

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Leiter/in: Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer

Der Einfluss des oralen Mikrobioms auf die Pathophysiologie der Alzheimer-Krankheit

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von

Christian Matthias Weber

2026

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Privatdozent Dr. med Dr. phil Patrick Finzer

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. med Tillmann Supprian

Drittgutachter/in: Prof. Dr. med Dr. phil Johannes Thome

Zusammenfassung:

Thema der vorliegenden Dissertation ist die Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen dem oralen Mikrobiom und der Entstehung einer Demenz bei Alzheimer-Krankheit. Die zu Grunde liegende Hypothese lautet, dass Patienten mit einer Demenz bei Alzheimer-Krankheit Unterschiede im oralen Mikrobiom zeigen, die sich als orale Dysbiose beschreiben lassen. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden zwischen Juni 2021 und März 2023 insgesamt 51 Probanden über die Gedächtnissprechstunde der psychiatrischen Ambulanz am Universitätsklinikum Düsseldorf rekrutiert. Bei den Probanden handelt es sich um 26 Patienten mit klinisch und biochemisch diagnostizierter Demenz bei Alzheimer-Krankheit und 25 kognitiv gesunde Kontroll-Probanden. Als Kontrollen wurden dabei die jeweiligen Lebenspartner gewählt, um möglichst vergleichbare Lebensumstände zu garantieren.

Nach Prüfung der Einschlusskriterien, Einwilligung und Aufklärung wurden die Probanden gemeinsam zu einem einmaligen Untersuchungstermin einbestellt. Bei diesem Termin wurde die orale Hygiene anamnestisch eruiert, anschließend erfolgte die Entnahme von drei Proben: Ein Abstrich von der rechten Wangeninnenseite, ein Abstrich im supragingivalen Bereich des ersten Molars des rechten Unterkiefers, sowie eine salivare Probe (eine weitere salivare Probe wurde ebenfalls für eine spätere, weiterführende Analyse entnommen, die jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist). Ein Patient war dabei nicht dazu in der Lage, ausreichend Speichel zu sammeln, weswegen jeweils 51 Abstriche und 50 salivare Proben im weiteren Verlauf zur Verfügung standen. Anschließend wurden die vorhandenen Zähne nach FDI-Schema (Fédération Dentaire Internationale) gezählt und es erfolgte eine Untersuchung des Zahnfleischrands mit Hilfe des modifizierten Sulkus-Blutungs-Index (SBI).

Die beiden Abstriche und die Saliva-Probe wurden anschließend mikrobiologisch untersucht. Die mikrobiologischen Untersuchungen umfassten verschiedene Methoden aus der Gruppe der Next-Generation-Sequencing-Technologien (NGS): Nach initialer Extraktion der DNA (Deoxyribonucleic Acid) aus allen mikrobiologischen Proben wurden 50 Saliva-Proben zunächst mittels Oxford-Nanopore-Technologie metagenomisch sequenziert (Whole-genome-sequencing). Nach Bestimmung des DNA-Gehalts erwiesen sich die Wangenabstriche als am wenigsten geeignet für eine weiterführende Analyse und wurden daher nicht sequenziert. Die 50 Saliva- und 51

supragingivalen Proben wurden hingegen mittels Oxford-Nanopore-Technologie taxonomisch im Hinblick auf das 16S rRNA-Gen (Ribonucleic Acid) untersucht (Full-Length-16S-Sequenzierung). Um darüber hinaus einen Methodenvergleich zu ermöglichen, wurden dieselben 101 Proben zusätzlich am Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) des Universitätsklinikums Düsseldorf mittels Illumina-Technologie ebenfalls auf das 16S rRNA-Gen hin untersucht (Short-Read-16S-Sequenzierung).

Die rechnergestützte Infrastruktur und Unterstützung erfolgte durch das Zentrum für Informations- und Medientechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die bioinformatische, taxonomische Klassifizierung der metagenomischen Daten erfolgte mit Kraken2 und Bracken, die der Full-Length-16S- und Short-Read-16S-Daten mit Emlu. Die statistische Auswertung der mikrobiellen Daten erfolgte durch Bestimmung der Bray-Curtis-Dissimilarität und Principal Coordinate Analysis (PCoA), sowie die Analyse mittels Linear Discriminant Analysis Effect Size (LEfSe) und Analysis of Compositions of Microbiomes with Bias Correction 2 (ANCOM-BC2). Die Alpha-Diversität wurde durch Bestimmung von Simpson- und Shannon-Index ermittelt.

Bezogen auf die klinischen Parameter zeigten die Kontrollprobanden einen signifikant höheren Mini-Mental-Status-Test (MMST; $p < 0,01$), eine höhere Zahl von Ausbildungsjahren ($p = 0,03$) und ein höheres Körpergewicht ($p = 0,03$). Alle weiteren klinischen Parameter zeigten keinen Unterschied zwischen den Gruppen.

Die Alpha-Diversität war in beiden Gruppen vergleichbar, mit Ausnahme eines signifikant höheren Shannon-Index in der Patientengruppe in der Short-Read-16S-Sequenzierung der Saliva-Proben ($p = 0,03$).

Die PCoA zeigte auf Spezies-Ebene eine visuelle Auftrennung von Patienten und Kontrollen in salivaren und supragingivalen Proben, wobei der Effekt für die salivaren Proben am ehesten in der metagenomischen Sequenzierung und für die supragingivalen Proben am ehesten in der Short-Read-16S-Sequenzierung identifiziert werden konnte. Für beide Probenarten und alle drei Sequenzierungsmethoden konnten in LEfSe und ANCOM-BC2 zahlreiche Taxa identifiziert werden, deren Abundanz einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Patienten und Kontrollprobanden aufwiesen. Bakterien-Spezies, die dabei wiederkehrend identifiziert werden konnten, wurden als besonders robust eingestuft. Zu den vielversprechendsten Kandidaten zählten dabei

unter anderem *Prevotella nigrescens*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Schwartzia succinivorans*, *Olsenella uli*, *Lactobacillus vaginalis*, *Lactobacillus oris*, *Prevotella maculosa*, *Lancefieldella rimae*, *Lactobacillus paracasei*, *Prevotella oralis* und *Lactobacillus gasseri* mit höheren Abundanzen in der Patientengruppe, sowie *Aggregatibacter aphrophilus*, *Granulicatella adiacens*, *Haemophilus sputorum*, *Streptococcus parasanguinis*, *Lachnoanaerobaculum saburreum*, *Veillonella dispar* und *Kingella oralis* mit höheren Abundanzen in der Kontrollgruppe. Anhand dieser Taxa ließ sich ein Trend hin zu mehr Karies- und Parodontitis-assoziierten Taxa in der Patientengruppe identifizieren.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse der drei Sequenzierungsmethoden auf Genus-Ebene eine deutliche Korrelation und bezogen auf die identifizierten Taxa nach entsprechender Filterung eine konstante Schnittmenge, aber auch distinkte Unterschiede zeigen.

Die genannten Ergebnisse erlauben eine Annahme der Ausgangshypothese, da signifikante Unterschiede zwischen dem oralen Mikrobiom von Alzheimer-Patienten und gesunden Kontrollprobanden identifiziert werden konnten. Die robustesten Ergebnisse zeigten dabei diverse Bakterien-Spezies, die mit oralen Pathologien in Verbindung gebracht werden können, ohne dass sich ein Unterschied im Hinblick auf den klinischen Status der Mundgesundheit feststellen ließ. Dieser Umstand könnte als Hinweis auf einen ökologischen Wandel im Sinne einer oralen Dysbiose betrachtet werden.

Summary:

The subject of the present dissertation is the investigation of a possible relationship between the oral microbiome and the development of dementia in Alzheimer's disease. The underlying hypothesis is that patients with dementia in Alzheimer's disease show differences in the oral microbiome, which can be described as an oral dysbiosis. To test this hypothesis, a total of 51 subjects were recruited between June 2021 and March 2023 via the memory consultation of the psychiatric outpatient clinic at the University Hospital Düsseldorf. The subjects were 26 patients with clinically and biochemically diagnosed dementia in Alzheimer's disease and 25 cognitively healthy control subjects. The respective life partners were chosen as controls in order to guarantee comparable living conditions as far as possible.

