; graue Balken 515f/1525r). Die unterschiedliche Repräsentation bakterieller Familien in den Klonpopulationen des Biofilms erkrankter Personen wird deutlich. Abbildung 3-3 belegt, dass die beiden Klonbanken sich ergänzen und somit eine gute phylogenetische Repräsentation darstellen.

Abbildung 3-3. Repräsentationen bakterieller Familien nach Klonbank (schwarz 27f/519r, grau 515f/1525r)



Die in Abb. 3-3 dargestellten Daten wurden mittels Fisher´s exaktem Test untersucht (Tabelle 3-4).

Tabelle 3-4. Fisher´s exakter Test für taxonomische Familien

Taxonomische Familie	27f/519r	515f/1525r	Fischer´s 2-tail: p-Wert
<i>Porphyromonadaceae</i>	75	0	3,90 E-06
<i>Prevotellaceae</i>	48	0	3,90 E-06
<i>Fusobacteriaceae</i>	48	0	3,90 E-06
<i>Spirochaetaceae</i>	24	36	1,91 E-02
<i>Bacteroidaceae</i>	21	0	3,43 E-06
<i>Neisseriaceae</i>	15	30	2,86 E-03
<i>Peptostreptococcaceae</i>	11	30	2,48 E-04

Taxonomische Familie	27f/519r	515f/1525r	Fischer´s 2-tail: p-Wert
<i>Streptococcaceae</i>	9	42	1,41 E-08
<i>Eubacteriaceae</i>	9	45	1,80 E-09
<i>Campylobacteraceae</i>	8	0	9,50 E-03
<i>Flavobacteriaceae</i>	7	0	1,81 E-02
<i>Deferribacteraceae</i>	6	0	3,48 E-02
<i>Acidaminococcaceae</i>	5	48	5,13 E-013
<i>Pasteurellaceae</i>	4	0	0.13
<i>Lachnospiraceae</i>	4	3	1
<i>Mycoplasmataceae</i>	3	0	0.25
<i>Enterobacteriaceae</i>	2	0	0.50
<i>Pseudomonadaceae</i>	2	3	0.66
<i>Coriobacteriaceae</i>	1	0	1
<i>Desulfomicrobiaceae</i>	1	0	1
<i>Microbacteriaceae</i>	1	0	1
<i>Micrococcaceae</i>	1	0	1
<i>Peptococcaceae</i>	1	1	1
<i>Burkholderiaceae</i>	1	1	1
<i>Holosporaceae</i>	1	2	0.59
<i>Desulfobaceae</i>	1	4	0.18
<i>Staphylococcaceae</i>	1	7	0.02
<i>Clostridiaceae</i>	0	1	0.45
<i>Aerococcaceae</i>	0	2	0.20
Familien gesamt	310	255	

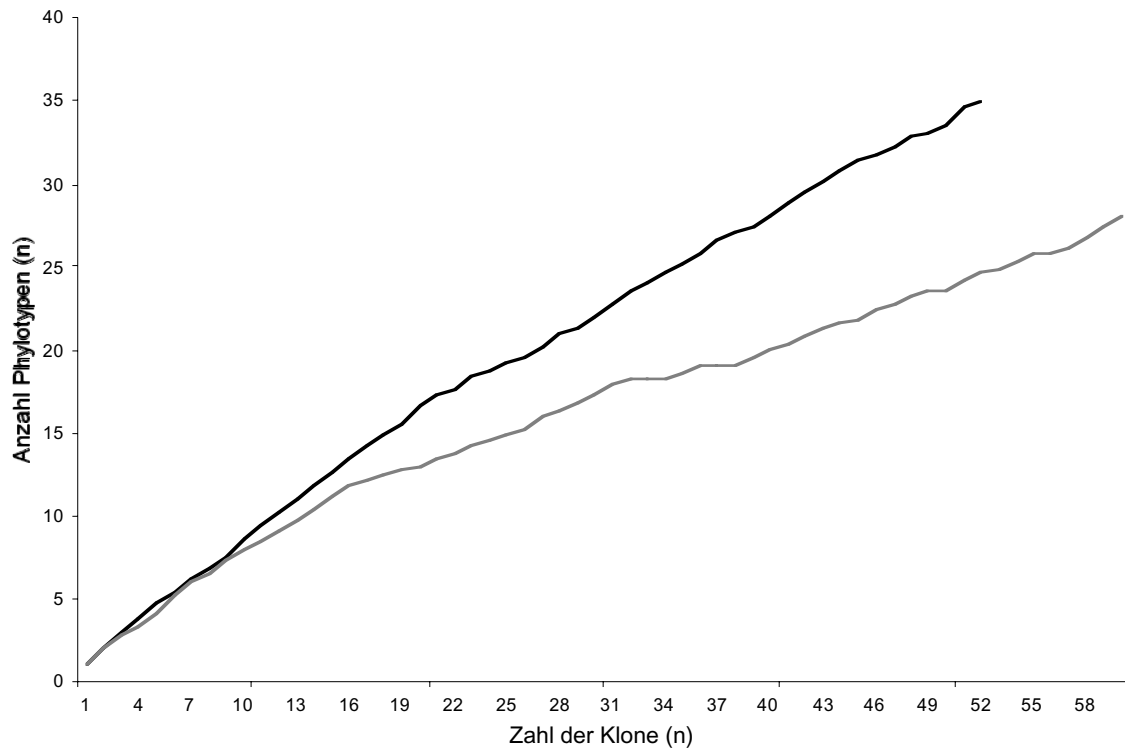
Die Zuordnung von Sequenzen einer bakteriellen Spezies mit gesicherter Taxonomie erfolgte durch einen Abgleich der Datenbank von GenBank mit BLAST unter stringenten Bedingungen d.h. eine 99% Identität war erforderlich.

3.2 Vergleich der bakteriellen Spektren beider Kollektive

Die Untersuchung der parodontal gesunden Probanden erfolgte nach den gleichen Methoden wie die des parodontal erkrankten Kollektivs. Insgesamt wurden 112 Klone nachgewiesen, mit 35 Phylotypen in der 27f/519r Klonbank (entspricht einem Umfang von C= 52%) und 28 Phylotypen in der 515f/1525r Klonbank (entspricht einem Umfang von C=63%). Die Diversität des Biofilms

gesunder Personen, trotz geringer Zahl untersuchter Klone, war also deutlich geringer als bei parodontal erkrankten Personen. In Abb. 3-4 ist die Akkumulationskurve der Phylotypen, für die phylogenetische Untersuchung des Keimspektrum der parodontal Gesunden aufgeführt.

Abbildung 3-4. Akkumulationskurve für die Klonbanken gesunder Probanden (schwarz 27f/519r; grau 515f/1525r)

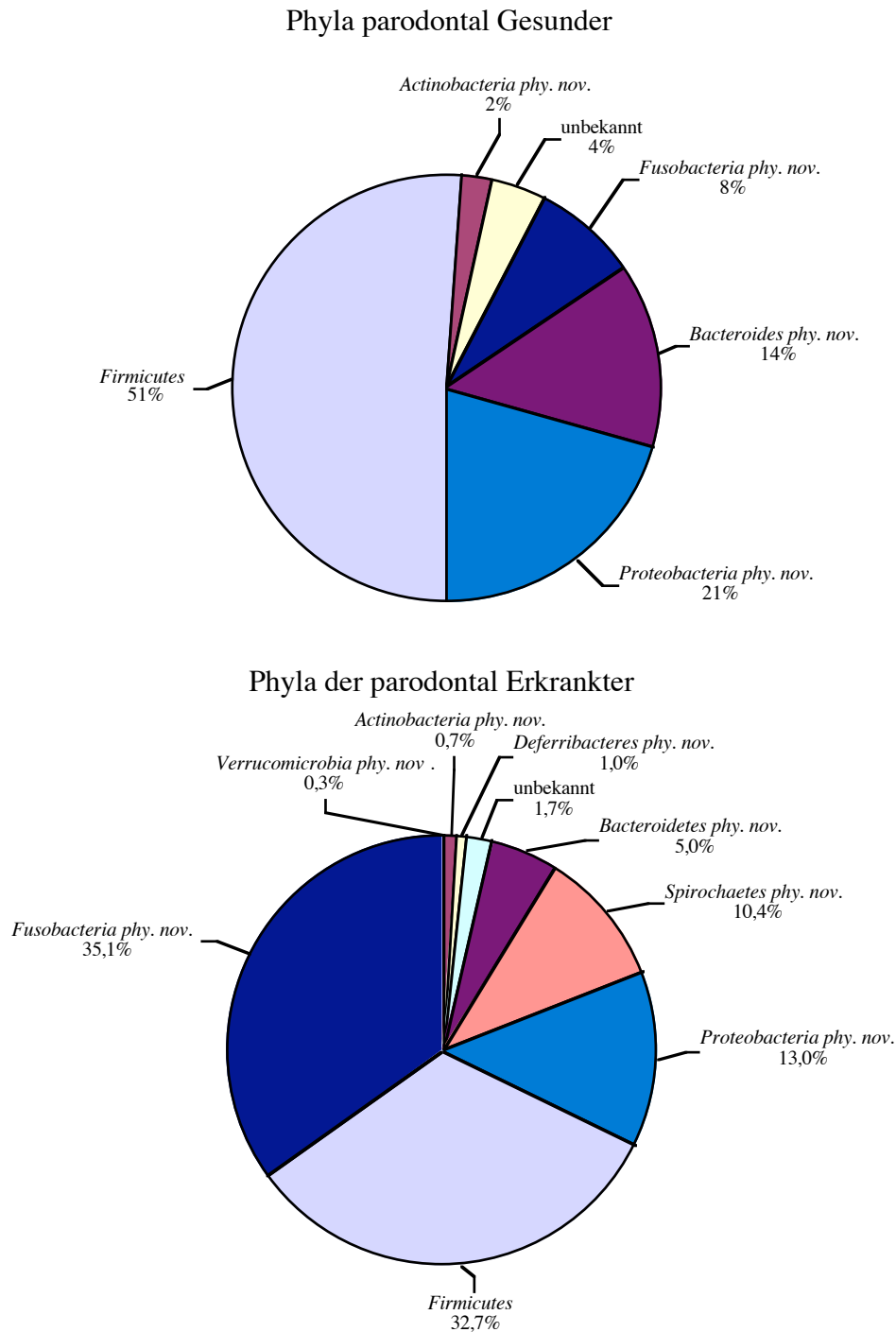


Die schwarze Linie zeigt die Akkumulation für Primerpaar 27f/519r, die graue Linie die für das Primerpaar 515f/1525r. Trotz des kleinen Patientenkollektivs von sechs Personen sind mehr als 52 % für Primerpaar 27f/519r bzw 63 % für das Primerpaar 515f/1525r der statistisch zu erwartenden Phylotypen nachgewiesen worden.

In den folgenden Kuchendiagrammen (Abb. 3-5) wird die Zunahme der Diversität und die rapide Keimverschiebung des bakteriellen Spektrums für die parodontale Klonpopulation veranschaulicht. Vergleicht man die Keimspektren beider Kollektive entsprechend ihrer *Phyla* wird der Rückgang folgender *Phyla* in der Parodontitis deutlich: BXIII (*Firmicutes*) von 51 % auf 32,7 %; BXII (*Proteobacteria phy. nov.*) von 21 % auf 13 %; BXX (*Bacteroidetes phy. nov.*) von 14 % auf 5 % und geringfügig BXIV (*Actinobacteria phy. nov.*) von 2 % auf 0,7 %. Dagegen ist ein deutlicher

Anstieg von *Phylum BXXI (Fusobacteria phy. nov.)* von 8 % auf 35,1 % und ein Neuaufreten des *Phylums BXVII (Spirochaetes phy. nov.)* mit 10,4 % zu verzeichnen. Die taxonomische Zuordnung erfolgte nach Garrity *et al.*, 2001.

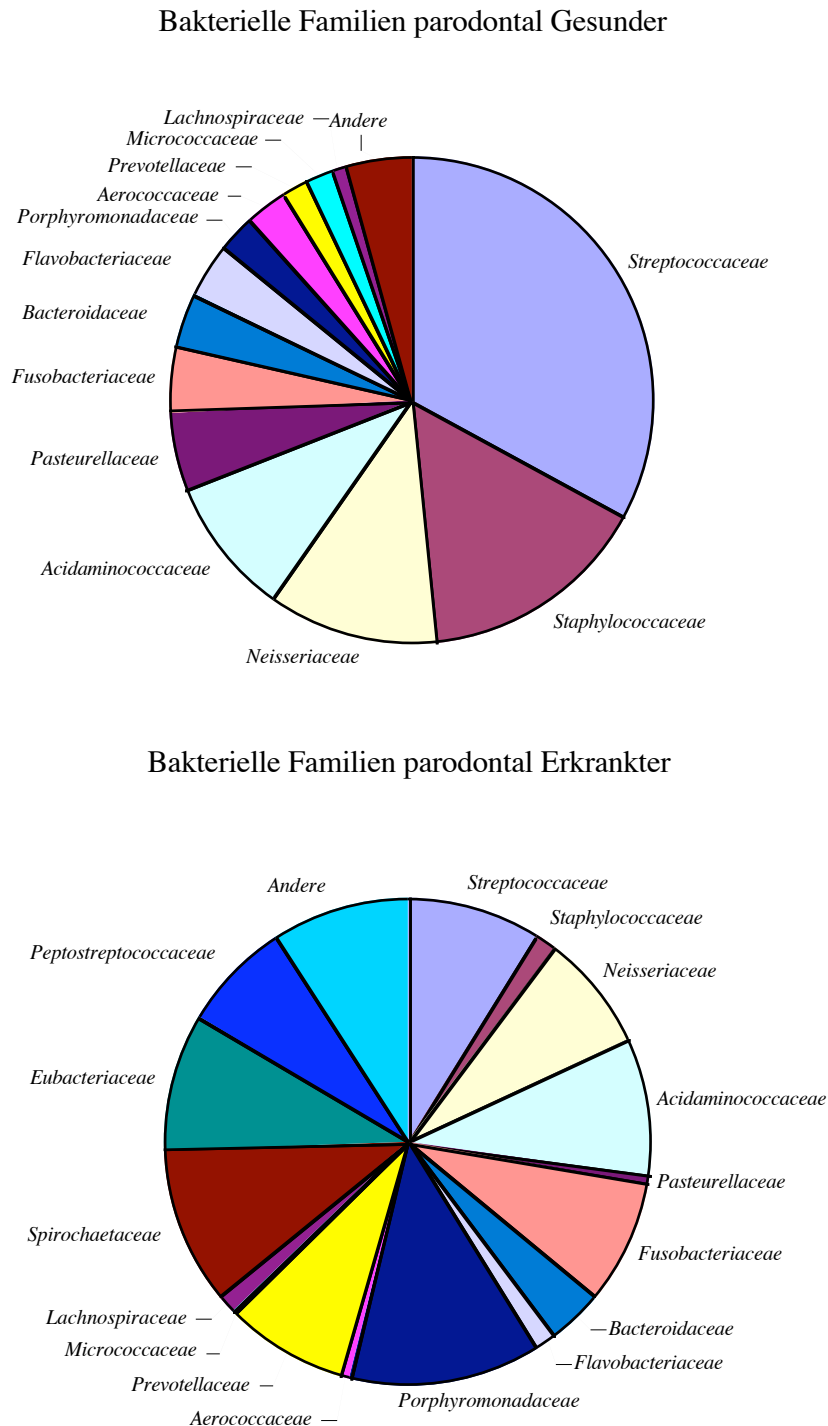
Abbildung 3-5. Vergleich der identifizierten Phyla



Die Abbildung 3-6 vergleicht die bakteriellen Familien der parodontal Gesunden und der parodontal Erkrankten. Sie zeigt für die parodontal gesunde Klonpopulationen die starke Gewichtung auf

den *Streptococcaceae*, *Staphylococcaceae*, *Neisseriaceae*, *Acidaminococcaceae* und *Pasteurellaceae* (*Phyla* BXII und BXIII) die 72 % des Keimspektrums im Biofilm von Gesunden ausmachen.