After review of the inclusion criteria, informed consent and clarification, the subjects were called together for a single examination appointment. At this appointment, oral hygiene was elicited by anamnesis, followed by collection of three samples: A swab from the inner right cheek, a swab from the supragingival area of the first molar of the right mandible, and one salivary sample (another salivary sample was also taken for a later, further analysis, which is not the subject of the present work). One patient was not able to collect sufficient saliva, which is why 51 swabs and 50 salivary samples were available in the further course. Subsequently, the teeth present were counted according to the FDI (Fédération Dentaire Internationale) scheme and an examination of the gingival margin was performed using the modified Sulcus Bleeding Index (SBI).

The two swabs and the saliva sample were then examined microbiologically. The microbiological investigations included various methods from the group of Next-Generation Sequencing (NGS) technologies: After initial extraction of DNA (Deoxyribonucleic Acid) from all microbiological samples, 50 saliva samples were first metagenomically sequenced using Oxford Nanopore technology (whole-genome sequencing). After determining the DNA content, the cheek swabs proved to be the least suitable for further analysis and were therefore not sequenced. The 50 saliva and 51 supragingival samples, on the other hand, were taxonomically examined with regard to the 16S rRNA gene (ribonucleic acid) using Oxford nanopore technology (full-length 16S sequencing). In addition, to enable a comparison of methods, the same 101 samples were also analyzed for the 16S rRNA gene at the Biological Medical Research Center

(BMFZ) of the University Hospital Düsseldorf using Illumina technology (short-read 16S sequencing).

The computer-based infrastructure and support was provided by the Center for Information and Media Technology at Heinrich Heine University Düsseldorf. The bioinformatic, taxonomic classification of the metagenomic data was carried out with Kraken2 and Bracken, that of the full-length and short-read 16S data with Emu. Statistical evaluation of the microbial data was performed by determining Bray-Curtis Dissimilarity and Principal Coordinate Analysis (PCoA), and analysis using Linear Discriminant Analysis Effect Size (LEfSe) and Analysis of Compositions of Microbiomes with Bias Correction 2 (ANCOM-BC2). Alpha diversity was determined by the Simpson and Shannon indices.

In terms of clinical parameters, the control subjects showed a significantly higher Mini-Mental Status Test (MMST; $p < 0.01$), a higher number of years of education ($p = 0.03$) and a higher body weight ($p = 0.03$). All other clinical parameters showed no difference between the groups.

Alpha diversity was comparable in both groups, with the exception of a significantly higher Shannon index in the patient group in the short-read 16S sequencing of the saliva samples ($p = 0.03$).

PCoA showed a visual separation of patients and controls in salivary and supragingival samples at the species level, with the effect for the salivary samples most likely to be identified in metagenomic sequencing and for the supragingival samples most likely to be identified in short-read 16S sequencing. For both sample types and all three sequencing methods, numerous taxa were identified in LEfSe and ANCOM-BC2 whose abundance showed a statistically significant difference between patients and control subjects. Bacterial species that could be identified recurrently were classified as particularly robust. The most promising candidates included *Prevotella nigrescens*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Schwartzia succinivorans*, *Olsenella uli*, *Lactobacillus vaginalis*, *Lactobacillus oris*, *Prevotella maculosa*, *Lancefieldella rimae*, *Lactobacillus paracasei*, *Prevotella oralis* and *Lactobacillus gasseri* with higher abundances in the patient group, and *Aggregatibacter aphrophilus*, *Granulicatella adiacens*, *Haemophilus sputorum*, *Streptococcus parasanguinis*, *Lachnoanaerobaculum saburreum*, *Veillonella dispar* and *Kingella oralis* with higher abundances in the control group. Based on these

taxa, a trend towards more caries- and periodontitis-associated taxa in the patient group could be identified.

In addition, it could be shown that the results of the three sequencing methods show a clear correlation at the genus level and, in relation to the identified taxa after appropriate filtering, show a constant intersection, but also distinct differences.

These results support the initial hypothesis, as significant differences were identified between the oral microbiome of Alzheimer's patients and healthy controls. The most robust results showed diverse bacterial species that can be associated with oral pathologies, with no difference in the clinical status of oral health. This could be seen as an indication of an ecological change in terms of oral dysbiosis.

Abkürzungsverzeichnis

γ -GT - γ -Glutamyl-Transferase

μ L - Mikroliter

A β - Amyloid- β

ADAS-cog - Alzheimer's Disease Assessment Scale-cognitive Subscale

AIDS - Acquired immune deficiency syndrome (AIDS)

AMPure - Automated Purification and Cleanup

ANCOM-BC2 - Analysis of Compositions of Microbiomes with Bias Correction 2

APP - Amyloid-Precursor-Protein

BfArM – Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte

BMFZ – Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum

BMI – Body-Mass-Index

bp – Basenpaare

Bracken - Bayesian Reestimation of Abundance after Classification with Kraken

CAL – Clinical Attachment Loss

CD – Cluster of Differentiation

CDR – Clinical Dementia Rating Scale

CERAD - Consortium to establish a Registry for Alzheimer's Disease

CRP – C-reaktives Protein

CT – Computer-Tomographie

CTF- β - C-Terminal-Fragment - β

DemTect - Demenz-Detektion

DNA – Deoxyribonucleic Acid

dsDNA – double stranded DNA

EDTA - Ethylendinitrilotetraessigsäure

ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay

FDG-PET - Fluor-Desoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie

FDI - Fédération Dentaire Internationale

FDR – False-Discovery-Rate

FFPE - Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded

g – Gramm

gDNA – genomic DNA

GOT – Glutamat-Oxalacetat
HCl - Chlorwasserstoffsäure
HIV - Human Immunodeficiency Virus
HMPAO-SPECT – Hexamethylpropylenaminooxim Single-Photon-Emission Computed Tomography
HPC – High-Performance-Computer
HRC – Hardness Rockwell
HS – High Sensitivity
ICD-10 - International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10
IgG - Immunglobulin-G
IWG – International Working Group
KI – Konfidenz-Intervall
LCA – Lowest Common Ancestor
LDA - Linear Discriminant Analysis
LEfSe- Linear Discriminant Analysis Effect Size
LVR - Landschaftsverband Rheinland
MCI – Mild Cognitive Impairment
MDS – Multidimensionale Skalierung
mL – Milliliter
MMST - Mini-Mental-Status-Test
MoCA - Montreal Cognitive Assessment Test
MRT - Magnet-Resonanz-Tomographie
NaCl - Natriumchlorid
NEB – New England Biolabs
ng - Nanogramm
NGS - Next-Generation-Sequencing
NIA-AA - National Institute on Aging und der Alzheimer's Association
NMDA - N-Methyl-D-Aspartat
NO - Stickstoffmonoxid
OTU – Operational Taxonomic Unit
PCoA – Principal Coordinate Analysis
PCR – Polymerase-Chain-Reaction

PG – Porphyromonas gingivalis

RNA – Ribonucleic Acid

Rpm – Revolutions per minute

SBI - Sulkus-Blutungs-Index

SRS – Scaling with Ranked Subsampling

TFDD - Test zur Früherkennung von Demenzen mit Depressionsabgrenzung

TLR – Toll-like-Rezeptor

TSH – Thyroidea-stimulierendes Hormon

V1-9 – variable Region 1-9

WHO - World Health Organization

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Demenz bei Alzheimer-Krankheit.....	1
1.1.1 Definition.....	1
1.1.2 Epidemiologie.....	2
1.1.3 Symptomatik.....	2
1.1.4 Ätiologie und Pathophysiologie.....	4
1.1.5 Diagnostik.....	5
1.1.6 Therapie.....	8
1.1.7 Limitationen aktueller und experimenteller Therapieansätze.....	8
1.2 Das orale Mikrobiom.....	9
1.2.1 Allgemeine Begrifflichkeiten der Mikrobiom-Forschung.....	9
1.2.2 Sequenzierungs- und Analysemethoden.....	12
1.2.3 Charakteristiken des oralen Mikrobioms.....	16
1.2.4 Das orale Mikrobiom und Parodontalerkrankungen.....	16
1.2.5 Die Keystone-Hypothese oraler Dysbiose.....	18
1.2.6 Die Pathobionten-Hypothese.....	19
1.3 Zusammenhänge zwischen oralen Pathologien, dem oralem Mikrobiom und der Alzheimer-Krankheit.....	20
1.3.1 Zusammenhänge zwischen Zahnverlust, Parodontalerkrankungen und der Alzheimer-Krankheit.....	20
1.3.2 Porphyromonas gingivalis und die Alzheimer-Krankheit.....	21
1.3.3 Orale Dysbiose in Alzheimer-Patienten.....	23
1.4 Ziele der Arbeit.....	26
2 Material und Methoden.....	27
2.1 Materialübersicht und Ablauf.....	27
2.2 Probandenrekrutierung, Einschlusskriterien und Basisdaten.....	31
2.3 Evaluierung der Mundhygiene und Erhebung des Mundstatus.....	32
2.4 Probenentnahme, -transport und -lagerung.....	33
2.5 Mikrobiom-Analysen.....	34
2.5.1 DNA-Extraktion und Bestimmung der DNA-Konzentration.....	34
2.5.2 Oxford-Nanopore-Sequenzierungen.....	37
2.5.2.1 Metagenomische Sequenzierung.....	37

2.5.2.2 Full-Length-16S-rRNA-Sequenzierung.....	40
2.5.3 Illumina-Short-Read-16S-rRNA-Sequenzierung.....	41
2.5.3.1 Aliquotierung.....	41
2.5.3.2 Externe Weiterverarbeitung.....	42
2.6 Datenanalyse und Statistik.....	42
3 Ergebnisse.....	50
3.1 Probandencharakteristiken.....	50
3.2 Mundhygiene und Mundstatus.....	51
3.3 Whole-Genome-Sequenzierung.....	53
3.3.1 Durchschnittliche relative Abundanzen.....	53
3.3.2 Alpha-Diversität.....	55
3.3.3 Beta-Diversität.....	56
3.4 Full-Length-16S-Sequenzierung.....	62
3.4.1 Saliva.....	62
3.4.1.1 Durchschnittliche relative Abundanzen.....	62
3.4.1.2 Alpha-Diversität.....	64
3.4.1.3 Beta-Diversität.....	65
3.4.2 Supragingival.....	73
3.4.2.1 Durchschnittliche relative Abundanzen.....	73
3.4.2.2 Alpha-Diversität.....	76
3.4.2.3 Beta-Diversität.....	77
3.5 Short-Read-16S-Sequenzierung.....	83
3.5.1 Saliva.....	83
3.5.1.1 Durchschnittliche relative Abundanzen.....	83
3.5.1.2 Alpha-Diversität.....	85
3.5.1.3 Beta-Diversität.....	86
3.5.2 Supragingival.....	94
3.5.2.1 Durchschnittliche relative Abundanzen.....	94
3.5.2.2 Alpha-Diversität.....	97
3.5.2.3 Beta-Diversität.....	97
3.6 Methoden- und Probenvergleich.....	105
3.7 Überschneidung der Ergebnisse.....	115
4 Diskussion.....	122

4.1 Allgemeine Bewertung der Ergebnisse.....	122
4.2 Konsistent identifizierte Taxa.....	122
4.3 Globale Betrachtung konsistent identifizierter Taxa.....	156
4.4 Exkurs: Nitrat-reduzierende Bakterien.....	158
4.5 Fazit zu konsistent identifizierten Taxa.....	159
4.6 Gegenüberstellung der Methoden.....	160
4.7 Stärken der vorliegenden Arbeit.....	166
4.8 Limitationen der vorliegenden Arbeit.....	168
5 Schlussfolgerung.....	171
6 Finanzierung.....	171
7 Literatur- und Quellenverzeichnis.....	172
8 Anhänge.....	206
8.1 Einwilligungsbogen.....	206
8.2 Merkblatt.....	211
8.3 Checkliste.....	214
8.4 Dokumentationsbogen.....	215
8.5 Weitere Tabellen.....	216
8.6 Weitere Graphen.....	224

1 Einleitung

1.1 Demenz bei Alzheimer-Krankheit

1.1.1 Definition

Als Demenz bezeichnet man ein klinisches Syndrom, bei dem es zu einem meist progressiven Verlust von kognitiven Fähigkeiten und Alltagskompetenz kommt (DGPPN, DGN, AWMF, 2023). Laut ICD-10 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems) kommt es dabei zu Störungen höherer kortikaler Funktionen, ohne Bewusstseinstörung, oder Störungen von Sinnesorganen und Wahrnehmung über das für die betreffende Person übliche Maß hinaus. Die Symptomatik muss dabei für mindestens sechs Monate bestehen (BfArM, 2023). Eine Demenz ist dabei nicht als Teil des physiologischen Alterungsprozesses, sondern als schwerwiegende Erkrankung mit verkürzter Lebenserwartung und einem erhöhten Morbiditätsrisiko für andere Erkrankungen zu verstehen (DGPPN, DGN, AWMF, 2023).

Laut Kriterien des National Institute on Aging und der Alzheimer's Association (NIA-AA) beschreibt eine Demenz allgemein kognitive, oder verhaltensbezogene Symptome, die 1) das Funktionieren bei Alltagsaktivitäten einschränken, 2) eine Verschlechterung im Vergleich zu einem vorherigen Zustand darstellen, 3) nicht durch ein Delir oder eine psychische Erkrankung erklärbar sind, 4) durch Eigen- und Fremdanamnese, kognitive Testung, oder klinisch-kognitive Untersuchung diagnostiziert werden und 5) mindestens zwei der fünf Bereiche Gedächtnisfunktion, Verstehen und Durchführen komplexer Aufgaben und Urteilsfähigkeit, räumlich-visuelle Funktionen, Sprachfunktionen, sowie Veränderungen im Verhalten ("Persönlichkeitsveränderungen") betreffen (McKhann et al., 2011).

Über diese syndromale Beschreibung hinaus werden Demenzen im Hinblick auf ihre Ätiologie differenziert. Zu den wichtigsten Ätiologien zählen neben der Alzheimer-Krankheit die vaskuläre Demenz, gemischte Demenzen, die frontotemporale Demenz, die Demenz bei Morbus Parkinson und die Demenz mit Lewy-Körperchen (DGPPN, DGN, AWMF, 2023). Der ICD-10 definiert die Alzheimer-Krankheit dabei als "eine primär degenerative zerebrale Krankheit mit unbekannter Ätiologie und charakteristischen neuropathologischen und neurochemischen Merkmalen" (BfArM, 2023) und differenziert die Demenz bei Alzheimer-Krankheit weiter in einen Typ mit frühem Beginn (vor dem 65. Lebensjahr, mit rascher Verschlechterung), einen Typ mit

spätem Beginn (nach dem 65. Lebensjahr, mit langsamer Progredienz), sowie atypische/gemischte, oder nicht näher bezeichnete Formen (BfArM, 2023).

Abzugrenzen von der Demenz ist das von der Ätiologie unabhängige Prodromal-Stadium oder Risikosyndrom der milden kognitiven Einschränkung, beziehungsweise Mild Cognitive Impairment (MCI). In der aktuellen S3-Leitlinie “Demenzen” wird dieses Syndrom beschrieben als “das Vorliegen objektiver kognitiver Beeinträchtigungen ..., die eine Verschlechterung von einem unbeeinträchtigten Ausgangsstadium darstellen, aber nicht so stark ausgeprägt sind, dass sie die selbstständige Lebensführung beeinträchtigen” (DGPPN, DGN, AWMF, 2023). Die Abgrenzung zur Demenz basiert dabei im Wesentlichen auf dem Ausmaß der Alltagskompetenz (DGPPN, DGN, AWMF, 2023).