Abbildung 3-6. Vergleich der identifizierten bakteriellen Familien

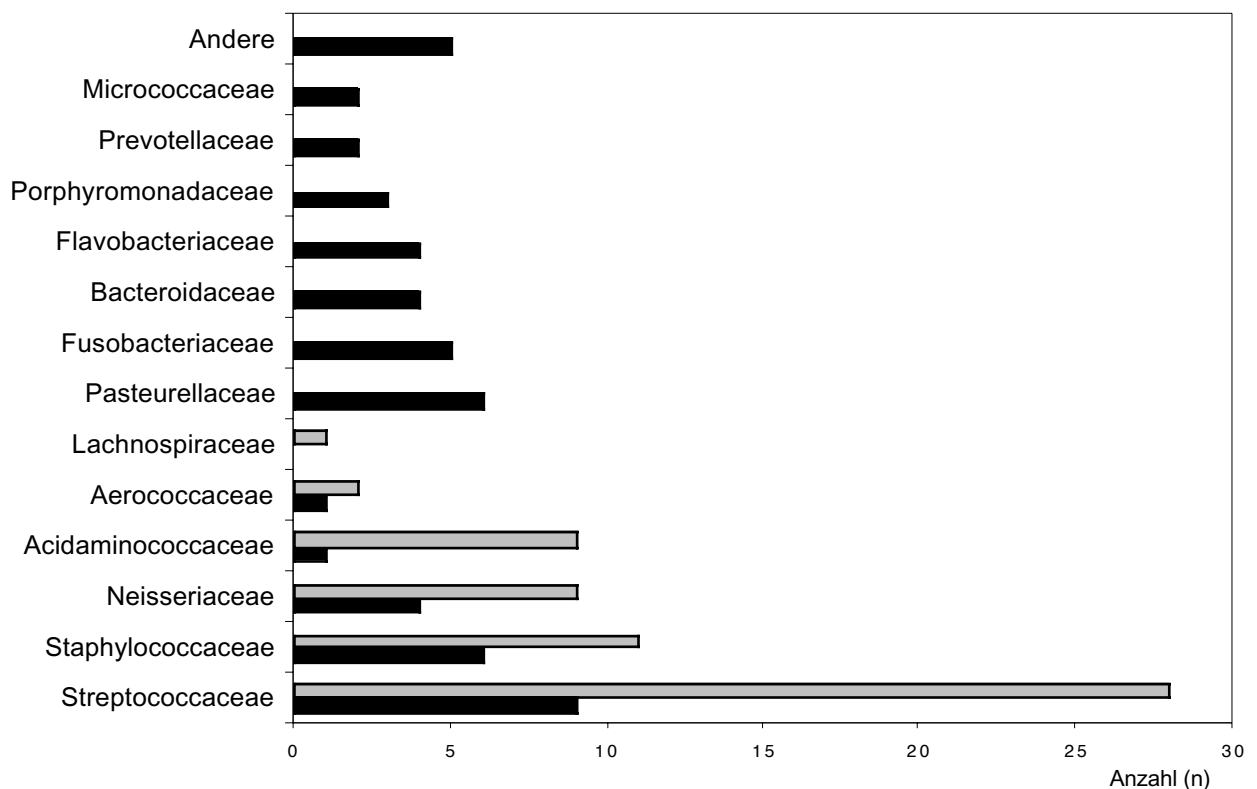


Diese Gruppe macht im Vergleich zum Keimspektrum der Klonpopulationen der parodontal Erkrankten nur noch etwa 28 % aus, mit Keimverschiebung innerhalb des *Phylums* BXIII durch Neutauftreten von *Peptostreptococcaceae* und *Eubacteriaceae* (BXIII), sowie deutlicher Zunahme

von *Prevotellaceae* und *Porphyromonadaceae* (Phylum BXX), sowie *Fusobacteriaceae* (Phylum BXXI) und Neuauftreten von *Spirochaetaceae* (BXVII).

In Abbildung 3-7 wird das Keimpektrum der parodontal gesunden Personen nach Familien zusammengefasst und unterteilt nach Primerpaaren 27f/519r (schwarze Balken) und 515f/1525r (graue Balken) dargestellt: Das Keimpektrum bei gesundem Parodont stellt sich sehr überschaubar dar mit einer besonderen Gewichtung auf den *Streptococcaceae*, *Staphylococcaceae*, *Neisseriaceae*, *Acidaminococcaceae* und *Pasteurellaceae*, die 74 % des Keimpektrums im Biofilm von Gesunden ausmachen. *Prevotellaceae*, *Fusobacteriaceae* und *Porphyromonadaceae* sind dagegen nur zu einem geringen Anteil vorhanden.

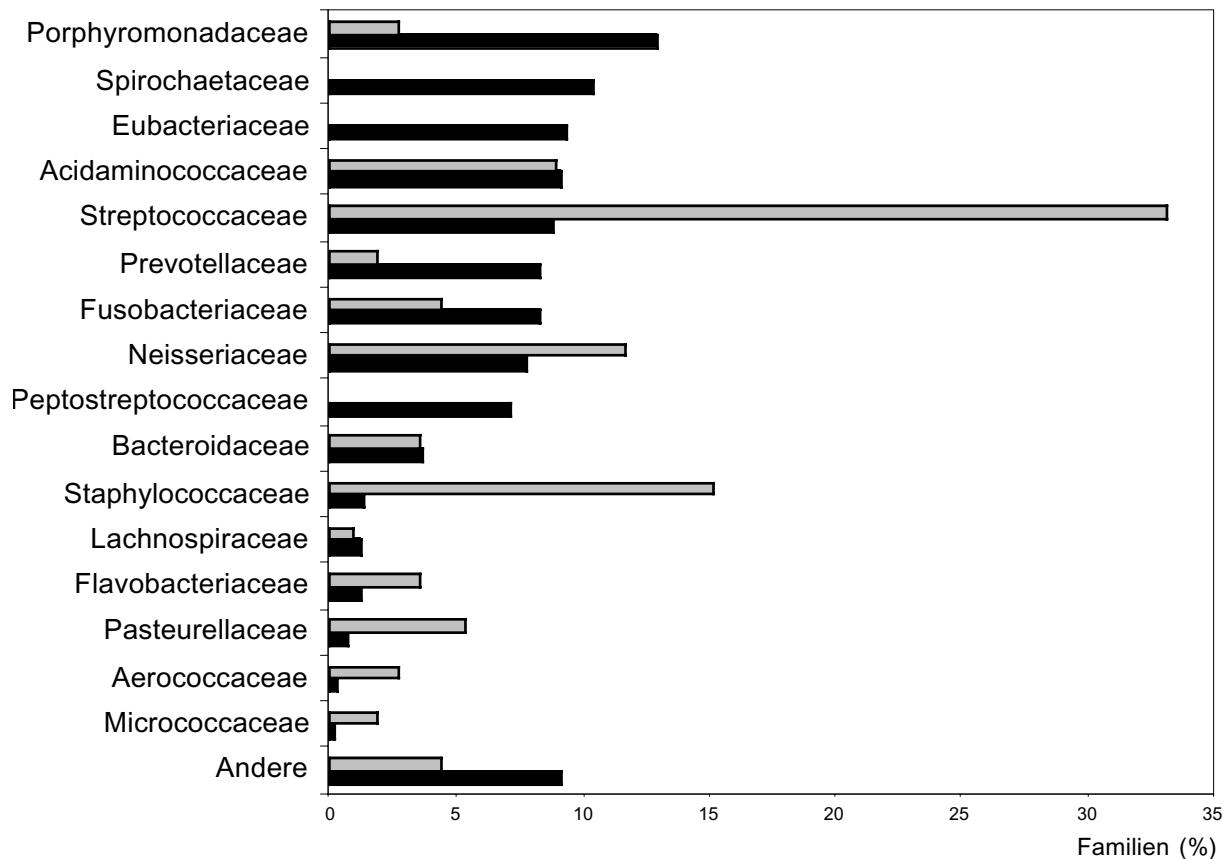
Abbildung 3-7. Bakterielle Familien parodontal Gesunder: Klonbank 27f/519r (schwarz), 515f/1525r (grau)



In Abbildung 3-8 werden die Ergebnisse für die Klonbanken 27f/519r und 515f/1525r jeweils zusammengefasst und das erkrankte Kollektiv (schwarz) dem gesunden Kollektiv (grau) prozentual gegenübergestellt: *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae* und *Fusobacteriaceae* treten in der Parodontitis verstärkt auf. Weiterhin kommt es zu einem Neuauftreten der *Spirochaetaceae*,

Eubacteriaceae und *Peptostreptococcaceae* im parodontalen Biofilm, unter Verdrängung von *Streptococcaceae*, *Staphylococcaceae*, *Neisseriaceae* und *Pasteurellaceae*. *Acidaminococcaceae* sind unbeeinträchtigt .

Abbildung 3-8. Bakterielle Familien des gesunden (grau) und des erkrankten Kollektivs (schwarz) im Vergleich



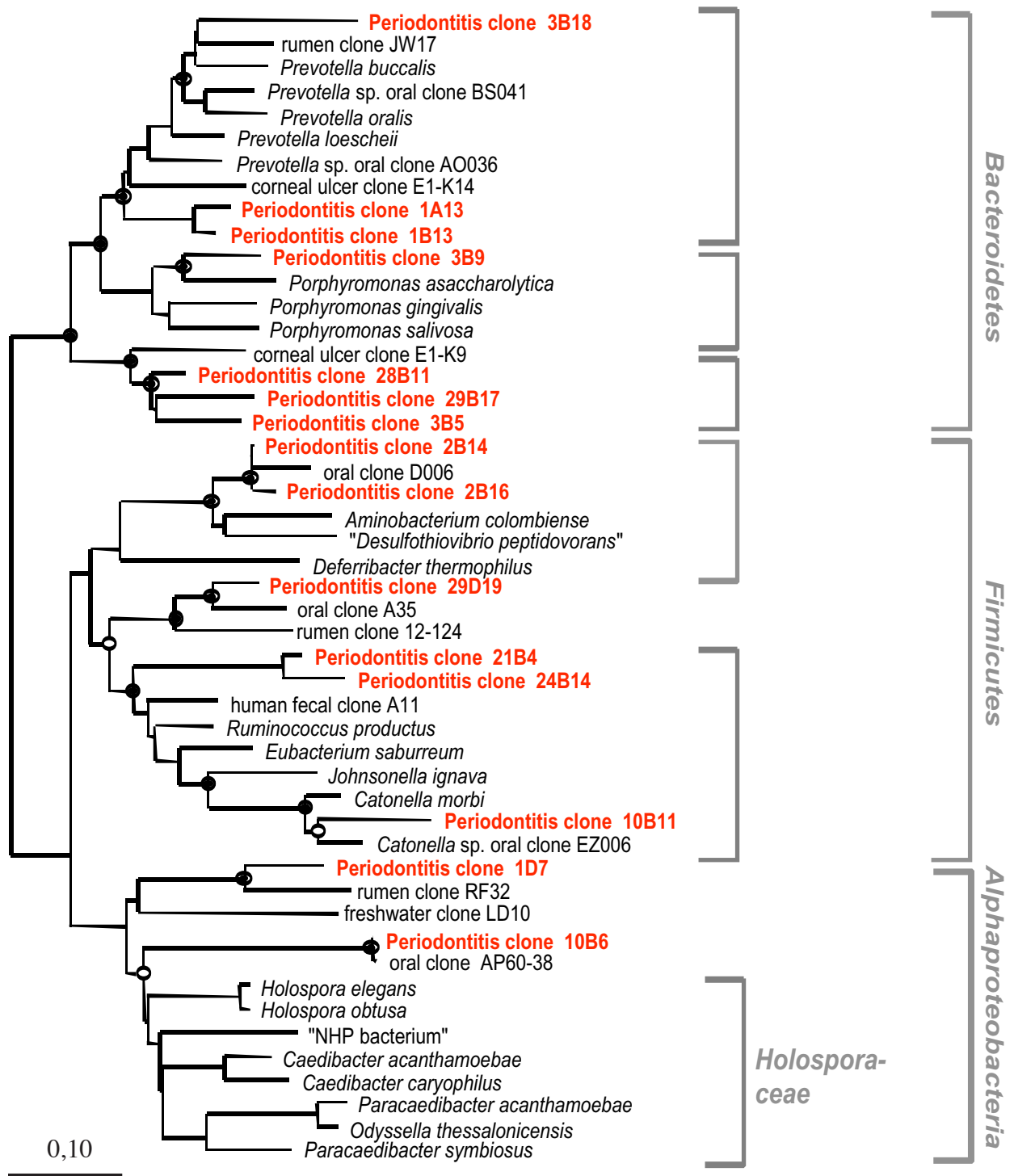
Weitere, für ein anaerobes Milieu charakteristische Keime (Anaerobier und fakultative Anaerobier), welche nur bei Erkrankten gefunden wurden, sind hier aufgrund der Übersichtlichkeit unter „Andere“ subsumiert. Es handelt sich dabei um die Familien *Campylobacteraceae*, *Deferribacteraceae*, *Pseudomonadaceae*, *Desulfobaceae*, *Mycoplasmataceae*, *Holosporaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Peptococcaceae*, *Burkholderiaceae*, *Coriobacteriaceae*, *Desulfomicrobiaceae*, *Microbacteriaceae* und *Clostridiaceae*.

3.3 Neuartige Sequenzen

Nur 14 Sequenzen waren weniger als 97% identisch zu aktuellen GenBank Einträgen. Die niedrige Zahl der neuen Sequenzen weist darauf hin, dass 16S rRNA Geneinträge von Menschen mit Parodontitis das Spektrum annähernd abdecken. Eine phylogenetische Analyse dieser Sequenzen erfolgte in Zusammenarbeit mit Matthias Horn, *Microbial Ecology Group*, jetzt Universität Wien: Abbildung 3-9 zeigt die phylogenetische Verwandtschaft neuer Klone (mit einer Identität zu bekannten Sequenzen von < 97 %) mit ausgewählten Spezies und Phylotypen. Parsimony *bootstrap* Werte (nach der ARB Methode „upper bootstrap limits“) größer 80% bzw. größer 90 % sind dargestellt mit dem Symbol ○ bzw. ● für (Bootstrap Methode nach Efron, B., 1979). Der Stammbaum wurde mittels *Neighbour-joining* Methode entwickelt. Das Lineal stellt 10% der geschätzten evolutionären Distanz dar. Bis auf Klon 10B6 wurde jede dieser 14 von insgesamt 578 Sequenzen jeweils in einem einzigen Patienten gefunden. Klone, welche in dieser Studie entdeckt wurden sind rot bzw. fett gedruckt. Die Bezeichnung der Klone erfolgte nach Nummer des Patienten, Benutzung des Primerpaars (B für 27f/519r; D für 515f/1525r), sowie Nummer der Probe.

Die jeweilige Länge gemessen in Basenpaaren (bp) der Sequenzen war wie folgt: 1B13: 485 bp; 2B14: 440 bp; 2B16: 441 bp; 3B5: 456 bp; 3B9: 479 bp; 3B18: 489 bp; 1A13: 430 bp; 1D7: 974 bp; 10B6: 1490 bp; 10B11: 470 bp; 21B4: 469 bp; 24B14: 444 bp; 28B11: 445 bp; 29B17: 381 bp; 29D19: 970 bp. Die neuen Sequenzen gehören zu sechs taxonomischen Familien der Phyla *Bacteroidetes*, *Firmicutes* und *Alphaproteobacteria* (mittlere Sequenzlänge 527; Umfang 381-974). Zwei dieser Familien (*Flexibacteraceae* und *Syntrophomonadaceae*) werden nicht durch andere Phylotypen in dieser Studie repräsentiert.

Abbildung 3-9. Phylogenetischer 16S rRNA Stammbaum (erstellt von Matthias Horn, Universität Wien, veröffentlicht in Hutter *et al.*, 2003)



Ein weiterer phylogenetisch untersuchter Klon, 10B6, war identisch mit der 480 bp langen Sequenz von AP60-38, abgelegt in GenBank (Sakamoto *et al.*, 2000): Fast das gesamte 16S rRNA Gen des oralen Klons 10B6 wurde durch PCR von Dr. med. G. Valenza, Mikrobiologie Univ.

Würzburg, mittels Primerpaaren 27f/GV1r und GV2f/1525r und der aufgereinigten DNA der Patientenprobe Nr.10 als Template bestimmt. Die phylogenetische Einordnung der Sequenz des oralen Klons 10B6 repräsentiert eine neue evolutionäre Linie innerhalb der *Alphaproteobacteria*, am ehesten verwandt mit der Familie der *Holosporaceae*, welche sich ausschließlich zusammensetzt aus *Rickettsia*-artigen, obligat intrazellulären Symbionten der Paramecien und frei-lebenden Amöben.

4 Diskussion

4.1 Untersuchungsmethoden

Die Identifikation von Mikroorganismen in der Umwelt, insbesondere im Rahmen von Infektionen, ist durch die kulturunabhängige Bestimmung mittels der 16S rDNA erheblich erleichtert worden, hat dabei aber neue Probleme aufgeworfen, welche mit dieser Technik in Verbindung stehen, wie zum Beispiel Chimärenbildung oder Verschiebung der Klonpopulationen bei Verwendung verschiedener Primerpaaren. Daraus folgen Probleme bei der absoluten, sowie relativen Repräsentation komplexer Keimgemische. Dies erfordert z.B. eine ausreichende Sequenzlänge und eine umfangreiche Datenbank zur eindeutigen phylogenetischen Einordnung und zum Ausschluß von Chimären.

Zur Charakterisierung der parodontalen Mikroflora des parodontalen Biofilms wurden von Dzink J.L. *et al.* (1988) und Moore & Moore (1994) sehr aufwendige Studien mittels Kultivierung durchgeführt. Die erste umfangreiche, kulturunabhängige Studie in der Erforschung putativer parodontaler Bakterien wurde von Socransky *et al.* (1998) vorgelegt. Sie lieferte Hypothesen über die Assoziation von Keimen mit parodontaler Erkrankung. Die Ergebnisse inzwischen durchgeführter molekularer Studien zeigen, dass 16S rRNA Sequenzen der Mikroflora bei parodontalen Läsionen weitgehend durch öffentliche Datenbanken abgedeckt werden, wobei z.B. genetische oder geographische Herkunft teilweise verschiedene Ergebnisse erklären (Kroes *et al.*, 1999; Paster *et al.*, 2001; Sakamoto *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden 26 Patienten und sechs gesunde Personen als Kontrollgruppe untersucht. Durchschnittlich wurden pro Patient 22 Klone untersucht. Durch Verwendung zweier PCR Primerpaare wurde eine hohe Anzahl verschiedener Phylotypen erreicht.

Die PCR Produkte mit 27f/519r und 515f/1525r unterschieden sich signifikant in ihrem Profil der Spezies, welche sie repräsentieren. Bei Primerpaar 27f/519r sah man gegenüber 515f/1525r einen höheren Diversitätsgrad. Dies könnte daran liegen, dass der entsprechende 16S rRNA Genabschnitt eine höhere diskriminatorische Eigenschaft besitzt. Die Primer 27f und 519r werden seit vielen Jahren zur 16S rRNA Amplifikation (27f) bzw. Sequenzierung (519r) verwendet (Lane, 1991). Als PCR Primer kombiniert wurden sie zur molekularen Analyse von parodontalen Bakterien in zwei Studien eingesetzt (Choi *et al.*, 1994; Jung *et al.*, 2000). In beiden Studien haben deren Autoren Inserts ihrer Klonbanken nicht für Sequenzierungen verwendet. Choi *et al.* (1994) untersuchte eine 27f/519r Klonbank mit spezifischen Sonden auf *Treponema spp.*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* und *Tannerella forsythensis*. Die gefundene Repräsentation dieser Spezies, entsprach der Repräsentation in der vorliegenden Arbeit. Ein Nachteil von Primerpaar 27f/519r ist, dass die generierten Sequenzen zu kurz sind, um ihre phylogenetische Position eindeutig zu bestimmen, falls es keine nahverwandte Sequenzübereinstimmung in der Datenbank gibt. Wir postulieren aber, dass die diskriminative Fähigkeit des Primerpaars erschlossen werden kann, wenn genügend Daten in der Datenbank vorhanden sind, wie es bei den oralen Bakterien der Fall ist.

Actinomyces spp. wurden nur einmal in beiden Klonbanken gefunden, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* wurde nicht identifiziert. Dass das Primerpaar 515f/1525r die 16S rRNA Gene von *Actinomyces spp.* amplifizieren kann, war bekannt (Kroes *et al.*, 1999). Daher wurde anfänglich angenommen, dass die DNA von *Actinomyces spp.* durch die gewählte Extraktionsmethode nicht ausreichend aufgeschlossen wurde. Eine spätere Untersuchung im gleichen Labor zur parodontalen Flora von Patienten mit Hypophosphatasie (Valenza *et al.*, 2006) zeigte, dass *Actinomyces spp.* mühelos nach dem gleichen Protokoll detektiert werden konnte. Es muss daher angenommen werden, dass DNA von *Actinomyces spp.* nur geringfügig in den analysierten Proben der Studie vorlagen. Die Untersuchung der 16S rRNA Gensequenz von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

(GenBank Eingangs-Nr. M75035) zeigte Anlagerungsstellen für die Primer 27f, 515f und 519r (der Eintrag ist ohne das 3' Ende der Sequenz; daher kann Anlagerungsstelle von 1525r nicht bestätigt werden). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* könnte aufgrund seiner geringen Verbreitung in parodontalen Läsionen verfehlt worden sein: Ximenez-Fyvie *et al.* (2000) fanden unter Verwendung der Schachbrett DNA-DNA Hybridisierung ein niedriges Level von Hybridisierung, was annehmen lässt, dass DNA von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* nur in geringen Mengen in Parodontalproben vorliegt. Entsprechend fanden Paster *et al.* (2001) die Spezies nur einmal; Sakamoto *et al.* (2000) fanden sie in all ihren Klonpopulationen gar nicht. Darüberhinaus haben Studien mit Kultivierung von *Porphyromonas gingivalis* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gezeigt, dass *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in einem kleineren Verhältnis als *Porphyromonas gingivalis* auftritt (siehe Asikainen & Chen, 1999).

Die Klonbanken, welche mit dem Primerpaar 27f/519r generiert wurden, unterschieden sich bedeutend von denen mit dem Primerpaar 519f/1525r generierten bezüglich ihrer Repräsentation von *Porphyromonadaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Prevotellaceae*, *Bacteroidaceae*, *Eubacteriaceae*, *Streptococcaceae* und *Acidaminococcaceae*. In einem vorausgegangen Bericht analysierte und verglich Marchesi *et al.* (1998) systematisch die Primerpaare 27f/1392r und 63f/1387r und demonstrierte, wie Sequenzunterschiede Unterschiede in der Amplifikation von Spezies in einem polymikrobiellen Gemisch ergeben könnten. In der Praxis jedoch resultierte die Verwendung der Primerpaare 27f/1392r und 63f/1387r nur in einer moderaten Abweichung bezüglich der Amplifikation von *Alphaproteobacteria* und gram-positiven Bakterien. (O'Sullivan *et al.*, 2002). Kroes *et al.* (1999) berichteten von unterschiedlicher Vervielfältigung von *Capnocytophaga* und *Actinomyces spp.* bei der Verwendung verschiedener PCR Primerpaaren in ihrer Studie an parodontalen Bakterien. Sequenzanalysen der Mikroflora des Zökums von Legehühnern erbrachte bemerkenswerte Unterschiede in der Amplifikation von einer Untergruppe von *Selenomonas ruminantium*, falls Primer 515FPL statt 8FPL verwendet wurde (Zhu *et al.*, 2002). Diese Berichte und die vor-

liegende Untersuchung kommen zum Schluss, verschiedene Primerpaare für die Sequenzierarbeiten von gemischten bakteriellen Populationen zu gebrauchen, um die bestmögliche Repräsentation von Spezies in einer Klonbank zu erreichen.

Vierzehn neue, in dieser Studie gefundene Sequenzen, wurden der Datenbank GenBank beigefügt. Phylogenetische Analysen ordneten diese Sequenzen sechs Familien innerhalb der Phyla *Bacteroidetes*, *Firmicutes* und *Alphaproteobacteria* zu. Da es bisher keine Daten zu deren Rolle in der Pathogenität der Parodontitis gibt, stehen weitere sensitivere Methoden aus, die Verbreitung der neuen Phylotypen innerhalb von Patienten und Gesunden zu untersuchen. Weiterhin wird hier von der Komplettierung der 16S rRNA Gensequenz von Klon 10B6 berichtet, die anfangs mit einer in GenBank abgelegten Teilsequenz (480 bp) übereinstimmte, und deren Phylogenetik nicht zweifelsfrei gelöst werden konnte (Sakamoto *et al.*, 2000). Die komplette Sequenz von Klon 10B6 sollte sich nun als neue evolutionäre Linie innerhalb der *Alphaproteobacteria* erweisen, am nächsten verwandt mit der Familie *Holosporaceae*. Die Familie *Holosporaceae* umfasst ausschließlich *Rickettsia*-artige, obligat intrazelluläre Symbionten der Paramecien und frei-lebenden Amöben (Horn *et al.*, 1999; Springer *et al.*, 1993). Aufgrund der Beobachtung von Amöben in parodontalen Läsionen, muss in weiteren Untersuchungen überprüft werden, ob 10B6 ein Endosymbiont oraler Amöben wie z.B. *Entamoeba gingivalis* ist (Dao *et al.*, 1983; Gottlieb & Miller, 1971; Keller *et al.*, 1967; Lucht *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 1995). Obwohl Endosymbionten für *Entamoeba gingivalis* nicht beschrieben wurden, schließen Daten, die in der Literatur zugänglich sind, ihre mögliche Existenz nicht aus.

4.2 Vergleich fakultativer Pathogene anderer Studien

In publizierten Studien kulturabhängiger Methoden werden Spezies postuliert, die in gesunden Populationen nicht auftreten oder bei erkrankten Kollektiven eine extreme Zunahme erfahren haben. Dzink J.L. *et al.* (1988) konnte mittels kulturabhängiger Methoden folgende Bakterien mit

einer progressiven Parodontitis assoziieren: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* und *Tannerella forsythensis* (vormals *Bacteroides forsythensis*). Bis auf *A. actinomycetemcomitans* wurden diese Keime auch in der vorliegenden Studie nachgewiesen und spiegeln die Keimverschiebung bei parodontalen Erkrankungen wieder, da diese Keime auch bei gesunden Personen in kleineren Zahlen gefunden werden. Möglicherweise ist dieses Mengenverhältnis alleine ein pathogener Faktor. Moore & Moore, (1994) gehen nach umfangreichen kulturabhängigen Untersuchungen von insgesamt 34 pathogenen Spezies aus, darunter verschiedene *Selenomonas spp.*, *Prevotella spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Leptotrichia spp.*, *Eubacterium spp.*, *Campylobacter spp.*, sowie *Filifactor alocis*, *Dialister pneumosintes*, *A. actinomycetemcomitans*, eine *Mycoplasma sp.* und fünf *Treponema spp.*. Eine herausragende, weil wegbereitende Funktion für parodontale Erkrankungen sehen die Autoren für *Fusobacterium nucleatum*. Bis auf *A. actinomycetemcomitans* konnten alle genannten Familien auch in der vorliegenden Studie nachgewiesen werden. Socransky *et al.* (1998) hat bei Clusteranalysen von über 13000 Plaqueproben die pathogenen Cluster folgender Spezies hervorgehoben: *Tannerella forsythensis*, *Porphyromonas gingivalis* und *Treponema denticola*; sowie *F. nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros* und *Eubacterium nodatum*. Für parodontale Gesundheit dagegen sprechen nach Socransky *et al.* (1998) die Cluster *Veillonella parvula*, *Actinomyces odontolyticus* bzw. *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* und *Streptococcus sanguis*. Ein direkter Vergleich der vorliegenden Arbeit mit der Studie von Socransky *et al.*, kann jedoch aufgrund der unterschiedlichen Datenmenge und deren statistische Aufarbeitung nicht erfolgen, die genannten Keime konnten aber nachgewiesen werden, so dass eine Pathogenität von bestimmten Clustern nicht ausgeschlossen werden kann. Sakamoto *et al.* (2000) konnte bei der Untersuchung von Saliva mittels PCR Techniken zweier erkrankter und einer gesunden Person folgende Spezies nicht nachweisen: *Fusobacterium nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *T.*

denticola und muß somit deren Pathogenität anzweifeln. Für eine Parodontitis dagegen sprachen laut der Autoren *C. rectus*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. socranskii*, *Abiotrophia*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella spp. etc.* Die kleine Zahl der von Sakamoto untersuchten Probanden schränkt die Aussagekraft jedoch stark ein.

Paster *et al.* (2001) beschrieben 20 Phylotypen bzw. Spezies, welche in der Parodontitis, jedoch nicht bei gesunden Personen gefunden wurden. Die Autoren nehmen daher an, dass diese Phylotypen mögliche Pathogene sind. Die in Tabelle 4-1 aufgelisteten Sequenzen von Paster *et al.* (2001) wurden mit den Sequenzen aus der Studiendatenbank dieser Arbeit mit Hilfe eines lokalen BLAST Servers unter Verwendung eines Cutt-offs von 99% für eine Sequenzidentität verglichen. Zwölf dieser putativen Pathogene wurden bei einem bis zu zwölf Individuen nachgewiesen. Um Aufschluss darüber zu erhalten, ob diese Sequenzen auch bei Gesunden zu finden sind, wurden 112 Sequenzen von sechs zahngesunden Personen (52 Sequenzen mit der Klonbank 27f/519r; 60 Sequenzen mit der Klonbank 515f/1525r) untersucht. Ein hoher Anteil der Sequenzen (74%) von den parodontal gesunden Individuen gehörten den Familien der *Streptococcaceae*, *Staphylococcaceae*, *Neisseriaceae* und *Acidaminococcaceae* an, dagegen machen diese Familien bei Parodontitispatienten nur 28% der Klone aus. Auch die Sequenzen der gesunden Personen, zusammengefasst in einer Datenbank, wurden mit den Sequenzen aus Tabelle 4-1 mit Hilfe eines lokalen BLAST Servers unter Verwendung eines Cutt-offs von 99% für eine Sequenzidentität verglichen.

Tabelle 4-1. Vergleich mit putativen Pathogenen von Paster *et al.* (2001)

<i>Phylotypen oder Spezies nach Paster et al., 2001</i>	GenBank Accession Nr	Parodontitis nach Paster	Parodontitis diese Studie	Gesunde diese Studie
<i>Treponema socranskii subsp. bucc.</i>	AF033305	1	7	
<i>Haemophilus paraphrophilus</i>	M75082	1		
<i>Desulfobulbus sp. oral clone R004</i>	AY005037	3	1	
<i>Campylobacter rectus</i>	L06973	3		
<i>Uncultured Eubacterium PUS9.170</i>	AJ012604	1		

<i>Phylotypen oder Spezies nach Paster et al., 2001</i>	GenBank Accession Nr	Parodontitis nach Paster	Parodontitis diese Studie	Gesunde diese Studie
<i>Streptococcus constellatus</i>	AF104676	1	1	
<i>Selenomonas-like sp. oral GAA14</i>	AF287789	2	1	
<i>Megasphaera sp. oral clone BB166</i>	AF287783	3	1	
<i>Gemella haemolysans</i>	M58799	1		
<i>Filifactor alocis</i>	AJ006962	4	9	
<i>Eubacterium saphenum</i>	U65987	3	1	
<i>Dialister pneumosintes</i>	X82500	1	3	
<i>Catonella morbi</i>	X87151	2	1	
<i>Granulicatella adiacens</i>	D50540	1	1	1
<i>Uncultured bacterium D084</i>	AF125200	1	1	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	L16492	3	12	1
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	L16491	3	4	
<i>Tannerella forsythensis</i>	L16495	2		
<i>Atopobium rimae</i>	X67149	1		
<i>Atopobium parvulum</i>	X67150	1		
Anzahl der Gesamtklone		38	43	2

Nur in einem einzigen parodontal gesunden Individuum wurde eine Sequenz zu 99% identisch mit *Granulicatella adiacens* und eine Sequenz zu 99% identisch mit *Porphyromonas gingivalis* entdeckt. Alle anderen putativen Pathogene wurden bei Gesunden nicht gefunden. Die Daten aus Tabelle 4-1 legen nahe, dass zumindest *Treponema socranskii subsp. buccale*, *Filifactor alocis*, *Dialister pneumosintes*, *Porphyromonas gingivalis* und *Porphyromonas endodontalis* tendenziell in der Parodontitis gefunden werden, in der Regel aber nicht bei parodontal Gesunden. Die meisten bakteriellen Familien, welche Paster *et al.* (2001) in seiner Studie erfasst hatte, wurden auch in dieser Studie nachgewiesen, mit Ausnahme der Sequenzen der Gruppe „obsidian pool (OP)11“ und TM7 - Sequenzen, welche zuerst für heiße Quellen und Sedimente der Tiefsee beschrieben wurden (Hugenholtz *et al.*, 1998b; siehe auch GenBank Nr. X97111; Hugenholtz *et al.*, 2001). Obwohl sich die PCR Protokolle der beiden Studien unterschieden, könnten die unterschiedlichen Ergebnisse auch dadurch erklärt werden, dass nur einer der sieben OP11 und TM7 Klone von Paster *et al.*, (2001) bei einem Patienten mit Parodontitis gefunden wurde, die anderen Funde dage-

gen mit akuter nekrotisierender ulzerativen Gingivitis und refraktärer Parodontitis assoziiert waren.