1.1.2 Epidemiologie

In Deutschland lebten im Jahr 2021 schätzungsweise 1,8 Millionen Demenzkranke. Davon litten etwa zwei Drittel unter einer Demenz bei Alzheimer-Krankheit. Frauen waren dabei häufiger betroffen als Männer. Die Inzidenzrate bei Menschen über 65 Jahre lag dabei bei 2,00%, mit 3,20% bei Menschen zwischen 80 und 84 Jahre und 12,24% bei Menschen älter als 90 Jahre (Deutsche Alzheimer-Gesellschaft, 2022).

Diese Zahlen entsprechen einer Neuerkrankungsrate von 430000 Menschen pro Jahr. Setzt sich dieser Trend ohne bedeutende Veränderungen in Prävention und/oder Therapie fort, ist im Jahr 2050 mit einer Zahl von 2,4 Millionen Demenzkranken zu rechnen (Deutsche Alzheimer-Gesellschaft, 2022).

Die Erkrankungsdauer wird dabei auf durchschnittlich zwölf bis 24 Jahre geschätzt, wobei davon zwei bis 15 Jahre auf die präklinische Phase entfallen. Im weiteren Verlauf entfallen etwa drei bis sieben Jahre auf die prodromale Phase, zwei bis sechs Jahre auf ein mildes und ein bis sieben Jahre auf ein moderates bis schweres Erkrankungsstadium (DGPPN, DGN, AWMF, 2023)

1.1.3 Symptomatik

Neben den zuvor genannten allgemeinen Merkmalen eines dementiellen Syndroms (siehe 1.1.1 Definition) weisen Patienten mit einer Demenz bei Alzheimer-Krankheit charakteristische Symptome auf. Diese Symptomatik wurde in zwei Forschungskriteriensätzen strukturiert festgehalten, einmal durch das NIA-AA (McKhann et al., 2011) und einmal durch eine International Working Group (IWG)

(Dubois et al., 2014). Auch wenn es sich bei diesen Kriterien primär um Empfehlungen zur korrekten Identifizierung und zum Einschluss von Patienten in Forschungsprojekte handelt, fassen sie wesentliche Aspekte der Alzheimer-Symptomatik zusammen.

Laut NIA-AA liegt eine wahrscheinliche Demenz bei Alzheimer-Krankheit vor, wenn die allgemeinen Demenzkriterien erfüllt sind, ein langsamer Symptombeginn über Monate bis Jahre beobachtet wird und eine eindeutige anamnestiche, oder beobachtete kognitive Verschlechterung vorliegt. Diese umfasst typischerweise zunächst Defizite des episodischen Gedächtnisses gepaart mit weiteren Defiziten aus den in 1.1.1 genannten kognitiven Teilbereichen. Seltener treten Erstsymptome in Form von sprachlichen, visuell-räumlichen, oder exekutiven Defiziten auf. Darüber hinaus kann von einer möglichen Demenz bei Alzheimer-Krankheit gesprochen werden, wenn eine typische Symptomatik mit einem akuten Beginn (gegebenenfalls bei schlecht dokumentiertem Verlauf) einhergeht, oder eine gemischte Ätiologie zu einer abweichenden Klinik führt (McKhann et al., 2011).

Die IWG charakterisiert eine typische Alzheimer-Krankheit als episodische Gedächtnisstörung vom hippokampalen Typ über mindestens sechs Monate und langsam fortschreitend, gegebenenfalls kombiniert mit weiteren Defiziten in kognitiven, oder Verhaltensdomänen. Bei atypischen Verläufen werden eine posteriore Variante (mit primär visueller, oder visuospatialer Symptomatik), eine logopenische Variante (mit progressiver Aphasie-Symptomatik), eine frontale Variante (mit Verhaltensänderungen, oder exekutiven Dysfunktionen) und Alzheimer bei Patienten mit Down-Syndrom differenziert (Dubois et al., 2014).

Neben den bereits mehrfach genannten episodischen Gedächtnisstörungen können die folgenden Symptome ebenfalls bei Alzheimer-Patienten auftreten: Schwierigkeiten beim Erstellen von Plänen und dem Lösen von Problemen, Schwierigkeiten bei der Bewältigung von Alltagstätigkeiten, gestörte räumliche und/oder zeitliche Orientierung, gestörtes Verständnis von Bildern und räumlichen Verhältnissen, Wortfindungsstörungen, Einschränkungen der Urteilsfähigkeit, sozialer Rückzug, Änderungen von Verhalten und Persönlichkeit einschließlich Apathie und Depression, Angst, Agitiertheit und Schlafstörungen. Im weiteren Verlauf und mit fortschreitender Symptomatik werden die Patienten meist zunehmend pflegebedürftig bis hin zur vollständigen Immobilisation und die kommunikativen Fähigkeiten nehmen weiter ab.

Vor allem durch Pneumonie bei Immobilisation ist die Alzheimer-Krankheit in letzter Konsequenz häufig letal (Gaugler et al., 2016).

1.1.4 Ätiologie und Pathophysiologie

Obwohl die Ätiologie der Alzheimer-Krankheit nicht abschließend geklärt ist, gibt es eine Reihe von Risikofaktoren und pathophysiologische Veränderungen, die für die Erkrankung charakteristisch sind. Während etwa 1% der Erkrankungen auf eine Mutation in den Genen Amyloid-Precursor-Protein (APP), oder Presenelin 1/ 2 zurückzuführen ist, konnte man darüber hinaus unter anderem folgende Risikofaktoren identifizieren (Gaugler et al., 2016):

- Ein fortgeschrittenes Alter
- Hetero-, oder homozygote Trägerschaft des ApoE- ϵ 4-Gens
- Eine familiäre Vorbelastung (über die ApoE- ϵ 4-Trägerschaft hinaus)
- Kardiometabolische Risikofaktoren wie Rauchen, Übergewicht und das metabolische Syndrom (mit körperlicher Aktivität und einer ausgewogenen Ernährung umgekehrt als protektiven Faktoren)
- Geringe Zahl von Ausbildungsjahren
- Geringes soziales und kognitives Engagement
- Schädel-Hirn-Traumata (Gaugler et al., 2016)

Die Pathophysiologie der Alzheimer-Krankheit ist dabei durch mehrere charakteristische Veränderungen gekennzeichnet. Es ist jedoch unklar, inwiefern diese kausalen, oder eher konsekutiven Charakter haben (Fan et al., 2019). Auf makroskopischer Ebene kommt es zu einer ausgeprägten Hirnrinden-Atrophie, vor allem im Bereich von Temporallappen und Hippokampus, was mit einer Abnahme der Hirnmasse und häufig mit einer Größenzunahme des lateralen Ventrikels verbunden ist (Sengoku, 2020).

Histologisch stehen zwei Protein-/Peptid-Ablagerungen im Vordergrund: Amyloid- β (A β) und hyperphosphoryliertes Tau-Protein. Amyloid- β ist ein Spaltprodukt des neuronalen Transmembran-Proteins APP. A-, β -, γ -, und η -Sekretasen können APP am C-terminalen Ende hydrolytisch spalten. A-, γ -, und η -Sekretase erzeugen dabei nicht-amyloidogene Produkte, während β - und γ -Sekretase gemeinsam zunächst das C-Terminal-Fragment (CTF)- β und daraus dann die Peptide A β 42 und A β 40 spalten. Diese Peptide stören dann unter anderem die synaptische Übertragung und bilden

Oligomere. Durch Rekrutierung weiterer A β -Peptide bilden sich extrazelluläre, unlösliche Aggregate, die sogenannten senilen, oder Amyloid-Plaques. Diese wirken über unterschiedliche Mechanismen neurotoxisch und induzieren letztlich Apoptose und kognitive Dysfunktion (Fan et al., 2019, Tiwari et al., 2019)

Bei Tau handelt es sich um ein Mikrotubuli-assoziiertes, neuronales Protein. Es ist Teil des Zytoskeletts und beteiligt am zytoplasmatischen Transport. Bei der Alzheimer-Krankheit kommt es zu einer Hyperphosphorylierung dieses Proteins. Dadurch kommt es zur gesteigerten Tau-Tau-Interaktion und der Bildung von intraneuronalen, unlöslichen Tau-Fibrillen, die ebenfalls neurotoxisch wirken (Fan et al., 2019, Tiwari et al., 2019).

Weitere charakteristische Veränderungen umfassen neuroinflammatorische Prozesse und mitochondriale Dysfunktion (Wilkins und Swerdlow, 2016), oxidativen Stress (Alqahtani et al., 2023), sowie eine gestörte cholinerge Transmission (Hampel et al., 2018, Hampel et al., 2019). Dabei beeinflussen diese Prozesse sich gegenseitig, indem zum Beispiel A β Mikroglia aktivieren und darüber inflammatorische Prozesse auslösen (Fan et al., 2019) und Tau-Fibrillen den Untergang cholinergischer Neuronen induzieren (Hampel et al., 2018). Außerdem führt die Bildung amyloider Plaques zur Aktivierung von Kinasen, welche Tau phosphorylieren (Tiwari et al., 2019).

1.1.5 Diagnostik

Die Diagnostik einer Demenz bei Alzheimer-Krankheit setzt sich aus der allgemeinen Syndrom-Diagnose und der weiterführenden, ätiologischen Zuordnung zusammen.

Voraussetzung ist bei jeder Demenz-Erkrankung die initiale Prüfung der Einwilligungsfähigkeit des Patienten. Die Anamnese (inklusive Eigen-, Fremd-, Familien-, Sozial-, Medikamenten- und vegetativer Anamnese) liefert initial Informationen zu Erstsymptomen und Verlauf, sowie Risikofaktoren, Vorerkrankungen und gegebenenfalls bereits sozialen Ressourcen und/oder Risikokonstellationen (DGPPN, DGN, AWMF, 2023).

Eine umfassende körperliche Untersuchung mit internistischem Fokus dient dem Ausschluss metabolischer, kardiovaskulärer und endokrinologischer Differenzialdiagnosen. Beispiele hierfür wären Elektrolytschwankungen, Hypo- und Hyperthyreosen, Erkrankungen von Niere und Leber, oder Vitaminmangel-Erkrankungen (DGPPN, DGN, AWMF, 2023).

Eine neurologische Untersuchung dient der Identifikation von Symptomen, die auf eine neurologische Primärerkrankung mit Demenz als Symptom hindeuten, wie es bei Morbus Parkinson oder Lewy-Körperchen-Demenz der Fall ist. Ein psychopathologischer Befund liefert Rückschlüsse auf das Vorliegen einer Depression, eines Delirs, einer Abhängigkeitserkrankung, oder einer Schizophrenie, die klinisch einer Demenz ähneln, oder parallel vorliegen können (DGPPN, DGN, AWMF, 2023).

Eine biochemische Basisdiagnostik unter Berücksichtigung von Blutbild, Elektrolyten, Nüchtern-Blutzucker, TSH (Thyroidea-stimulierendes-Hormon), CRP (C-reaktives Protein), GOT (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase), γ -GT (γ -Glutamyl-Transferase), Kreatinin, Harnstoff und Vitamin B12 ergänzt den differentialdiagnostischen Prozess und dient dem Ausschluss potentiell reversibler Demenzursachen. Die Labordiagnostik kann dabei um weitere, spezifische Parameter ergänzt werden, wenn eine entsprechende Symptomatik, oder eine klinisch unklare Situation dies erfordern (DGPPN, DGN, AWMF, 2023).

Kognitive Kurztests dienen der orientierenden Prüfung auf das Vorliegen einer kognitiven Störung. Dazu zählen der Mini-Mental-Status-Test (MMST), der Test zur Demenz-Detektion (DemTect), der Test zur Früherkennung von Demenzen mit Depressionsabgrenzung (TFDD) und der Montreal Cognitive Assessment Test (MoCA). Der auch für diese Arbeit genutzte MMST besteht dabei beispielsweise aus elf Fragen, die typischerweise die folgenden kognitiven Funktionen prüfen sollen: Zeitliche und räumliche Orientierung, Merk- und Erinnerungsfähigkeit, Aufmerksamkeit, Sprache- und Sprachverständnis, Fähigkeit zum Lesen, Schreiben, Rechnen und Zeichnen. Dabei kann der Patient bis zu 30 Punkte erreichen (DGPPN, DGN, AWMF, 2023).

Sensitivität und Spezifität des MMST variieren dabei je nach therapeutischer Situation und damit einhergehender Prävalenz (zum Beispiel Hausarzt- im Vergleich zur Facharztpraxis). Leichtgradige Demenzen werden nur begrenzt erfasst und eine differentialdiagnostische, ätiologische Zuordnung der Demenz ist nicht möglich. Nichtsdestotrotz kann der MMST zur initialen Schweregradeinteilung, sowie später zur Verlaufsbeurteilung genutzt werden (DGPPN, DGN, AWMF, 2023):

- 20 bis 26 Punkte: Leichte Demenz
- 10 bis 19 Punkte: Mittelschwere Demenz
- Unter 10 Punkte: Schwere Demenz (DGPPN, DGN, AWMF, 2023)

Zur weiterführenden Differenzialdiagnostik von Demenzen werden neuropsychologische Testbatterien verwendet. Dazu zählen im Falle der Demenz bei Alzheimer-Krankheit unter anderem die Testbatterie des Consortium to establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD) und die Alzheimer's Disease Assessment Scale-cognitive Subscale (ADAS-cog). Darüber hinaus sollten Demenz-assoziierte Symptome wie psychische und Verhaltenssymptome und Einschränkungen der Funktionsfähigkeit im Alltag mit Hilfe entsprechender Skalen erfasst werden (DGPPN, DGN, AWMF, 2023).

Bei der Erfassung kognitiver Fähigkeiten sollten dabei immer Faktoren berücksichtigt werden, die das Ergebnis verzerren können. Dazu zählen unter anderem der Bildungsgrad, der soziokulturelle Hintergrund, die Sprachkompetenz, sensorische Einschränkungen, psychiatrische und/oder körperliche Vorerkrankungen und Erfahrung mit entsprechenden Tests (DGPPN, DGN, AWMF, 2023).

Eine Liquor-Diagnostik kann zum weiteren Ausschluss zentralnervöser Differenzialdiagnosen und zur ätiologischen Zuordnung einer Demenz herangezogen werden. Die Bestimmung von Zellzahl, Gesamtprotein, Laktat, Glukose, Albuminquotient, der oligoklonalen Banden, der intrathekalen Immunglobulin-G-Produktion (IgG) und gegebenenfalls spezifischer serologischer Marker können der Abgrenzung anderer Ursachen einer kognitiven Störung dienen (DGPPN, DGN, AWMF, 2023).

Als neurodegenerative Marker stehen vor allem die Liquor-Konzentrationen von A β 42, Gesamt-Tau und Phospho-Tau (meist als Phospho-Tau 181) zur Verfügung. Außerdem kann der Quotient von A β 42 zu A β 40 ermittelt werden. A β ist dabei bei der Alzheimer-Krankheit typischerweise erniedrigt, während Tau erhöht ist. Dabei wird der kombinierte Einsatz der Parameter empfohlen. Eine differenzialdiagnostische Abgrenzung der Alzheimer-Krankheit gegenüber anderen neurodegenerativen Erkrankungen nur auf Basis der Liquor-Parameter ist nicht möglich, weswegen eine Diagnosestellung immer auf Grundlage aller diagnostischen Informationen erfolgen sollte (DGPPN, DGN, AWMF, 2023).