Paster *et al.* (2001) haben 20 Phylotypen vorgeschlagen, die mit der Parodontitis, aber nicht mit parodontaler Gesundheit assoziiert seien. Der Vorschlag erfolgte auf der Basis von neun Personen mit Parodontitis und fünf Gesunden. Unter den 20 von Paster *et al.* (2001) vorgeschlagenen Phylotypen waren mehrere Spezies, die von anderen Autoren bei Parodontitispatienten gefunden wurden, dies sind *Porphyromonas gingivalis*, *Filifactor alocis*, *Treponema socranskii*, *Dialister pneumosintes*, *Campylobacter rectus*, *Tannerella forsythensis* und *Streptococcus constellatus* (Albandar *et al.*, 1997; Contreras *et al.*, 2000; Dewhirst *et al.*, 2000; Macuch & Tanner, 2000; Moore & Moore, 1994; Ximenez-Fyvie *et al.*, 2000). Jedoch wurde beschrieben, dass *Abiotrophia adiacens* in der Mundhöhle von gesunden Individuen vorkommt (Sato *et al.*, 1999). *Gemella haemolysans* und *Campylobacter rectus* waren in Klonbanken von einer gesunden Person mit nur leichter Gingivitis vorhanden (Kroes *et al.*, 1999). Manche Spezies wie *Porphyromonas endodontalis* oder PUS9.170 wurden initial nicht bei der Parodontitis, sondern anderen Erkrankungen der Mundhöhle gefunden (Sundqvist, 1992; Wade *et al.*, 1997). Basierend auf der Zahl der Parodontitispatienten und der gesunden Individuen, welche von den putativen Pathogenen besiedelt sind, die Paster *et al.* (2001) vorgeschlagenen hatten, müsste man also annehmen, dass folgende Bakterien, welche in dieser Studie gefunden wurde, mit der Parodontitis und nicht mit parodontaler Gesundheit assoziiert sind: *Treponema socranskii subsp. buccale*, *Filifactor alocis*, *Dialister pneumosintes*, *Porphyromonas gingivalis* und *Porphyromonas endodontalis*.

Die von Paster *et al.* (2001) untersuchten Proben wurden nachfolgend mittels 39 spezies-spezifischen Primern erneut untersucht. Das Ergebnis wurde von Kumar *et al.* (2003) veröffentlicht. Alle untersuchten 39 Spezies bzw. Phylotypen, darunter die von Paster *et al.* (2001) postulierten 20 Pathogene, konnten in den Proben der parodontal gesunden wie auch der erkrankten Personen nachgewiesen werden. Es zeigten sich jedoch unterschiedliche Zahlenverhältnisse. Beispielsweise

wurde *Fusobacterium nucleatum* fast bei jeder Person nachgewiesen, ob erkrankt oder gesund; *T. denticola* jedoch bei 63 % der erkrankten und nur 17 % der gesunden Personen. Aufgrund der Verteilung interpretierte Kumar *et al.* (2003) die Pathogenität wie folgt: Für parodontale Erkrankung sprechen die Spezies bzw. Phylotypen D084, BH017 (*Deferribacteres*), AU126 (*Bacteroidetes*), *Megasphaera* BB166, X112 (*OP11*) und I025 (*TM7*), *Eubacterium saphenum*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella denticola* und *Cryptobacterium curtum*. Für parodontale Gesundheit sprechen W090 (*Deferribacteres*), BU063 (*Bacteroidetes*), *Atopobium rimae* und *Atopobium parvulum*.

4.3 Schlussfolgerung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit, eine möglichst vollständige, kulturunabhängige Identifikation und Genotypisierung parodontaler Mikroflora der fortgeschrittenen Parodontitis eines einheitlichen Patientenkollektivs zu erstellen, ist erreicht worden. In der vorliegenden, kulturunabhängigen Untersuchung des parodontalen Biofilms eines großen Kollektivs erkrankter und gesunder Personen wurde eine Datenbank mit einer ausgezeichneten Diversität erstellt und neue Phylotypen nachgewiesen. Gerade in der Interpretation putativer Pathogene in der Parodontitis kommt diese Untersuchung zu einer von bisherigen Untersuchungen abweichenden Einschätzung. Die hier zusammengefaßten Daten haben das Verständnis der Komposition der parodontalen Flora bei der Parodontitis erweitert. Um die Biologie neuer Phylotypen zu verstehen, ist eine direkte Beobachtung der Pathogene am Ort der Erkrankung erforderlich. Dazu geeignet erscheinen spezies-spezifische Sonden zur *in-situ* Hybridisierung. Derartige Sonden könnten aus der zusammengetragenen Datenbank entwickelt, an dem bisher gewonnenen Material überprüft und z.B. in Modellen wie von Kolenbrander, P.E. (2000) oder Moter *et al.* (1998) entwickelt eingesetzt werden.

5 Anhang

Literaturverzeichnis

- [1] 1999 International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, October 30-November 2, 1999. (1999). *Ann Periodontol* ; 4:i, 1-112.
- [2] Armitage, G.C.(1999). Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Annals of Periodontology* 4: 1-6
- [3] American Academy of Periodontology, Guidelines for Periodontal Therapy, Reference Manual 2003-2004 Endorsements p. 123-127
- [4] Amann, R.I., W. Ludwig und K. H. Schleifer.(1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-169.
- [5] Albandar, J. M., Brown, L. J. & Loe, H. (1997). Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. *J Periodontol* 68, 973–981.
- [6] Ausubel, F.M., Brent, R. und Kingstone, R.E. (1994). *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Interscience, New York.
- [7] Baskaran, N., Kandpal, R.P., Bhargava, A.K., Glynn, M.W., Bale, A. and Weissman, S.M. (1996) Uniform amplification of a mixture of deoxyribonucleic acids with varying GC content. *Genome Res.* 6, 633-638.
- [8] Chandler, D.P., Fredrickson, J.K. & Brockman, F.J. (1997). Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries. *Mol Ecol* 6, 475-482.
- [9] Choi, B.K., Paster, B.J., Dewhirst, F.E., Goebel, U.B. (1994). Diversity of cultivable and uncultivable oral spirochetes from a patient with severe destructive periodontitis. *Infect Immun* 62, 1889-1895.
- [10] Cilia, V., Lafay B., Christen R. (1996). Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. *Mol. Biol. Evol.* 13(3):451-461.
- [11] Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M. und Margulies, D.H. (1994). *Current Protocols in Immunology*. Wiley Interscience, New York.
- [12] Contreras, A., Doan, N., Chen, C., Rusitanonta, T., Flynn, M. & Sløts, J. (2000). Importance of *Dialister pneumosintes* in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 15, 269–272.

- [13] Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284 (5418):1318-22.
- [14] Davies, J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 264:375–382
- [15] D. DeBeer, P. Stoodley, Z. Lewandowski, *Biotech. Bioeng.* 44, 636 (1994)
- [16] Devine, J. H., C. Countryman, T. O. Baldwin (1988). Nucleotide sequence of the luxR and luxI genes and structure of the primary regulatory region of the lux regulon of *Vibrio fischeri* ATCC 7744. *J. Biochem.* 27:837–842
- [17] Dewhirst, F.E., Tamer, M.A., Ericson, R.E., Lau, C.N., Levanos, V.A., Boches, S.K., Galvin, J.L. & Paster, B.J. (2000). The diversity of periodontal spirochetes by 16S rRNA analysis. *Oral Microbiol Immunol* 15, 196-202.
- [18] Dymock, D., Weightman, A., Scully, C. & Wade, W. (1996). Molecular analysis of microflora associated with dentoalveolar abscesses. *J Clin Microbiol* 34, 537-542.
- [19] Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD.(1988). The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 15(5):316-23.
- [20] Efron, B. (1979). Bootstrap methods: Another look at the jackknife. *The Annals of Statistics*, 7:1-26
- [21] Farrelly, V., Rainey, F.A. & Stackebrandt, E. (1995). Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl Environ Microbiol* 61, 2798-2801.
- [22] Flemmig, T.F.(1999). Periodontitis.*Ann. Periodontol.* 4(1):32-8. Review.
- [23] Frias, J., Olle, E., Alsina, Merce. (2001). Periodontal pathogens produce Quorum sensing signal molecules. *Infection and Immunity.* 69(5): 3431-3434.
- [24] Fitch, W. (1971). Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific treetopology. *Syst. Zool.* 20:406-416.
- [25] Garrity, G.M., Winters, M. & Searles, D.B. (2001) Taxonomic outline of the procaryotic genera. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer-Verlag, New York, pp.1-39.

- [26] Giovannoni, S.J., Mullins, T.D. & Field, K.G. (1995) Microbial diversity in oceanic systems: rRNA approaches to the study of unculturable microbes. In: Molecular ecology of aquatic microbes. Ed: Joint, I., Springer-Verlag, Berlin, pp.217-248.
- [27] Good, I. J. (1953). The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40:237–264.
- [28] Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. In: DNA cloning Volume I-A practical approach. Ed: Glover DM, IRL Press.
- [29] Harmsen D., Rothgänger J., Singer C., Albert J., & Frosch M. (1999). Intuitive hypertext-based molecular identification of micro-organisms. *Lancet* 353: 291
- [30] Harper Owen, R., Dymock, D., Booth, V., Weightman, A. & Wade, W. (1999). Detection of unculturable bacteria in periodontal health and disease by PCR. *J Clin Microbiol* 37, 1469-1473.
- [31] Holden, MT, Ram Chhabra, S, de Nys, R, Stead, R, Bainton, NJ, Hill, PJ, Manefield, M, Kumar, N, Labatte, M, England, D, Rice, S, Givskov, M, Salmond GP, Stewart, GS, Bycroft BW, Kjelleberg, S and Williams, P (1999) Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 33(6): 1254-66
- [32] Hugenholtz, P., Goebel, B.M. & Pace, N.R. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* 180, 4765-4774.
- [33] Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hershberger, K.L. & Pace, N.R. (1998). Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J Bacteriol* 180, 366-376.
- [34] Hugenholtz, P., Tyson, G.W., Webb, R.I., Wagner, A.M. & Blackall, L.L. (2001) Investigation of Candidate Division TM7, a Recently Recognized Major Lineage of the Domain Bacteria with No Known Pure-Culture Representatives. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 411-419.
- [35] Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore LVH. (1989). Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas sputigena* with strains from 11 genera of oral bacteria. *Infect. Immun.* 57:3194–203
- [36] Kolenbrander, P. E. (2000). Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:413–437.
- [37] Kopczynski, E.D., Bateson, M.M. & Ward, D.M. (1994). Recognition of chimeric small-subunit ribosomal DNAs composed of genes from uncultivated microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 60, 746-748.

- [38] Kroes, I., Lepp, P. & Relman, D. (1999). Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 14547-14552.
- [39] Kumar, P.S., Griffen, A.L., Barton, J.A., Paster, B.J., Moeschberger, M.L., Leys, E.J. (2003). New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res* 82(5):338-344.
- [40] Lamont RJ, Oda D, Persson RE, Persson GR (1992). Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with gingival epithelial cells maintained in culture. *Oral Microbiol. Immunol.* 7:364–67
- [41] Lane, D., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., Pace, N.R. (1985): Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 6955-6959.
- [42] Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Ed: Stackebrandt, E. & Goodfellow, M. John Wiley and Sons, Chichester, pp.115-175.
- [43] Larsen, N., Olsen, G.J., Maidak, B.L., McCaughey, M.J., Overbeek, R., Macke, T.J., Marsh, T.L., Woese, C.R. (1993). The ribosomal database project. *Nucleic Acids Res.* 1;21(13):3021-3.
- [44] Leser, T.D., Amenuvor, J.Z., Jensen, T.K., Lindecrona, R.H., Boye, M. & Moller, K. (2002). Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl Environ Microbiol* 68, 673-690.
- [45] Liesack, W., H. Weyland, and E. Stackebrandt. 1991. Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed culture of strict barophilic bacteria. *Microb. Ecol.* 21:191–198.
- [46] Ludwig, W. & Klenk, H.-P. (2001). Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, *The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria*, pp 49–65. Edited by D. R. Boone and R. W. Castenholz. Berlin: Springer.
- [47] Lundberg, K.S., Shoemaker, D.D., Adams, M.W.W., Short, J.M., Sorge, J.A., Mathur, E.J. (1991). High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 108, 1-6.
- [48] Macuch, P.J. & Tanner, A.C. (2000). *Campylobacter* species in health, gingivitis, and periodontitis. *J Dent Res* 79, 785-792.
- [49] Manefield, M., de Nys, R., Kumar, N., Read, R., Givskov, M., Steinberg, P.D. & Kjelleberg, S. (1999). Inhibition of LuxR-based AHL regulation by halogenated furanones from *Delisea pulchra*. *Microbiology* 145, 283–291.

- [50] Maidak, B. L., G. J. Olsen, N. Larsen, R. Overbeek, M. J. McCaughey, C. R. Woese. (1996). The ribosomal database project (RDP). *Nucl. Acids Res.* 24:82-85.
- [51] Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., Dymock, D. & Wade, W.G. (1998). Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 64, 795-799.
- [52] Moore, W.E. & Moore, L.V. (1994). The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 5, 566-577.
- [53] Moter A, Hoenig C, Choi B-K, Riep B, Göbel UB. (1998). Molecular epidemiology of oral treponemes associated with periodontal disease. *J. Clin. Microbiol.* 36:1399–403
- [54] Nørskov-Lauritsen, N., Mogens Kilian, M. (2006). Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., ... *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 2135–2146
- [55] Page RC, Schroeder HE. (1977). Structure and pathogenesis. In: Schluger S, Yuodelis RA, Page RC, eds. *Periodontal disease*. Philadelphia, USA: Lea & Febiger, 1st ed., pp. 168-195.
- [56] Paster, B.J., Boches, S.K., Galvin, J.L., Ericson, R.E., Lau, C.N., Levanos, V.A., Sahasrabudhe, A. & Dewhirst, F.E. (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 183, 3770-3783.
- [57] Reysenbach, A.L., Giver, L.J., Wickham, G.S. & Pace, N.R. (1992). Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 58, 3417-3418.
- [58] Ralph, D. and McClelland, M. (1994) Phylogenetic evidence for horizontal transfer of an intervening sequence between species in a spirochete genus. *J. Bacteriol.* 176, 5982-5987.
- [59] Rolph, H.J., Lennon, A., Riggio, M.P., Saunders, W.P., MacKenzie, D., Coldero, L. & Bagg, J. (2001). Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *J Clin Microbiol* 39, 3282-3289.
- [60] Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Ehrlich (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487–491
- [61] Sakamoto, M., Umeda, M., Ishikawa, I. & Benno, Y. (2000). Comparison of the oral bacterial flora in saliva from a healthy subject and two periodontitis patients by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *Microbiol Immunol* 44, 643-652.