Zum Ausschluss weiterer, behandelbarer Ursachen sollte eine kraniale Bildgebung durchgeführt werden, wobei eine Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) bevorzugt gegenüber einer Computer-Tomographie (CT) eingesetzt werden sollte. Eine im MRT

detektierbare mediotemporale und parietale Atrophie mit Beteiligung von Hippokampus kann den Verdacht auf eine Alzheimer-Krankheit erhärten, dient jedoch nicht der alleinigen Diagnostik (DGPPN, DGN, AWMF, 2023).

In unklaren Fällen können außerdem nuklearmedizinische Verfahren zur Verdachtserhärtung herangezogen werden. Dazu gehören eine Fluor-Desoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie (FDG-PET), ein Amyloid-PET und eine Hexamethylpropylenaminooxim-Single-Photon-Emission-Computed-Tomography (HMPAO-SPECT) (DGPPN, DGN, AWMF, 2023).

1.1.6 Therapie

Die Therapie einer Demenz bei Alzheimer-Krankheit besteht im Wesentlichen aus einer pharmakologischen Therapie und einer psychosozialen Intervention, in der Regel unter Einbezug der Angehörigen. Zu den psychosozialen Interventionen gehören unter anderem kognitives Training und Stimulation, Reminiszenz-Therapie, Ergotherapie, körperliche Aktivität, Musik- und andere künstlerische Therapien. Darüber hinaus wird empfohlen, ein sogenanntes Dementia Care Management für die Koordination der Versorgung von Menschen mit Demenz und ihrer Angehörigen zu etablieren (DGPPN, DGN, AWMF, 2023).

Die pharmakologische Therapie der Demenz bei Alzheimer-Krankheit umfasst im Wesentlichen die Acetylcholinesterase-Hemmer Donepezil, Galantamin und Rivastigmin und den N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor-Antagonisten (NMDA) Memantin. Die Behandlung orientiert sich dabei an der auf dem MMST basierenden Schweregradeinteilung und gilt als rein symptomatisch (DGPPN, DGN, AWMF, 2023). Acetylcholinesterase-Hemmer kommen dabei bei leichter bis mittelschwerer und Memantin bei mittelschwerer bis schwerer Demenz bei Alzheimer-Krankheit zum Einsatz. Die Wahl des Acetylcholinesterase-Hemmers soll dabei primär abhängig vom Neben- und Wechselwirkungsprofil erfolgen. Ein kombinierter Einsatz der Präparate wird in der Regel nicht empfohlen (DGPPN, DGN, AWMF, 2023).

1.1.7 Limitationen aktueller und experimenteller Therapieansätze

Obwohl gerade Acetylcholinesterase-Hemmer immer wieder im Hinblick auf eine mögliche, krankheitsmodifizierende Wirkung diskutiert werden (Hampel et al., 2019), gilt die pharmakologische Therapie der Demenz bei Alzheimer-Krankheit im Wesentlichen als symptomatische Therapie (DGPPN, DGN, AWMF, 2023).

Entsprechend groß ist das Interesse an therapeutischen Ansätzen, welche die neuropathologischen Veränderungen der Alzheimer-Krankheit zum Ziel haben. Speziell A β , Tau, sowie β - und γ -Sekretase wurden dabei in der Vergangenheit als Zielstrukturen gewählt (Fan et al., 2019, Lu et al., 2020).

Obwohl einzelne Arbeiten dabei eine zum Teil deutliche Wirkung auf die neuropathologischen Parameter erzielen konnten (Avgerinos et al., 2021, Egan et al., 2018), ist die klinische Wirksamkeit dieser Medikamente insgesamt gering (Lu et al., 2020) mit teils schweren Nebenwirkungen (Fan et al., 2019, Lu et al., 2020). Jüngere Arbeiten, unter anderem zum monoklonalen Antikörper Lecanemab gegen lösliche A β -Protofibrillen konnten zwar vielversprechendere Ergebnisse erzielen (van Dyck et al., 2022). Jedoch wirft vor allem die große Diskrepanz zwischen der Wirkung auf messbare Konzentrationen von A β und Tau und der klinischen Effektivität pharmakologischer Therapien (Avgerinos et al., 2021) die Frage auf, ob die für die Alzheimer-Krankheit so charakteristischen, neuropathologischen Veränderungen wirklich die zentrale Rolle einnehmen, die man ihnen traditionell beimisst, oder ob die Krankheitsentstehung auf dem Zusammenspiel weiterer Faktoren beruht (Gallardo et al., 2019).

1.2 Das orale Mikrobiom

1.2.1 Allgemeine Begrifflichkeiten der Mikrobiom-Forschung

Mit dem Begriff “Mikrobiom” wird typischerweise ein Ökosystem von Mikroorganismen in einer bestimmten ökologischen Nische beschrieben (Berg et al., 2020). Im Englischen werden darüber hinaus auch teilweise noch die Begriffe “Microbiota” als Gesamtheit der Mikroorganismen und “Microbiome” als Gesamtheit der Mikroorganismen zusammen mit ihrem genetischen Material und den Umweltbedingungen ihrer ökologischen Nische unterschieden (Berg et al., 2020, Requena und Velasco, 2021).

Im Kontext biomedizinischer Forschung handelt es sich bei dieser Nische in der Regel um einen anatomischen Raum des menschlichen Körpers (Gilbert et al., 2018, Lloyd-Price et al., 2016). Die Mikroorganismen werden dabei in der Regel nicht als Pathogene betrachtet, sondern als Organismen, die sich in einem synergistischen Verhältnis mit dem Wirtsorganismus befinden. “Echte” Pathogene machen in diesem Szenario nur einen verschwindend geringen Anteil der Mikroorganismen in Kontakt mit dem

Menschen aus (Berg et al., 2020). Ein solcher Synergismus setzt dabei einen gewissen Grad immunologischer Toleranz des Immunsystems voraus (Gilbert et al., 2018, Lloyd-Price et al., 2016, Petersen und Round, 2014).

Die Gesamtheit der Mikroorganismen umfasst dabei Bakterien, Pilze, Archea, Protozoen und Viren, wobei Bakterien wahrscheinlich zahlreicher als Pilze, Archea und Protozoen und am besten erforscht sind. Einer aktuellen Schätzung zu Folge ist die Zahl bakterieller Zellen im menschlichen Körper mindestens genauso hoch, oder sogar höher als die Zahl humaner Zellen (Gilbert et al., 2018). Diese Schätzung ist zwar konservativer als ältere Schätzungen von bis zu zehnmal mehr bakteriellen Zellen (Luckey, 1972), resultiert jedoch immer noch in einer Zahl von bis zu 2000 000 bakteriellen gegenüber 20 000 humanen Genen. Dabei ist die Zahl von Viren und Bacteriophagen noch nicht bestimmt und könnte wiederum noch höher liegen (Gilbert et al., 2018).

Das Mikrobiom, welches historisch wahrscheinlich die größte Aufmerksamkeit erfahren hat, ist das gastrointestinale Mikrobiom (Hayes und Sahu, 2020). Mittlerweile wurden jedoch auch in zahlreichen anderen anatomischen Nischen die Mikrobiome charakterisiert, unter anderem im Mund (Chen et al., 2010), den Atemwegen (Kumpitsch et al., 2019), dem Urogenitaltrakt (Chen et al., 2021, Neugent et al., 2020) und auf der Haut (Byrd et al., 2018). Selbst im Blut (Castillo et al., 2019) und in der Plazenta (Briana et al., 2021) wurde die Existenz eines Mikrobioms postuliert, wobei nicht abschließend geklärt ist, inwieweit Probenkontaminationen hier eine Rolle spielen (Chrisman et al., 2022).

Man geht davon aus, dass sich ein “gesundes” Mikrobiom in einem ökologischen Gleichgewicht zwischen den beteiligten Mikroorganismen untereinander und dem Wirtsorganismus, beziehungsweise seinem Immunsystem befindet (Berg et al., 2020, Lloyd-Price et al. 2016). Wird dieses Gleichgewicht durch unterschiedlichste Einflüsse gestört und kommt es dadurch zu einer (gegebenenfalls krankheits-assoziierten) Verschiebung der mikrobiellen Zusammensetzung, spricht man von einer “Dysbiose”. Außerdem spielen die Idee eines “Kern-Mikrobioms” mit interindividuell ähnlichen metabolischen Pfaden und einer gewissen Stabilität und Resilienz gegenüber äußeren Einflüssen eine Rolle bei der Definition des gesunden Mikrobioms (Lloyd-Price et al., 2016).

Für zahlreiche Erkrankungen wurden bereits dysbiotische Zustände in unterschiedlichsten Mikrobiomen beschrieben (Clemente et al., 2018, Kumpitsch et al., 2019, Sampaio-Maia et al., 2016). Dabei ist jedoch oft nicht ersichtlich, inwieweit diese Dysbiosen kausalen, oder lediglich assoziativen Charakter haben, da das Zusammenspiel mit Wirtsorganismus und Immunsystem potentiell bidirektional funktioniert (Schmidt et al., 2018).

Nichtsdestotrotz deuten zumindest Tier-experimentelle Arbeiten mit sogenannten “Gnotobiotic mice” (Thomson et al., 2022) und Stuhltransplantationen (Cheng et al., 2021, Du et al., 2021, Fang et al., 2018) darauf hin, dass Veränderungen des Mikrobioms durchaus Änderungen eines pathologischen Zustandes nach sich ziehen können (Schmidt et al., 2018). Im Falle des gastrointestinalen Mikrobioms existieren dabei auch etablierte Hypothesen zur Beeinflussung pathologischer Prozesse. Diese umfassen unter anderem die Beeinflussung des epithelialen Tight-junctions-Verbandes mit erhöhtem Aufkommen bakterieller Lipopolysaccharide im Blut und damit einhergehender systemischer Entzündungsreaktion (Kinashi und Hase, 2021, Martel et al., 2022), sowie ein vermindertes Aufkommen kurzkettiger Fettsäuren (Morrison und Preston, 2016). Dennoch gehen Mikrobiom-Studien nach wie vor mit einem hohen Risiko einher, hauptsächlich indirekte Assoziationen ohne erwiesenen Kausalzusammenhang zu erfassen (Schmidt et al., 2018).

Eine weitere Limitation von Mikrobiom-Studien kann in der relativen Natur der kompositionellen Daten liegen. Mikroorganismen werden oft nicht in absoluter Anzahl bemessen, sondern als Anteil an der gemessenen Gesamtpopulation in der Probe beschrieben, ausgedrückt als relative Abundanz. Das bringt rein mathematisch bereits das Problem mit sich, dass Veränderungen der Abundanz eines Erregers, oder zum Beispiel auch das Nicht-Erfassen im Rahmen der Untersuchung, zu einer veränderten Abundanz der anderen Organismen in der Gesamtpopulation führen (Ashton et al., 2016).

Alternativ können zur statistischen Auswertung auch absolute Zahlen identifizierter DNA-Abschnitte, beziehungsweise Reads verwendet werden. Das bringt jedoch den Nachteil mit sich, dass oft große Unterschiede in der Gesamt-Readzahl von Proben vorliegen, auch als Library size, oder Sequenzierungstiefe bezeichnet. Um dieses Problem zu umgehen, können verschiedene Normalisierungsmethoden verwendet werden, die darauf abzielen, Unterschiede in der Sequenzierungstiefe zu relativieren,

jedoch auch mit dem Risiko einer Datenverzerrung einhergehen. Weitere Hürden in der Datenanalyse umfassen den Umgang mit einer hohen Falscherkennungsrate (False-discovery-rate (FDR)) durch die notwendigerweise hohe Anzahl von Tests, die oft hohe Anzahl von Nullwerten, die teilweise durch Addieren eines Pseudo-Counts korrigiert, allerdings dadurch auch nachträglich verzerrt werden, sowie das Problem der Probennahmefraktion (Sampling fraction), das beschreibt, dass man nicht genau sagen kann, ob ein Unterschied in der absoluten Readzahl, oder relativen Abundanz auf einen tatsächlichen Unterschied im untersuchten Ökosystem, oder aber eine ungleiche Probenentnahme/-verarbeitung zurückzuführen ist. Diesen Problemen kann nur bis zu einem gewissen Punkt durch statistische Operationen entgegengewirkt werden (Lin und Peddada, 2020b, Nearing et al., 2022).

Eine weiterführende Charakterisierung des Mikrobioms basiert dann in der Regel auf den der Ökologie entlehnten Begriffen der Alpha- und Beta-Diversität. Die Alpha-Diversität beschreibt dabei die biologische Diversität innerhalb einer Probe. Sie kann einfach anhand der Anzahl der Taxa innerhalb einer Probe, oder ausgedrückt über verschiedene mathematische Indices beschrieben und zwischen Proben verglichen werden (Ashton et al., 2016).

Die Beta-Diversität beschreibt hingegen den Unterschied zwischen zwei Proben, oder im biomedizinischen Kontext häufig Fall- und Kontrollgruppen (Ashton et al., 2016). Diese kann auf kompositioneller Ebene mit weiterführenden statistischen Operationen wie der Bray-Curtis-Dissimilarität und multidimensionaler Skalierung erfolgen (Ashton et al., 2016), oder bezogen auf einzelne Taxa als differentielle Abundanz-Analyse (Lin und Peddada, 2020b). Dazu gehören statistische Verfahren wie Analysis of Compositions of Microbiomes with Bias Correction 2 (ANCOM-BC2) (Lin und Peddada, 2020a), oder Linear Discriminant Analysis Effect Size (LEfSe) (Segeta et al., 2011).

1.2.2 Sequenzierungs- und Analysemethoden

Das Verständnis des Mikrobioms ist eng mit dem Fortschritt der Sequenzierungstechnik verbunden. Nachdem die sogenannte Sanger-Sequenzierung als "First-Generation-Sequencing"-Methode titulierte wurde, werden jüngere Methoden, die hauptsächlich in Mikrobiom-Arbeiten zum Einsatz kommen, auch als Next-Generation-Sequencing-Methoden (NGS) zusammengefasst. Diese können weiter in Second- und Third-Generation-, oder anwendungsbezogener in Short- und Long-Read-Sequencing-

Methoden unterteilt werden. Zu den Short-Read-Sequencing-Methoden gehören vor allem Ion Torrent und Illumina Plattformen, zu den Long-Read-Methoden Plattformen von Pacific Bioscience und Oxford Nanopore. Außerdem kann man grundlegend zwischen DNA- und RNA-Sequenzierungen unterscheiden (Hu et al., 2021).

Short-Read-Methoden sequenzieren klonal amplifizierte DNA-Moleküle, oder Reads, von 250 bis 800 Basenpaaren (bp). Long-Read-Methoden können hingegen Reads von mehr als 10.000bp aus nativer DNA, ohne vorherige Amplifikation sequenzieren. Dabei kann man Whole-Genome-, Whole-Exome-, Epigenome- und Targeted Sequenzierungen unterscheiden (Hu et al., 2021).

Jede NGS-Methode setzt sich nach der Extraktion des genetischen Materials aus den drei Schritten der Library preparation, der Sequenzierung und der Daten-Analyse zusammen. Das Markieren von Proben mit kurzen, sogenannten “Barcode”-Sequenzen erlaubt es dabei, viele Proben zugleich zu sequenzieren und die Sequenzen später zu einzelnen Proben zurückzuverfolgen. Der Prozess, mit dem aus einem rohen Signal eine Nukleotidabfolge abgeleitet wird, wird auch als “Basecalling” bezeichnet (Hu et al., 2021).