- [62] Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- [63] Sanger, F., Nicklen, S. und Colson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 74: 5463-5467.
- [64] Shapiro, J. A. (1988). Bacteria as multicellular organisms. *Sci. Am.* 256:82–89.
- [65] Shuldiner, A.R., Nirula, A. & Roth, J. (1989). Hybrid DNA artifact from PCR of closely related target sequences. *Nucleic Acids Res* 17, 4409.
- [66] Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent Jr., R. L. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology* 25, 134–144.
- [67] Socransky, S.S., Smith, C., Martin, L., Paster, B.J., Dewhirst, F.E. & Levin, A.E. (1994). „Checkerboard“ DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 17, 788-792.
- [68] Spratt, D.A., Weightman, A.J. & Wade, W.G. (1999). Diversity of oral asaccharolytic Eubacterium species in periodontitis-identification of novel phylotypes representing uncultivated taxa. *Oral Microbiol Immunol* 14, 56-59.
- [69] Staley, J.T., Konopka, A. (1985), *Ann. Rev. Microbiol.* 39:321-346);
- [70] Strunk, O. und W. Ludwig. [Online]. ARB: a software environment for sequence data. [<http://www.biol.chemie.tu-muenchen.de/pub/ARB/>]. Technische Universität München.
- [71] Suzuki, M.T. & Giovannoni, S.J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol* 62, 625-630.
- [72] Swift S, Throup JP, Williams P, George PC, Salmond PC, Stewart GSAB (1996) Quorum sensing: a population-density component in the determination of bacterial phenotype. *Trends Biochem Sci* 21:214-219
- [73] Tanner, A., Maiden, M., Paster, B. & Dewhirst, F. (1994). The impact of 16S ribosomal RNA-based phylogeny on the taxonomy of oral bacteria. *Periodontol* 2000 5, 26-51.
- [74] Valenza, G., Burgemeister, S., Girschick, H., Schoen, C., Veihelmann, S., Moter, A., Haban, V., Vogel, U., Schlagenhauf, U. (2006). Analysis of the periodontal microbiota in Childhood-Type Hypophosphatasia. *Int. J. Med. Microbiol.* 296: 493-500
- [75] von Wintzingerode, F., U. B. Göbel und E. Stackebrandt. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 21:213-229

- [76] Wade, W.G., Spratt, D.A., Dymock, D. & Weightman, A. (1997). Molecular detection of novel anaerobic species in dentoalveolar abscesses. *Clin Infect Dis* 25 (Suppl 2), S235-S236.
- [77] Ward, D.M., Weller, R. & Bateson, M.M. (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* 345, 63-65.
- [78] Wecke, J., Kersten, T., Madela, K., Moter, A., Göbel, U., Friedmann, A., Bernimoulin, J.-P. (2000). A novel technique for monitoring the development of bacterial biofilm in human periodontal pockets. *FEMS Microbiology Letters*;191: 95-101.
- [79] Wilson, K.H., Blitchington, R.B. (1996). Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2273-2278.
- [80] Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-71.
- [81] World Workshop in Periodontics 1996. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. Consensus report. (1996). *Ann Periodontol*;1:926-932.
- [82] Ximenez-Fyvie, L., Haffajee, A. & Socransky, S. (2000). Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 27, 722-732.
- [83] Zhu, X. Y., Zhong, T., Pandya, Y. & Joerger, R. D. (2002). 16S rRNA based analysis of microbiota from the cecum of broiler chicken. *Appl Environ Microbiol* 68, 124-137.

Abkürzungen

aa	anaerob
amp	Ampicillinresistenz
Aqua bidest.	Wasser doppelt destilliert
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Best.	Bestellnummer
BHI	brain heart infusion
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLASTN	BLAST : nucleotides query vs. nucleotide database
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
c	Zenti (10^{-1})
Da	Dalton
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfonamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: Desoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat; Aquimolare Mischung der vier Desoxynukleotidbausteine (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DSM(Z)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen u. Zellkulturen, Braunschweig
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	et alii (= und andere)
EtOH	Ethanol
FCS	fetal calf serum
g	Gramm, Fallbeschleunigung
h	Stunde(n)
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalactopyranosid
IS	Interner Standard
IU	internationale Einheiten
k. A.	keine Angabe
kb	Kilobasen
kDa	kilo-Dalton, Einheit für die molare Masse von Proteinen
Km	Kanamycin
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
Lsg.	Lösung
m	Meter, Milli (10^{-4})
M	Molarität
mA	Milliampere
MCS	multiple cloning site
MG	Molekulargewicht

mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	N-Morpholino-3-Propansulfon-Säure
mRNA	messenger RNA
mw	molecular weight
n.d.	nicht detektierbar
Na ₂ -EDTA	Dinatrium-Ethylendiamintetra-azetat
NC - IUB	Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry
nt	Nukleotide
OD _{xxx}	Optische Dichte („optical density“) bei xxx nm Wellenlänge
OPD	Oligonucleotide Probe Database
ori	Replikationsursprung
PAA	Polyacrylamid
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
r	ribosomal
rDNA	für rRNA kodierende Desoxyribonukleinsäure
RDP	Ribosomal RNA Database Project
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sp.	Spezies (Einzahl)
spp.	Spezies (Mehrzahl)
SSC	standard saline citrate
SSCA, ssDNA	SSCP „Single-stranded conformation analysis, -polymorphism“ einzelsträngige (single-stranded) DNA
ssu / ss	small subunit
t	Zeit [s]
T	Temperatur [°C bzw. K]
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
Tet	Tetracyclin
Th	temperature of hybridization
TM	Schmelztemperatur („temperature of melting“)

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
U	units
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
V	Elutionsvolumen des Analyten [ml] e
v/v	Volumen pro Volumen
VBNC	viable but nonculturable
verd.	verdünnt
Vol.	Volumen(-anteile)
VT	Volumenteile
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5'-Brom-4-chlor-3-indolyl--D-galaktosid

Die Klonbanken der Parodontitispatienten

In den folgenden Tabellen 5-1 und 5-2 (für Primerpaar 27f/519r bzw. 515f/1525r) sind die in dieser Arbeit gefundenen Sequenzen der Erkrankten zusammengefasst, sortiert nach Spezies. Die Identifikation erfolgte mittels Abgleich bekannter Sequenzen. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: *Pat.* = Nummer des Patienten; *Klon* = Nummer des Klons des jeweiligen Patienten; *bp n* = Länge der Sequenz in Basenpaaren; *Accession no.* = *Genbank* Eingabenummer der Sequenz, mit welcher der gefundene Klon am ähnlichsten ist bzw. *GenBank* Eingabenummer einer in dieser Arbeit neu entdeckten Sequenz; *Id n-%* = Grad der Sequenzübereinstimmung des gefundenen Klons, absolut und relativ. Wenn bekannt, wurde die Zuordnung der Sequenz in Phylum, Klasse, Ordnung, Familie und Genus angegeben; andernfalls ist ein Fragezeichen eingefügt. Alle zuzuordnenden Sequenzen gehören zur Domäne *Bacteria*, ersichtlich aus dem vorgestellten „B“ unter *Phylum*. Sequenzen folgender *Phyla* konnten nachgewiesen werden (aufsteigend): BIX = *Deferribacteres phy. nov.*, BXII = *Proteobacteria phy. nov.*, BXIII = *Firmicutes*, BXIV = *Actinobacteria phy. nov.*, BXXVII = *Spirochaetes phy. nov.*, BXX = *Bacteroidetes phy. nov.*, BXXI = *Fusobacteria phy. nov.*, BXXII = *Verrucomicrobia phy. nov.*. Dies sind sieben der insgesamt 23 *Phyla*. Die neuartigen Sequenzen, welche aus dieser Studie hervorgingen, wurden in roter Schrift dargestellt.

Tabelle 5-1. Klone des Primerpaars 27f/519r

<i>Pat.</i>	<i>Klon</i>	<i>bp n</i>	<i>Spezies</i>	<i>Accession no</i>	<i>Id n - %</i>	<i>Phylum</i>	<i>Klasse</i>	<i>Ordnung</i>	<i>Familie</i>	<i>Genus</i>
10	6	453	10B6 - <i>Holosporaceae</i>	AJ428412	453/453	BXII	Alpha	Rickettsiales	Holosporaceae	Holosporaceae
24	14	444	A11	AF052412	275/303 - 90%	?	?	?	?	?
3	14	283	<i>Actinomyces israelii</i>	X82450	257/259 - 99%	BXIV	Actinobacteria	Actinomycetales	Actinomycetaceae	Actinomyces
2	10	350	<i>Tannerella forsythensis</i>	AB053947	348/348 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides
3	35	364	<i>Tannerella forsythensis</i>	AB035460	360/365 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides
5	4	321	<i>Tannerella forsythensis</i>	AB035460	318/322 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides
5	10	324	<i>Tannerella forsythensis</i>	AB035460	318/322 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides
8	2	419	<i>Tannerella forsythensis</i>	AB053947	348/351 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides
12	5	373	<i>Tannerella forsythensis</i>	AB035460	368/372 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides
12	9	529	<i>Tannerella forsythensis</i>	AB053947	484/495 - 97%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides
12	12	362	<i>Tannerella forsythensis</i>	AB035460	357/361 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides
21	1	377	<i>Tannerella forsythensis</i>	AB053947	377/377 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides

21	6	380	Tannerella forsythensis	AB053947	377/377 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides
22	10	438	Tannerella forsythensis	AB053947	436/436 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides
24	12	400	Tannerella forsythensis	AB053947	381/385 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides
30	13	402	Tannerella forsythensis	AB053947	392/399 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides
8	11	471	Bacteroides like sp. AU126	AY005072	469/471 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides
8	30	488	Bacteroides like sp. AU126	AY005072	420/426 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides
11	14	466	Bacteroides like sp. AU126	AY005072	460/464 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides
11	18	481	Bacteroides like sp. AU126	AY005072	471/477 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides
14	1	522	Bacteroides like sp. AU126	AY005072	490/490 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides
25	7	451	Bacteroides like sp. AU126	AY005072	445/449 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides
3	1	370	Bacteroides-like sp. AU126	AY005072	361/371 - 97%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides
5	5	325	Bacteroides-like sp. AU126	AY005072	316/322 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides
3	5	456	Bacteroidetes	AJ289174	311/329 - 94%	BXX	Bacteroidetes	?	?	?
13	3	360	Campylobacter concisus	L04322	356/361 - 98%	BXII	Epsilon	Campylobacterales	Campylobacteraceae	Campylobacter
11	15	467	Campylobacter gracilis	L37787	463/464 - 99%	BXII	Epsilon	Campylobacterales	Campylobacteraceae	Campylobacter
5	2	322	Campylobacter sp. AP60-47	AB028400	320/321 - 99%	BXII	Epsilon	Campylobacterales	Campylobacteraceae	Campylobacter
6	11	351	Campylobacter sp. AP60-47	AB028400	345/351 - 98%	BXII	Epsilon	Campylobacterales	Campylobacteraceae	Campylobacter
6	14	383	Campylobacter sp. AP60-47	AB028400	377/383 - 98%	BXII	Epsilon	Campylobacterales	Campylobacteraceae	Campylobacter
9	11	533	Campylobacter sp. AP60-47	L04317	462/473 - 97%	BXII	Epsilon	Campylobacterales	Campylobacteraceae	Campylobacter
20	3	385	Campylobacter sp. AP60-47	AB028400	376/385 - 97%	BXII	Epsilon	Campylobacterales	Campylobacteraceae	Campylobacter
23	1	359	Campylobacter sp. AP60-47	AB028400	356/358 - 99%	BXII	Epsilon	Campylobacterales	Campylobacteraceae	Campylobacter
1	37	306	Capnocytophaga sp.	AY005075	305/305 - 100%	BXX	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Capnocytophaga
15	1	360	Capnocytophaga sp.	U41352	351/357 - 98%	BXX	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Capnocytophaga
15	3	360	Capnocytophaga sp.	U41352	351/357 - 98%	BXX	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Capnocytophaga
15	7	522	Capnocytophaga sp.	U41352	459/475 - 96%	BXX	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Capnocytophaga
21	2	380	Capnocytophaga sp.	AY005076	375/380 - 98%	BXX	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Capnocytophaga
15	11	526	Capnocytophaga sputigena	AF133536	492/496 - 99%	BXX	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Capnocytophaga
3	23	334	Capnocytophaga sputigena	AF133536	319/321 - 99%	BXX	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Capnocytophaga
11	17	478	Catonella morbi	X87151	474/480 - 98%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Catonella
10	11	470	Catonella sp.	AF385577	387/430 - 90%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Catonella
11	11	461	Desulfobulbus sp. R004	AY005037	455/462 - 98%	BXII	Delta	Desulfobacteriales	Desulfobaccaceae	Desulfobulbus

29	8	393	Desulfomicrobium oralis NY676	AJ251628	391/391 - 100%	BXII	Delta	Desulfovibrionales	Desulfomicrobiaceae	Desulfomicrobium
11	7	456	Dialister pneumosintes	X82500	444/449 - 98%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Catonella
26	2	462	Dialister sp. BS095	AF287787	458/461 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Dialister
7	4	376	Eikenella	AB028408	375/377 - 99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Eikenella
7	13	383	Eikenella	AB028408	382/383 - 99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Eikenella
7	14	409	Eikenella	AB028408	408/409 - 99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Eikenella
7	19	360	Eikenella	X74893	339/342 - 99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Eikenella
7	21	489	Eikenella	AB028408	327/328 - 99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Eikenella
10	1	412	Eikenella	AB028408	409/410 - 99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Eikenella
10	5	449	Eikenella	AJ247257	421/423 - 99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Eikenella
10	13	465	Eikenella	AB028353	454/457 - 99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Eikenella
10	17	463	Eikenella	AB028353	449/450 - 99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Eikenella
13	8	452	Eikenella	AB028405	449/452 - 99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Eikenella
24	1	418	Eikenella corrodens	M22515	411/414 - 99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Eikenella
26	1	470	Eikenella corrodens	M22515	462/468 - 98%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Eikenella
25	5	424	Enterobacter agglomerans	AF130934	422/422 - 100%	BXII	Gamma	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Enterobacter
25	10	411	Enterobacter sp.	AF348161	400/409 - 97%	BXII	Gamma	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Enterobacter
2	2	351	Eubacterium nodatum	U13041	328/342 - 95%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
2	4	349	Eubacterium nodatum	U13041	340/350 - 97%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
2	5	349	Eubacterium nodatum	U13041	340/350 - 97%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
2	11	351	Eubacterium nodatum	U13041	343/352 - 97%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
2	15	362	Eubacterium nodatum	U13041	352/363 - 96%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
10	8	463	Eubacterium saphenum	U65987	406/414 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
3	10	360	Eubacterium sp.	AF287764	358/360 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
3	19	349	Filifactor alocis	AJ006962	344/349 - 98%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
6	10	453	Filifactor alocis	AJ006962	447/449 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
8	35	476	Filifactor alocis	AJ006962	476/478 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
8	37	476	Filifactor alocis	AJ006962	475/476 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
9	3	529	Filifactor alocis	AJ006962	499/500 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
9	7	533	Filifactor alocis	AJ006962	499/500 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
10	9	459	Filifactor alocis	AJ006962	451/456 - 98%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium

10	14	463	Filifactor alocis	AJ006962	456/460 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
12	13	363	Filifactor alocis	FAL6962	358/361 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
1	5	349	Flexistipes-like sp.	AY005447	332/341 - 97%	BIX	Deferribacteres	Deferribacterales	Deferribacteraceae	?
3	12	352	Flexistipes-like sp.	AY005447	350/352 - 99%	BIX	Deferribacteres	Deferribacterales	Deferribacteraceae	?
5	7	317	Flexistipes-like sp.	AY005447	313/314 - 99%	BIX	Deferribacteres	Deferribacterales	Deferribacteraceae	?
23	8	378	Flexistipes-like sp.	AY005447	357/357 - 100%	BIX	Deferribacteres	Deferribacterales	Deferribacteraceae	?
28	8	443	Flexistipes-like sp.	AY005444	432/435 - 99%	BIX	Deferribacteres	Deferribacterales	Deferribacteraceae	?
28	10	442	Flexistipes-like sp.	AY005444	430/432 - 99%	BIX	Deferribacteres	Deferribacterales	Deferribacteraceae	?
16	10	293	Fusobacterium naviforme	AJ006965	278/282 - 98%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
23	14	388	Fusobacterium naviforme	AJ006965	379/384 - 98%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
22	4	426	Fusobacterium naviforme	AJ006965	419/420 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
5	8	326	Fusobacterium nucleatum	AF287812	316/323 - 97%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
5	16	323	Fusobacterium nucleatum	AJ133496	318/320 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
5	17	323	Fusobacterium nucleatum	AJ133496	319/320 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
8	36	480	Fusobacterium nucleatum	AJ133496	340/346 - 98%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
10	2	422	Fusobacterium nucleatum	AJ133496	417/420 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
11	3	463	Fusobacterium nucleatum	AJ006964	454/460 - 98%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
11	6	459	Fusobacterium nucleatum	AJ006964	453/460 - 98%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
13	7	413	Fusobacterium nucleatum	AJ133496	410/414 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
20	6	387	Fusobacterium nucleatum	AJ006964	385/387 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
22	7	464	Fusobacterium nucleatum	AJ133496	457/459 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
22	21	372	Fusobacterium nucleatum	AJ133496	362/368 - 98%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
23	3	389	Fusobacterium nucleatum	AJ006964	382/387 - 98%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
26	5	473	Fusobacterium nucleatum	AJ006964	467/470 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
26	10	499	Fusobacterium nucleatum	AJ006964	475/477 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
26	11	507	Fusobacterium nucleatum	AJ006964	479/484 - 98%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
26	12	484	Fusobacterium nucleatum	AJ006964	474/479 - 98%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
28	1	445	Fusobacterium nucleatum	AJ006964	439/442 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
3	4	352	Fusobacterium sp.	AF287806	351/353 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
6	3	386	Fusobacterium sp.	AF287806	383/386 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
7	8	416	Fusobacterium sp.	AF287815	408/415 - 98%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium

7	15	417	Fusobacterium sp.	AF287806	414/415 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
9	6	534	Fusobacterium sp.	AF287815	477/485 - 98%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
11	5	463	Fusobacterium sp.	AF287815	454/461 - 98%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
11	8	456	Fusobacterium sp.	AF287806	454/457 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
14	8	522	Fusobacterium sp.	AF287806	452/457 - 98%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
15	6	528	Fusobacterium sp.	AF287815	479/485 - 98%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
16	9	338	Fusobacterium sp.	AF287805	332/339 - 97%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
22	8	440	Fusobacterium sp.	AF287805	433/439 - 98%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
24	7	390	Fusobacterium sp.	AF287815	383/391 - 97%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
24	11	393	Fusobacterium sp.	AF287815	384/390 - 98%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
25	20	468	Fusobacterium sp.	AF287806	454/467 - 97%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
27	3	536	Fusobacterium sp.	AF287815	474/482 - 98%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
27	11	449	Fusobacterium sp.	AF287815	441/448 - 98%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
27	12	443	Fusobacterium sp.	AF287815	435/442 - 98%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
27	13	440	Fusobacterium sp.	AF287809	435/438 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
27	14	440	Fusobacterium sp.	AF287815	431/437 - 98%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
27	16	441	Fusobacterium sp.	AF287809	436/438 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
28	4	312	Fusobacterium sp.	AF287806	307/309 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
30	14	402	Fusobacterium sp.	AF287815	394/399 - 98%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
7	16	425	Gemella morbillorum	L14327	412/420 - 98%	BXXI	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	Gemella
15	10	529	Haemophilus aphrophilus	M75041	495/504 - 98%	BXII	Gamma	Pasteurellales	Pasteurellaceae	Haemophilus
7	6	389	Haemophilus parainfluenzae	AJ290757	388/389 - 99%	BXII	Gamma	Pasteurellales	Pasteurellaceae	Haemophilus
15	5	360	Haemophilus parainfluenzae	AJ290757	354/358 - 99%	BXII	Gamma	Pasteurellales	Pasteurellaceae	Haemophilus
8	31	360	Haemophilus segnis	AF224299	359/361 - 99%	BXII	Gamma	Pasteurellales	Pasteurellaceae	Haemophilus
15	9	529	Lautropia sp.	AY005030	499/502 - 99%	BXII	Beta	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Lautropia
13	12	378	Leptotrichia sp.	AF287813	366/375 - 97%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Leptotrichia
15	2	535	Leptotrichia sp.	AY029807	479/481 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Leptotrichia
25	9	412	Leptotrichia sp.	AY029803	406/412 - 98%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Leptotrichia
30	15	382	Leptotrichia sp.	AY029802	367/376 - 98%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Leptotrichia
8	34	360	Mycoplasma faucium	AF125590	354/356 - 99%	BXIII	Mollicutes	Mycoplasmatales	Mycoplasmataceae	Mycoplasma
8	38	360	Mycoplasma faucium	AF125590	355/357 - 99%	BXIII	Mollicutes	Mycoplasmatales	Mycoplasmataceae	Mycoplasma

29	14	382	Mycoplasma faucium	AF125590	371/375 - 98%	BXIII	Mollicutes	Mycoplasmatales	Mycoplasmataceae	Mycoplasma
13	18	423	Neisseria - AP60-58	AB028409	413/422 - 97%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria
3	3	357	Neisseria RP55-32	AB028437	356/357 - 99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria
27	10	462	Neisseria RP55-32	AB028437	456/460 - 99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria
21	4	469	<i>P. productus</i>	X94966	340/378 - 89%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Catonella
23	15	360	Peptococcus-like sp.	AF287780	351/361 - 97%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Peptococcaceae	Peptococcus
10	12	360	Peptostreptococcus	AF385543	357/359 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Peptostreptococcus
22	12	445	Peptostreptococcus	AF287767	435/444 - 97%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Peptostreptococcus
3	19	353	Porphyromonas -AP60-10	AB028369	351/351 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
10	3	433	Porphyromonas -AP60-10	AY005067	427/428 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
10	4	439	Porphyromonas -AP60-10	L16491	431/435 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
23	2	410	Porphyromonas -AP60-10	AB028369	405/407 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
23	5	402	Porphyromonas -AP60-10	AB028369	397/399 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
24	4	393	Porphyromonas -AP60-10	AB028369	389/391 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
3	9	479	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	L16490	442/476 - 92%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
22	13	423	Porphyromonas AW032	AF393476	417/420 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
1	6	353	Porphyromonas gingivalis	AB035458	352/353 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
1	10	330	Porphyromonas gingivalis	AB035458	329/329 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
1	11	333	Porphyromonas gingivalis	AB035458	332/333 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
1	12	293	Porphyromonas gingivalis	AB035458	293/294 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
1	28	349	Porphyromonas gingivalis	AF 285870	348/349 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
1	29	350	Porphyromonas gingivalis	AF285870	350/350 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
1	30	350	Porphyromonas gingivalis	AF 285870	349/350 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
1	31	348	Porphyromonas gingivalis	AF 285870	346/349 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
1	33	374	Porphyromonas gingivalis	X73964	369/374 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
1	35	332	Porphyromonas gingivalis	AF285870	316/316 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
1	36	331	Porphyromonas gingivalis	X73964	331/331 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
1	40	351	Porphyromonas gingivalis	AF285870	351/351 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
2	1	371	Porphyromonas gingivalis	AB035458	370/371 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
2	9	348	Porphyromonas gingivalis	AB035458	348/348 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
2	10	350	Porphyromonas gingivalis	AB035458	350/350 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas

2	11	350	Porphyromonas gingivalis	X73964	348/348 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
2	17	370	Porphyromonas gingivalis	AB035458	369/370 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
2	26	314	Porphyromonas gingivalis	X73964	314/314 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
2	28	361	Porphyromonas gingivalis	X73964	360/361 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
2	31	372	Porphyromonas gingivalis	X73964	371/371 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
2	35	320	Porphyromonas gingivalis	X73964	320/320 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
2	36	353	Porphyromonas gingivalis	X73964	351/353 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
2	37	352	Porphyromonas gingivalis	X73964	352/352 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
2	40	359	Porphyromonas gingivalis	X73964	356/357 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
5	12	328	Porphyromonas gingivalis	AB035458	326/326 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
5	14	327	Porphyromonas gingivalis	AB035458	324/326 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
5	15	329	Porphyromonas gingivalis	AB035458	326/326 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
5	18	326	Porphyromonas gingivalis	AB035458	326/326 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
5	19	328	Porphyromonas gingivalis	AB035458	326/326 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
6	2	443	Porphyromonas gingivalis	AB035458	411/416 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
6	15	303	Porphyromonas gingivalis	X73964	303/303 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
7	7	331	Porphyromonas gingivalis	AB035458	331/331 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
9	2	528	Porphyromonas gingivalis	AB035456	505/509 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
9	8	505	Porphyromonas gingivalis	AB035456	388/388 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
12	1	423	Porphyromonas gingivalis	AB035457	344/345 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
12	11	391	Porphyromonas gingivalis	AB035457	391/391 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
13	2	369	Porphyromonas gingivalis	X73964	363/365 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
13	16	487	Porphyromonas gingivalis	AB035458	486/490 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
14	2	528	Porphyromonas gingivalis	AB035456	494/498 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
14	6	360	Porphyromonas gingivalis	AF414818	352/355 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
14	11	525	Porphyromonas gingivalis	AB035456	504/506 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
16	3	364	Porphyromonas gingivalis	AB035458	363/364 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
16	6	371	Porphyromonas gingivalis	AB035458	370/371 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
16	13	369	Porphyromonas gingivalis	AB035458	368/369 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
20	5	382	Porphyromonas gingivalis	AB035458	381/382 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
20	10	380	Porphyromonas gingivalis	AB035458	379/381 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas

20	11	335	Porphyromonas gingivalis	AB035458	331/334 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
21	5	360	Porphyromonas gingivalis	AB035458	358/359 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
21	9	441	Porphyromonas gingivalis	AF287987	439/441 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
22	6	443	Porphyromonas gingivalis	AB035456	435/436 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
22	11	439	Porphyromonas gingivalis	AB035458	433/437 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
22	27	387	Porphyromonas gingivalis	AB035458	381/384 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
25	19	425	Porphyromonas gingivalis	AB035458	417/422 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
28	5	440	Porphyromonas gingivalis	AB035458	435/436 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
28	6	443	Porphyromonas gingivalis	AB034458	440/441 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
29	12	401	Porphyromonas gingivalis	AB035456	398/399 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
29	13	402	Porphyromonas gingivalis	AB035456	399/400 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
30	10	406	Porphyromonas gingivalis	AB035457	404/405 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
8	33	482	Porphyromonas sp.	AY005067	472/476 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
9	5	511	Porphyromonas sp.	AY005067	502/508 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
12	6	402	Porphyromonas sp.	AY005068	400/400 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
13	10	360	Porphyromonas sp.	AY005068	349/352 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
14	9	531	Porphyromonas sp.	AF366271	497/507 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
30	16	401	Porphyromonas sp.	AY005068	375/386 - 97%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
3	54	349	Porphyromonas-like	AY005071	345/348 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
23	4	395	Porphyromonas-like	AY005070	373/390 - 95%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
23	11	401	Porphyromonas-like	AY005070	387/396 - 97%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	Porphyromonas
3	18	489	Prevotella	AF385558	351/388 - 90%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
1	7	321	Prevotella intermedia	AB028385	317/321 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
14	3	360	Prevotella intermedia	AF414832	357/357 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
14	10	360	Prevotella intermedia	AF414832	358/358 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
22	3	400	Prevotella intermedia	AB028385	394/399 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
22	9	388	Prevotella intermedia	AB028385	386/388 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
24	3	390	Prevotella intermedia	AB028385	371/373 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
29	6	401	Prevotella intermedia	AB028385	395/398 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
29	7	405	Prevotella intermedia	AB028385	395/399 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
30	8	403	Prevotella intermedia	AB028385	401/401 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella

30	18	394	Prevotella intermedia	AB028385	388/391 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
27	17	407	Prevotella loeschii	L16481	393/404 - 97%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
1	15	245	Prevotella nigrescens	X73963	340/347 - 97%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
3	2	351	Prevotella nigrescens	AF414842	349/351 - 100%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
3	27	320	Prevotella nigrescens	AF414842	317/320 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
8	8	441	Prevotella nigrescens	X73963	426/433 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
20	7	389	Prevotella nigrescens	L16471	377/385 - 97%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
20	9	394	Prevotella nigrescens	L16471	384/394 - 97%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
26	8	512	Prevotella nigrescens	AF414842	504/509 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
1	13	430	Prevotella oral clone AO036	AY005054	269/310 - 86%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
11	10	467	Prevotella oralis	L16480	446/464 - 96%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
11	13	458	Prevotella oris	L16474	455/458 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
20	4	395	Prevotella oris	L16474	388/394 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
25	6	460	Prevotella oris	L16474	453/456 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
25	17	446	Prevotella oris	L16474	439/443 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
26	3	459	Prevotella oris	L16474	448/455 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
27	4	443	Prevotella oris	L16474	435/440 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
27	7	449	Prevotella oris	L16474	441/446 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
13	11	376	Prevotella oulora	PVORR16H	347/355 - 97%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
1	17	350	Prevotella PUS9.180	AJ012605	336/347 - 96%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
1	13	485	Prevotella sp.	AJ289173	381/401 - 93%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
1	15	351	Prevotella sp.	AY005065	346/351 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
1	38	303	Prevotella sp.	AY005065	302/303 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
5	11	331	Prevotella sp.	AY005062	325/328 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
5	13	330	Prevotella sp.	AY005062	324/328 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
7	5	402	Prevotella sp.	AY005062	396/402 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
21	10	512	Prevotella sp.	AY005065	509/512 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
26	4	508	Prevotella sp.	AY005056	499/505 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
27	2	490	Prevotella sp.	AY005056	439/444 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
27	5	360	Prevotella sp.	AY005061	347/356 - 97%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
27	6	360	Prevotella sp.	AY005061	348/355 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella

27	15	438	Prevotella sp.	AY005061	428/436 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
27	19	360	Prevotella sp.	AY005061	342/350 - 97%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
28	9	442	Prevotella sp.	AY005056	436/440 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
30	12	412	Prevotella sp.	AY005060	403/410 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
23	6	389	Prevotella tannerae	AF183405	383/387 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
25	11	411	Prevotella tannerae	AF183406	407/409 - 99%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
29	9	397	Prevotella tannerae	AF183406	391/396 - 98%	BXX	Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella
25	3	420	Pseudomonas oleovorans	D84018	417/419 - 99%	BXXII	Gamma	Pseudomonales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas
25	4	420	Pseudomonas oleovorans	D84018	416/419 - 99%	BXXII	Gamma	Pseudomonales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas
2	13	363	Pseudoramibacter alactolyticus:9p-21	AB036761	363/363 - 100%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Pseudoramibacter
6	6	340	Pseudoramibacter alactolyticus:9p-21	AB036761	336/336 - 100%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Pseudoramibacter
20	8	378	Rothia dentocariosa	M59055	374/378 - 98%	BXIV	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	Rothia
8	39	477	Selenomas sp.	AF287797	447/448 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas
3	11	347	Selenomonas infelix	AF287802	338/347 - 97%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas
23	12	477	Selenomonas-like sp.	AF287790	405/416 - 97%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas
21	7	332	Slackia exigua	AF101240	321/326 - 98%	BXIV	Actinobacteria	Coriobacteriales	Coriobacteriaceae	Slackia
14	4	360	Streptobacillus	AJ289183	358/361 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Streptobacillus
24	5	348	Streptobacillus	AJ289183	344/349 - 98%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	?
9	1	524	Streptococcus intermedius	AF104671	520/522 - 99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
9	4	521	Streptococcus intermedius	AF169357	513/518 - 99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
9	10	540	Streptococcus intermedius	AF104671	519/522 - 99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
11	16	475	Streptococcus intermedius	AF169357	474/475 - 99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
27	18	439	Streptococcus intermedius	AF169357	438/439 - 99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
7	1	342	Streptococcus mitis	AY005045	339/342 - 99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
26	6	428	Streptococcus mutans	AJ243965	423/426 - 99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
2	6	350	Streptococcus sp.	AY005047	342/350 - 97%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
13	1	441	Streptococcus sp.	AY005051	436/441 - 98%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
5	20	322	Treponema denticola	M71236	319/322 - 99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
6	13	380	Treponema denticola	M71236	377/380 - 99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
7	18	487	Treponema denticola	M71236	484/488 - 99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
12	10	442	Treponema denticola	M71236	438/442 - 99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema

2	20	359	Treponema maltophilum	X87140	355/359 - 98%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
12	4	361	Treponema socranskii	AF033306	330/334 - 98%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
16	7	319	Treponema socranskii	AF033306	317/319 - 99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
25	8	404	Treponema socranskii	AF033308	402/404 - 99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
28	2	440	Treponema socranskii	AF033306	437/440 - 99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
8	5	410	Treponema sp.	AF023051	404/410 - 98%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
10	10	458	Treponema sp.	AF023034	453/458 - 98%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
22	5	339	Treponema sp.	AF182840	333/339 - 98%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
22	22	383	Treponema sp.	AF023051	378/382 - 98%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
22	26	382	Treponema sp.	AF023032	376/382 - 98%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
1	2	318	Treponema sp.	AF061355	314/318 - 98%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
1	4	348	Treponema sp.	AF023050	346/348 - 99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
2	3	349	Treponema sp.	AF056342	333/349 - 95%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
2	18	350	Treponema sp.	AF023047	343/350 - 98%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
6	7	438	Treponema sp.	AF023038	428/435 - 98%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
6	12	450	Treponema sp.	AF056342	443/450 - 98%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
12	7	454	Treponema sp.	AF023044	453/454 - 99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
23	10	392	Treponema sp.	AF023031	390/392 - 100%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
23	13	387	Treponema sp.	AF182832	386/387 - 99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
23	16	350	Treponema sp.	AF182832	348/350 - 99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
29	4	439	uncultured bacterium BH017	AF125199	429/439 - 97%	BIX	Deferribacteres	Deferribacterales	Deferribacteraceae	?
2	14	440	uncultured bacterium D006	AF125201	435/441 - 98%	BXII	Alpha	Rickettsiales	?	?
2	16	441	uncultured bacterium D006	AF125201	426/441 - 96%	BXII	Alpha	Rickettsiales	?	?
21	3	370	uncultured bacterium D006	AF125201	363/370 - 98%	BXII	Alpha	Rickettsiales	?	?
21	8	437	uncultured bacterium D084	AF125200	406/410 - 99%	BIX	Deferribacteres	Deferribacterales	Deferribacteraceae	?
30	9	444	uncultured bacterium D084	AF125200	434/441 - 98%	BIX	Deferribacteres	Deferribacterales	Deferribacteraceae	?
5	1	301	uncultured bacterium W090	AF125203	295/301 - 98%	BIX	Deferribacteres	Deferribacterales	Deferribacteraceae	?
28	7	432	uncultured eub. E1-K9	AJ289174	399/411 - 97%	?	?	?	?	?
28	11	445	uncultured eub. E1-K9	AJ289174	409/423 - 96%	?	?	?	?	?
29	17	381	unknown	AJ289174	334/371 - 90%	?	?	?	?	?
20	1	400	Veillonella sp.	AF287782	398/400 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Veillonella

Tabelle 5-2. Klone des Primerpaars 515f/1525r

Put.	Klon	bp n	Spezies	Accession no	Id n - %	Phylum	Klasse	Ordnung	Familie	Genus
10	7	990	10B6 - Holosporaceae	AJ428412		BXII	Alpha	Rickettsiales	Holosporaceae	sp.nov.
21	12	971	10B6 - Holosporaceae	AJ428412		BXII	Alpha	Rickettsiales	Holosporaceae	sp.nov.
22	3	524	A17	AF202007	523/524 -99%	BXIII	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	Gemella
24	10	571	A33	AF201980	561/569 -98%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
29	19	970	A35	AF201985	580/614 -94%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	?
25	27	641	A37	AF201986	633/637 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	?
25	29	639	A37	AF201986	637/639 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	?
25	9	684	A39	AF201988	678/684 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas
25	18	647	A39	AF201988	640/647 -98%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas
11	9	631	Catonella morbi	X87151	611/618 -98%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Catonella
24	12	599	Catonella sp oral clone EZ006	AF385577	569/599 -94%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	?
7	6	649	Centipeda periodontii DSM2778(T)	AJ010963	643/649 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Peptococcaceae	Centipeda
5	6	624	Desulfobulbus sp. oral clone R004	AY005037	614/617 -99%	BXII	Delta	Desulfobacterales	Desulfobacteraceae	Desulfobulbus
6	12	600	Desulfobulbus sp. oral clone R004	AY005037	596/600 -99%	BXII	Delta	Desulfobacterales	Desulfobacteraceae	Desulfobulbus
11	13	456	Desulfobulbus sp. Oral clone R004	AY005037	439/447 -98%	BXII	Delta	Desulfobacterales	Desulfobacteraceae	Desulfobulbus
12	3	638	Desulfobulbus sp. Oral clone R004	AY005037	635/638 -99%	BXII	Delta	Desulfobacterales	Desulfobacteraceae	Desulfobulbus
3	18	750	Dialister pneumosintes	X82500	746/750 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Dialister
13	26	727	Dialister pneumosintes	X82500	722/726 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Dialister
16	9	543	Dialister pneumosintes	X82500	543/543 -100%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Dialister
16	15	562	Dialister pneumosintes	X82500	561/562 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Dialister
16	16	562	Dialister pneumosintes	X82500	562/562 -100%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Dialister
30	16	670	Dialister sp.oral clone BS095	AF287787	660/666 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Dialister
8	11	622	Eikenella corrodens	AF320620	609/622 -97%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Eikenella
14	3	642	Eikenella corrodens	AF320620	635/637 -99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Eikenella
15	8	692	Eikenella corrodens	AF320620	686/688 -99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Eikenella
23	14	594	Eikenella corrodens	AF320620	593/594 -99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Eikenella
24	4	560	Eikenella corrodens	AF320620	551/560 -98%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Eikenella

24	5	595	Eikenella corrodens	AF320620	587/595 -98%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Eikenella
26	41	748	Eikenella corrodens	AF320620	729/740 -98%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Eikenella
26	43	659	Eikenella sp.	L06165	647/651 -88%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Eikenella
8	7	602	Eubacterium brachy	U13038	599/602 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
10	1	491	Eubacterium brachy	U13038	488/489 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
10	10	600	Eubacterium brachy	U13038	592/596 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
12	4	698	Eubacterium brachy	U13038	692/695 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
12	9	693	Eubacterium brachy	U13038	691/693 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
5	9	612	Eubacterium brachy	U13038	610/612 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
5	11	610	Eubacterium brachy	U13038	608/610 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
28	8	746	Eubacterium brachy	U13038	743/746 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
27	7	754	Eubacterium brachy 16S rRNA	U13038	744/751 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
27	20	706	Eubacterium brachy 16S rRNA	U13038	703/706 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
22	11	550	Eubacterium E1-K17	AJ289175	536/550 -97%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
2	5	635	Eubacterium nodatum	U13041	632/635 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
2	13	658	Eubacterium nodatum	U13041	655/658 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
2	14	635	Eubacterium nodatum	U13041	632/635 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
2	16	598	Eubacterium nodatum	U13041	593/599 -98%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
30	12	650	Eubacterium nodatum	U13041	638/649 -98%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
12	2	714	Eubacterium PUS9.170	AJ012604	683/693 -98%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
12	11	736	Eubacterium PUS9.170	AJ012604	692/01 -98%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
6	9	613	Eubacterium PUS9.170	AJ012604	608/615 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
9	8	987	Eubacterium PUS9.170	AJ012604	747/770 -97%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
9	15	600	Eubacterium PUS9.170	AJ012604	593/599 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
21	2	595	Eubacterium saburreum-like	AF287776	592/595 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
1	13	542	Eubacterium saphenum	U65987	537/542 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
6	8	605	Eubacterium saphenum	U65987	599/605 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
8	2	615	Eubacterium saphenum	U65987	609/615 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
8	8	617	Eubacterium saphenum	U65987	611/617 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
13	14	646	Eubacterium saphenum	U65987	639/646 -98%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
10	2	600	Eubacterium saphenum 16S rRNA	U65987	588/594 -98%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium

10	3	597	Eubacterium saphenum 16S rRNA	U65987	591/597 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
10	6	499	Eubacterium saphenum 16S rRNA	U65987	465/470 - 98%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
14	8	662	Eubacterium saphenum 16S rRNA	U65987	653/660 - 98%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
20	2	572	Eubacterium sp oral strain A03MT	AF287765	568/572 - 98%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
21	4	559	Eubacterium sp oral strain A03MT	AF287765	556/559 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
22	12	606	Eubacterium sp. oral clone DA014	AF287766	604/606 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
8	14	598	Eubacterium sp. oral strain A03MT	AF287765	590/593 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
1	5	540	Eubacterium sp.oral strain A35MT	AF287761	538/540 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
9	12	600	Eubacterium timidum	U13042	591/599 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
9	19	600	Eubacterium timidum	U13042	586/593 - 98%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
26	18	546	Eubacterium timidum	U13042	538/546 - 98%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
13	11	581	Eubacterium timidum	U13042	572/582 - 98%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
15	4	728	Eubacterium unid.	U43700	723/728 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	Eubacterium
2	1	629	Filifactor alocis	AJ006962	626/627 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
3	15	637	Filifactor alocis	AJ006962	637/639 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
3	16	579	Filifactor alocis	AJ006962	578/580 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
9	5	580	Filifactor alocis	AJ006962	580/580 - 100%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
10	4	600	Filifactor alocis	AJ006962	580/582 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
10	8	600	Filifactor alocis	AJ006962	600/600 - 100%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
10	9	916	Filifactor alocis	AJ006962	845/863 - 97%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
20	7	621	Filifactor alocis	AJ006962	619/620 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
20	10	603	Filifactor alocis	AJ006962	603/603 - 100%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
20	13	627	Filifactor alocis	AJ006962	627/627 - 100%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
21	6	617	Filifactor alocis	AJ006962	613/617 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
21	7	576	Filifactor alocis	AJ006962	576/576 - 100%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
21	9	559	Filifactor alocis	AJ006962	558/559 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
21	13	493	Filifactor alocis	AJ006962	493/493 - 100%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
22	4	547	Filifactor alocis	AJ006962	544/547 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
22	19	600	Filifactor alocis	AJ006962	598/600 - 99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
23	25	557	Filifactor alocis	AJ006962	557/557 - 100%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
23	30	626	Filifactor alocis	AJ006962	626/626 - 100%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium

28	3	777	Filifactor alocis	AJ006962	773/777 -99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
28	7	702	Filifactor alocis	AJ006962	701/702 -99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
28	11	756	Filifactor alocis	AJ006962	756/757 -99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
29	5	552	Filifactor alocis	AJ006962	551/552 -99%	BXXI	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
14	9	959	Firmicutes sp. oral clone CK051	AF287774	952/959 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	?
6	1	558	Firmicutes sp. oral clone CK057	AF287778	553/561 -98%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	?
6	10	620	Firmicutes sp. oral clone CK057	AF287778	620/620 -100%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	?
6	11	626	Firmicutes sp. oral clone CK057	AF287778	625/626 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	?
20	9	612	Gemella morbillorum	L14327	611/612 -99%	BXIII	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	Gemella
24	9	631	Gemella sp. 16S rRNA (strain 933-88)	Y13366	628/630 -99%	BXIII	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	Gemella
27	1	739	Gemella sp. 16S rRNA (strain 933-88)	Y13366	735/738 -99%	BXIII	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	Gemella
27	3	723	Gemella sp. 16S rRNA (strain 933-88)	Y13366	715/717 -99%	BXIII	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	Gemella
27	14	560	Gemella sp. 16S rRNA (strain 933-88)	Y13366	558/558 -100%	BXIII	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	Gemella
13	7	571	Gemella sp. Strain 2045-94	GSPY13364	569/571 -99%	BXIII	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	Gemella
11	12	719	Granalicutella adiacens	AB022027	684/691 -98%	BXIII	Bacilli	Bacillales	Aerococcaceae	Granalicutella
11	15	743	Granalicutella adiacens	AB022027	733/739 -99%	BXIII	Bacilli	Bacillales	Aerococcaceae	Granalicutella
26	46	549	human oral bact C23	AF202012	549/549 -100%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
1	11	508	Megasphaera sp.oral clone BB166	AF287783	503/508 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Megasphaera
1	4	476	Neisseria elongata strain I4	AJ239303	475/476 -99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria
22	18	501	Neisseria mucosa	AJ239282	501/501 -100%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria
24	16	599	Neisseria pharyngis	AJ239281	599/599 -100%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria
5	2	624	Neisseria sicca	AJ239293	623/625 -99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria
7	2	664	Neisseria sicca strain Q28	AJ239293	658/664 -99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria
7	17	470	Neisseria sicca strain Q28	AJ239293	463/469 -98%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria
7	20	429	Neisseria sicca strain Q28	AJ239293	428/429 -99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria
7	8	638	Neisseria sp. oral clone AK105	AY005029	634/638 -99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria
13	3	630	Neisseria sp. oral clone AP015	AY005025	624/630 -99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria
13	8	601	Neisseria sp. Oral clone AP085	AY005023	590/592 -99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria
13	10	540	Neisseria sp. Oral clone AP085	AY005023	534/537 -99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria
23	21	543	Neisseria subflava	AJ239291	542/543 -99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria
23	24	560	Neisseria subflava	AJ239291	560/560 -100%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria

13	1	585	<i>Neisseria subflava</i>	NSU239291	581/584 - 99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria
2	18	637	<i>Neisseria subflava</i> strain U37	AJ239291	637/637 - 100%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria
7	3	499	<i>Neisseria subflava</i> strain U37	AJ239291	496/500 - 99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria
7	4	599	<i>Neisseria subflava</i> strain U37	AJ239291	596/599 - 99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria
7	12	698	<i>Neisseria subflava</i> strain U37	AJ239291	696/698 - 99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria
7	14	639	<i>Neisseria subflava</i> strain U37	AJ239291	638/639 - 99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria
7	19	718	<i>Neisseria subflava</i> strain U37	AJ239291	715/718 - 99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria
13	16	711	<i>Neisseria subflava</i> strain U37	AJ239291	684/691 - 98%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria
13	25	650	<i>Neisseria subflava</i> strain U37	AJ239291	649/650 - 99%	BXII	Beta	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria
25	31	672	<i>Peptostreptococcus</i> sp.	AF287763	668/672 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Peptostreptococcus
24	17	577	<i>Peptostreptococcus</i> sp.	AF287763	574/577 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Peptostreptococcus
2	2	637	<i>Peptostreptococcus</i> sp. Oral cl AJ062	AF287767	632/637 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Peptostreptococcus
9	2	600	<i>Peptostreptococcus</i> sp. Oral cl AJ062	AF287767	599/600 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Peptostreptococcus
16	6	554	<i>Peptostreptococcus</i> sp. Oral cl AJ062	AF287767	549/554 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Peptostreptococcus
20	8	634	<i>Peptostreptococcus</i> sp. Oral cl AJ062	AF287767	630/634 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Peptostreptococcus
26	45	664	<i>Peptostreptococcus</i> sp. oral cl AJ062	AF287767	661/664 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Peptostreptococcus
23	28	566	<i>Peptostreptococcus</i> sp. oral cl AJ062	AF287767	562/563 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Peptostreptococcus
25	3	680	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	AB030583	673/677 - 99%	BXII	Gamma	Pseudomonales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas
25	21	674	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	AB030583	672/674 - 99%	BXII	Gamma	Pseudomonales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas
25	26	627	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	AB030583	625/627 - 99%	BXII	Gamma	Pseudomonales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas
23	8	588	<i>Selenomonas diana</i>	AF287801	578/581 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas
1	9	535	<i>Selenomonas diana</i>	AF287801	531/535 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas
14	2	721	<i>Selenomonas diana</i>	AF287801	692/698 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas
23	1	581	<i>Selenomonas infelix</i>	AF287802	579/581 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas
25	12	675	<i>Selenomonas infelix</i>	AF287802	669/675 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas
25	32	685	<i>Selenomonas infelix</i>	AF287802	680/685 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas
1	19	531	<i>Selenomonas infelix</i>	AF287802	528/531 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas
26	13	569	<i>Selenomonas noxia</i>	AF287799	565/569 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas
29	12	523	<i>Selenomonas noxia</i>	AF287799	519/523 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas
1	12	521	<i>Selenomonas noxia</i>	AF287799	521/521 - 100%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas
25	11	652	<i>Selenomonas</i> sp.	AF287794	635/637 - 99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas

25	14	636	Selenomonas sp.	AF287794	620/623 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas
25	36	607	Selenomonas sp.	AF287794	598/600 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas
25	37	597	Selenomonas sp.	AF287800	593/595 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas
23	22	549	Selenomonas sp.	AF287800	546/549 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas
23	29	591	Selenomonas sp.	AF287794	588/591 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas
13	27	614	Selenomonas sp. oral clone AJ036	AF287800	609/614 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas
23	9	570	Selenomonas sp. oral clone DD020	AF287794	568/570 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas
3	6	601	Selenomonas sp. oral clone DD020	AF287794	599/601 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas
1	6	478	Selenomonas sp.oral clone DD020	AF287794	477/478 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas
23	23	552	Selenomonas sputigena	AF287793	548/552 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas
1	3	520	Selenomonas sputigena	AF287793	519/520 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas
29	20	551	Selenomonas sputigena	AF287793	546/551 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas
3	12	520	Selenomonas-like oral strain FNA3	AF287792	513/520 -98%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	?
8	5	592	Selenomonas-like oral strain FNA3	AF287792	585/593 -98%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	?
8	6	602	Selenomonas-like oral strain GAA14	AF287789	591/595 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	?
25	10	621	Selenomonas-like sp.	AF287789	599/602 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	?
25	34	629	Selenomonas-like sp.	AF287789	624/625 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	?
23	10	611	Selenomonas-like sp. oral cl DM071	AF287790	605/611 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	?
26	51	510	Selenomonas-like sp. oral clone CS015	AF287791	509/510 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	?
1	10	502	Selenomonas-like sp.oral strainGAA14	AF287789	498/502 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	?
30	14	624	Selenomonas sp. clone DS071	AF366274	611/616 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Selenomonas
8	13	615	Streptococcus anginosus strain 367	AF145239	613/615 -99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
24	15	612	Streptococcus constellatus	AF104677	611/612 -99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
9	3	600	Streptococcus intermedius	AF104673	596/597 -99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
9	4	969	Streptococcus intermedius	AF104673	812/828 -98%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
9	10	549	Streptococcus intermedius	AF104673	549/549 -100%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
9	11	600	Streptococcus intermedius	AF104673	599/600 -99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
11	6	709	Streptococcus intermedius	AF104673	684/700 -97%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
11	8	623	Streptococcus intermedius	AF104673	620/623 -99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
11	11	745	Streptococcus intermedius	AF104673	725/738 -98%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
11	14	624	Streptococcus intermedius	AF104673	623/624 -99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus

15	7	696	Streptococcus intermedius	AF104673	696/696 - 100%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
3	19	546	Streptococcus intermedius strain 488	AF104673	546/546 - 100%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
27	8	742	Streptococcus intermedius strain 488	AF104673	726/727 - 99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
27	11	722	Streptococcus intermedius strain 488	AF104673	721/721 - 100%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
27	13	740	Streptococcus intermedius strain 488	AF104673	732/736 - 99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
27	17	731	Streptococcus intermedius strain 488	AF104673	729/729 - 100%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
27	4	747	Streptococcus intermedius strain 488	AF104673	741/744 - 99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
27	5	700	Streptococcus intermedius strain 488	AF104673	687/689 - 99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
5	4	563	Streptococcus mitis	AJ295853	562/563 - 99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
5	5	600	Streptococcus mitis	AY005045	599/600 - 99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
5	7	622	Streptococcus mitis	AY005045	614/615 - 99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
5	8	595	Streptococcus mitis	AF003929	595/595 - 100%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
5	13	593	Streptococcus mitis	AJ295853	593/593 - 100%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
6	3	614	Streptococcus mitis	AY005045	612/615 - 99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
6	5	607	Streptococcus mitis	AY005045	587/588 - 99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
6	6	613	Streptococcus mitis	AY005045	610/613 - 99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
6	13	646	Streptococcus mitis	AY005045	644/646 - 99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
12	1	769	Streptococcus mitis	AJ295853	752/760 - 98%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
12	6	715	Streptococcus mitis	AF003929	704/707 - 99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
12	12	732	Streptococcus mitis	AF003929	716/720 - 99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
20	11	625	Streptococcus mitis	AJ295853	625/625 - 100%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
24	3	466	Streptococcus mitis	AJ295853	464/466 - 99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
26	12	614	Streptococcus mitis	AF003929	614/614 - 100%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
26	48	701	Streptococcus mitis strain 209	AJ295853	698/701 - 99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
15	1	699	Streptococcus sanguis	AF003928	698/699 - 99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
15	2	720	Streptococcus sanguis	AF003928	706/712 - 99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
15	9	688	Streptococcus sanguis	AF003928	684/688 - 99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
23	26	554	Streptococcus sp.	AY005047	552/554 - 99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
6	7	613	Streptococcus sp. oral clone A A007	AY005046	608/613 - 99%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
26	50	601	Streptococcus sp. oral clone BW009	AY005042	601/601 - 100%	BXIII	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus
1	18	523	Treponema amylovorum	Y09959	521/523 - 99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema

5	3	488	Treponema amylovorum	Y09959	485/488 -99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
25	19	705	Treponema maltophilum	X87140	697/703 -99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
25	33	704	Treponema maltophilum	X87140	694/699 -99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
28	1	715	Treponema maltophilum (pat.BR)	X87140	712/715 -99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
28	6	728	Treponema maltophilum (pat.BR)	X87140	710/716 -99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
2	6	499	Treponema parvum OMZ833	AF302937	499/499 -100%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
6	2	605	Treponema socranskii	AF033306	605/605 -100%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
12	7	719	Treponema socranskii	AB015890	699/699 -100%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
14	12	706	Treponema socranskii	AB015891	699/700 -99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
16	14	557	Treponema socranskii	AF033308	557/557 -100%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
21	10	553	Treponema socranskii	AF033308	551/553 -99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
25	24	658	Treponema socranskii	AF033306	656/658 -99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
25	38	633	Treponema socranskii	AB015893	630/633 -99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
26	2	585	Treponema socranskii	AF033308	585/585 -100%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
26	9	632	Treponema socranskii	AF033306	631/632 -99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
3	5	637	Treponema socranskii subsp.	AF033306	633/638 -99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
1	8	513	Treponema socranskii subsp. Buccale	AF033305	513/513 -100%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
1	17	536	Treponema socranskii subsp.'04'	AF033308	536/536 -100%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
23	13	607	Treponema socranskii subsp.socranskii	AF033306	605/607 -99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
28	9	712	Treponema socranskii subsp.socranskii	AF033306	707/708 -99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
28	10	771	Treponema socranskii subsp.socranskii	AF033306	751/757 -99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
14	1	686	Treponema sp.	AF023044	684/687 -99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
14	11	705	Treponema sp.	AF023044	692/699 -98%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
29	14	602	Treponema sp. 3:E:AT013	AF182836	595/597 -99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
22	14	554	Treponema sp. V: D36	AF023044	551/554 -99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
30	11	600	Treponema sp. V:19:D36	AF023044	592/599 -98%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
30	17	690	Treponema sp. V:19:D36	AF023044	678/687 -98%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
30	20	750	Treponema sp. V:19:D36	AF023044	736/750 -98%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
29	10	540	Treponema sp. VI:G:G47	AF056343	540/540 -100%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
29	17	569	Treponema sp.3:E:AT013	AF182836	548/569 -98%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
1	1	500	Treponema sp.5:22:BH022	AF182837	494/500 -98%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema

1	16	533	Treponema sp.5:22:BH022	AF182837	531/533 -99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
2	17	600	Treponema sp.VI:G:G47	AF056343	591/594 -99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
28	4	741	Treponema sp.VI:G:G47	AF056343	708/711 -99%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
28	13	714	Treponema sp.VI:G:G47	AF056343	712/712 -100%	BXVII	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema
15	3	949	uncultured bact. AT425EubA4	AY053478	920/925 - 99	BXIIb	Beta	Burkholderiales	Burkholderiaceae	?
16	7	548	uncultured bacterium W090	AF125203	548/548 -100%	BIX	Deferribaacteres	Deferribacterales	Deferribacteraceae	?
1	7	974	unid. Rumen bact. RF32	AF001764	909/960 -94%	BXII	Alpha	Rickettsiales	?	?
8	10	594	Veillonella dispar	X84006	590/594 -99%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Veillonella
20	3	560	Veillonella sp.	AF287782	560/560 -100%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Veillonella
20	12	596	Veillonella sp.	AF287782	596/596 -100%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Veillonella
30	13	660	Veillonella sp. clone BU083	AF366266	651/660 -98%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Veillonella
3	13	640	Veillonella sp. Oral clone AA050	AF287782	633/640 -98%	BXIII	Clostridia	Clostridiales	Acidaminococcaceae	Veillonella

Zusammenfassung

16S rRNA Analyse der bakteriellen Diversität in Biofilm der Parodontitis

Von 26 Personen mit Parodontitis im fortgeschrittenen Stadium wurden Proben subgingivaler Plaque entnommen. Die Diversität der Bakterien wurden durch 16S rRNA Klonierung und Sequenzierung bestimmt. Nach Ausschluss chimärer Genabschnitte wurden 578 Sequenzen analysiert. Mit der Klonbank des Primerpaars 27f/519r konnten 148 Phylotypen nachgewiesen werden (Anzahl der Klone $n=322$; sog. phylogenetische Coverage $C=66\%$), mit der Klonbank des Primerpaars 515f/1525r 75 Phylotypen ($n=256$, $C=84\%$). Vergleichende Sequenzanalysen ergaben, dass 70% aller untersuchten Sequenzen eine Ähnlichkeit von mindestens 99% mit Sequenzen öffentlicher Datenbanken besitzen. Folgende phylogenetische Bakterienklassen waren vertreten: *Actinobacteria*, *Bacilli*, *Bacteroidetes*, *Clostridia*, *Deferribacteres*, *Flavobacteria*, *Fusobacteria*, *Mollicutes*, *Spirochaetes* und alle Klassen von *Proteobacteria*. In über einem Drittel der Patienten fanden sich Sequenzen, die mindestens zu 99% mit *Porphyromonas gingivalis*, *Filifactor alocis* und *Treponema socranskii* übereinstimmen. Die Genbanken, welche mit den beiden PCR Primerpaaren erzeugt wurden, unterschieden sich signifikant in Repräsentation folgender bakterieller Familien: *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Eubacteriaceae*, *Streptococcaceae* und *Acidaminococcaceae*. Insgesamt 14 Sequenzen zeigten eine Identität weniger als 97% mit bisher veröffentlichten Sequenzen und wurden sechs verschiedenen Familien innerhalb der Phyla *Bacteroidetes*, *Firmicutes* und *Alphaproteobacteria* zugeordnet. Von 20 möglichen Krankheitserregern, die vor kurzem mit der Pathogenese der Parodontitis in Verbindung gebracht wurden, konnten 12 Keime nachgewiesen werden. Nach vorliegender Studie haben folgende Bakterien eine pathogene Rolle in der Parodontitis: *Treponema socranskii subsp. buccale*, *Filifactor alocis*, *Dialister pneumosintes*, *Porphyromonas gingivalis* und *Porphyromonas endodontalis*. Das Keimspektrum bei gesundem Parodont stellt sich sehr überschaubar dar mit einer besonderen Gewichtung auf den *Streptococcaceae*, *Staphylococcaceae*, *Neisseriaceae*, *Acidaminococcaceae* und *Pasteurellaceae*, die 74 % des Keimspektrums im Biofilm von Gesunden ausmachen. *Prevotellaceae*, *Fusobacteriaceae* und *Porphyromonadaceae* sind dagegen nur zu einem geringen Anteil vorhanden.

Summary

16S rRNA analysis of bacterial diversity of subgingival plaque in periodontitis

In this culture independent 16S rRNA study cloning and sequencing was used to analyse gingival samples from a population of 26 persons suffering from aggressive periodontitis and six healthy adult individuals. The samples were amplified with two different universal primer pairs (27f/519r and 515f/1525r) specific for the 16S rRNA gene. After exclusion of chimeric products 578 sequences from periodontal plaque were phylogenetically analysed. The clone library based on primer pair 27f/519r revealed 148 phylotypes while the clone library based on primer set 515f/1525r revealed 75 phylotypes, representing the following bacterial classes *Actinobacteria*, *Bacilli*, *Bacteroidetes*, *Clostridia*, *Deferribacteres*, *Flavobacteria*, *Fusobacteria*, *Mollicutes*, *Spirochaetes* and all classes of *Proteobacteria*. Besides a difference in diversity there also was a different phylogenetic coverage to be observed: The coverage for clone library 27f/519r with n=322 clones was C=66 % and for 515f/1525r with n=256 clones was 84 %. Analysing the representation of the families *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Eubacteriaceae*, *Streptococcaceae* and *Acidaminococcaceae* in both clone libraries yielded a significant difference. Sequences that were at least 99% identical to *Porphyromonas gingivalis*, *Filifactor alocis* and *Treponema socranskii* were present in at least one-third of the patients. The majority of 70 % of the sequences showed a similarity of at least 99 % with sequences deposited in public databases. A total of 14 sequences exhibited less than 97% identity and were assigned to six different families within the phyla *Bacteroidetes* and *Firmicutes*. Twelve of 20 putative pathogens recently proposed to be associated with periodontitis were recovered. In this study a strong association for periodontitis was seen for the following bacteria: *Treponema socranskii* subsp. *buccale*, *Filifactor alocis*, *Dialister pneumosintes*, *Porphyromonas gingivalis* and *Porphyromonas endodontalis*. In contrary little microbial diversity is seen in 112 sequences analysed from healthy periodont with 74 % established by *Streptococcaceae*, *Staphylococcaceae*, *Neisseriaceae*, *Acidaminococcaceae* und *Pasteurellaceae*. Bacterial families like *Prevotellaceae*, *Fusobacteriaceae* and *Porphyromonadaceae* often found in diseased periodont build up less than 10 percent in the healthy periodont.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Ulrich Vogel und Dr. rer. nat. Heike Claus für die intensive Betreuung meiner Arbeit. Zu großem Dank verpflichtet bin ich der technischen Expertise von Gabi Heinze, Marion Patzke-Oechsner, Angelika Hansen, Susanne Ebner und Carmen Roldan. Für die herzliche Atmosphäre möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie bedanken. Ich danke Prof. Dr. med. Matthias Frosch für die Möglichkeit, die Arbeit am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg durchzuführen. Herr Prof. Dr. med. dent. U. Schlagenhauf und Dr. med. dent. S. Burgemeister möchte ich herzlich für die reibungslose Kooperation und die zahlreichen Diskussionen danken.

Diese Arbeit wurde unterstützt vom Graduiertenkolleg 520 (Immunmodulation) der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem IZKF Würzburg (Projekt A18; Projektleiter U. Vogel, U. Schlagenhauf). Das Graduiertenkolleg finanzierte meine Teilnahme am *ARB* Kurs (Bremen, 2001). Als ganz besonders herausragend möchte ich die Leitung des Graduiertenkollegs (GK) durch Professor Dr. rer. nat. Hünig erwähnen und mich herzlich bei Ihm bedanken. Mein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Heidrun Moll für Ihre große Hilfe im Thesis Committee des GK. Dr. med. Annette Moter, Charité - Universitätsmedizin, Berlin, möchte ich für hilfreiche Diskussionen danken. Dem NCBI bin ich dankbar für die kostenlose Bereitstellung des Zugangs zu ihrem BLAST Programm.