Illumina-Sequenzierungen basieren dabei auf dem Prinzip des “Sequencing-by-Synthesis”. Dazu wird die DNA zunächst mechanisch, enzymatisch, oder chemisch fragmentiert, damit dann an beiden Enden der Fragmente Adapter ligiert werden. Die Sequenz dieser Adapter ist komplementär zu den für die Sequenzierung gewählten Primern, die sich gebunden als “Rasen” in der sogenannten Flow cell befinden. Die Fragmente binden dadurch über ihre Adapter an den Primern auf der Flow cell. Eine Polymerase synthetisiert an den gebundenen Fragmenten komplementäre Gegenstränge, was aufgrund der “Beugung” der Fragmente auch als “Brücken-PCR” (Polymerase-Chain-Reaction) bezeichnet wird. Durch Trennung der Stränge und Wiederholung des Ablaufs entsteht eine große Zahl von komplementären Einzelsträngen. Es folgt die Zugabe von Primern, einer weiteren Polymerase und fluoreszierender Nukleotide. In jedem nun folgenden Sequenzierungszyklus wird ein entstehender, komplementärer Strang um ein Nukleotid verlängert, die fluoreszierende Markierung mit einem Laser angeregt und das entstehende Lichtsignal ausgelesen. In einem weiteren Schritt kann ein komplementärer Strang aus der entgegengesetzten Richtung auf dieselbe Weise synthetisiert werden, was man als “paired-end” Sequenzierung bezeichnet und die Qualität der Sequenzierungsdaten steigert (Hu et al., 2021).

Die Oxford Nanopore Technologie basiert hingegen auf der Passage von einsträngigen Nukleinsäuren durch eine Protein-Pore. Dazu enthalten die sogenannten Flow cells in eine Membran eingebettet tausende der namensgebenden Poren. An der DNA ligierte Adapter ermöglichen die Bindung an die Pore, woraufhin ein Motorprotein am 5'-Ende des Adapters angetrieben durch einen Ionen-Strom den Einzelstrang durch die Pore bewegt. Die Passage jedes Nukleotids induziert dabei eine charakteristische Störung des Ionen-Stroms. Diese kann in Echtzeit gemessen werden und gibt Rückschluss auf die DNA-Sequenz (Hu et al., 2021).

Short-Read-Sequencing allgemein und Sequenzierungen auf einer Illumina-Plattform im Speziellen bieten den Vorteil, mit einer etablierten Technologie mit anerkanntermaßen hoher Genauigkeit zu arbeiten. Nachteile sind vor allem eine lange Laufzeit und gegenüber der Oxford Nanopore Technologie die Größe der Gerätschaften. Demgegenüber bieten Long-Read-Sequenzierungen auf einer Oxford-Nanopore-Plattform den Vorteil auch längere, repetitive Sequenzen zu erfassen und durch die Verwendung nativer DNA Amplifikations-basierte Fehler zu vermeiden. Darüber hinaus ist ein Auslesen der Sequenzierungsergebnisse unmittelbar möglich ("Real-Time-Sequencing") und die notwendigen Geräte sind deutlich kleiner und grundsätzlich leicht zu transportieren. Zentraler Nachteil war nach Einführung eine höhere Fehlerrate, die jedoch mit zunehmender Weiterentwicklung bereits geringer geworden ist (Hu et al., 2021).

Zusätzlich zur Frage nach der Sequenzierungs-Plattform muss abhängig vom biologischen Kontext außerdem entschieden werden, was genau sequenziert werden soll. Im Kontext der Mikrobiom-Charakterisierung spielt vor allem die Sequenzierung des 16S rRNA-Gens eine zentrale Rolle, die zusammen mit der Whole-Genome-, oder metagenomischen "Shotgun"-Sequenzierung die aktuell wichtigsten Methoden im Kontext der Mikrobiom-Forschung bilden (Wensel et al., 2022).

Das 16S rRNA-Gen codiert die ribosomale 16S-RNA, welche ein Teil der kleinen 30S-Untereinheit prokaryotischer Ribosomen bildet (Lane et al., 1985). Dieses Gen wird zur taxonomischen Zuordnung von Bakterien genutzt, da es ubiquitär vorkommt und hoch konservierte Regionen mit großer Ähnlichkeit zwischen Bakterien-Spezies enthält. Zwischen diesen konservierten Regionen finden sich die variablen Regionen V1 bis V9, die eine Identifikation der Bakterien erlauben. Dabei werden typischerweise nur eine, oder mehrere dieser Regionen sequenziert. Für diese werden spezifische Primer kreiert,

die eine PCR-basierte Amplifikation der variablen Regionen erlauben. Sequenzierungen des kompletten 16S rRNA-Gens werden ebenfalls häufiger und sollen eine bessere Differenzierung der unterschiedlichen Taxa ermöglichen (Ashton et al., 2016, Wensel et al., 2022). Short-Read-Sequenzierungs-Methoden können das 16S rRNA-Gen mit seinen etwa 1550bp nicht vollständig erfassen, sodass Taxa mit großer Ähnlichkeit nicht differenziert werden und die Auflösung meist auf das Genus-Level limitiert ist. Full-Length-Sequenzierungen des 16S rRNA-Gens bieten daher eine bessere Differenzierung, gehen jedoch auch mit einer höheren Fehlerrate einher (Curry et al., 2022). Außerdem steigen Sequenzierungszeit und –kosten ebenfalls mit der Zahl der sequenzierten V-Regionen (Ashton et al., 2016, Wensel et al., 2022).

Für metagenomische Sequenzierungen erfolgt keine gezielte Amplifizierung einzelner Genabschnitte, sondern das gesamte genetische Material in einer Probe wird sequenziert. Das erlaubt die zusätzliche Identifikation von Eukaryoten und DNA-Viren, sowie funktionale Annotationen, sprich, Aussagen über zum Beispiel die Abundanz von Genen assoziiert mit bestimmten Stoffwechselwegen. Nachteile dieser Methode sind ein hoher Anteil meist menschlicher Wirts-DNA und ein höherer Bedarf an Ausgangsmaterial aufgrund der fehlenden Amplifikation (Wensel et al., 2022).

Die generierten Reads können dann mit Hilfe verschiedener, bioinformatischer Software-Tools weiterverarbeitet werden. Diese arbeiten mit unterschiedlichen Algorithmen, die teils sehr unterschiedlichen Prinzipien folgen: So arbeitet Emu mit den Wahrscheinlichkeiten für ein korrektes Alignment von Reads zu Datenbank-Sequenzen (Curry et al., 2022), Kraken mit der Generierung von k-meren und Zuordnung zu taxonomischen Stammbäumen (Wood und Salzberg, 2014) und QIIME (Quantitative Insights into Microbial Ecology) mit dem Zusammenfassen von Reads mit einer gewissen Mindest-Ähnlichkeit zu sogenannten Operation Taxonomic Units (OTU). Ein OTU stellt dabei eine Gruppe ähnlicher Sequenzen dar, die typischerweise auf einem festgelegten Ähnlichkeitsniveau (z.B. 97 %) gebildet wird, und repräsentiert daher in etwa ein Taxon, ohne notwendigerweise eine exakte Spezieszuordnung zu haben. Die Anzahl der Reads, die einem OTU zugeordnet sind, kann anschließend als absolute Häufigkeit oder als relative Abundanz eines bestimmten Taxons in einer Probe betrachtet werden. Für eine weiterführende statistische Auswertung werden in der Regel mehrere Proben mit ihren OTUs zu einer OTU-Tabelle zusammengefasst (Ashton et al., 2016) (siehe 2.6 Datenanalyse und Statistik).

1.2.3 Charakteristiken des oralen Mikrobioms

Der Begriff des oralen Mikrobioms beschreibt die Gesamtheit aller Mikroorganismen der Mundhöhle. Die Charakterisierung dieses Ökosystems unterliegt ständigem Wandel, jedoch gilt es als allgemein akzeptiert, dass es sich aus über 700 mikrobiellen Spezies zusammensetzt. Laut der Human Oral Microbiome Database sind im Jahr 2023 774 bakterielle Spezies bekannt, davon 58% offiziell benannt, 16% unbenannt aber kultiviert und 26% unbenannt und noch nicht kultiviert (Chen et al., 2010). Damit gilt das orale Mikrobiom nach dem gastrointestinalen als das zweit-diverseste Mikrobiom des menschlichen Körpers (Sudhakara et al., 2018, Sureda et al., 2020).

Die Mundhöhle lässt sich dabei in verschiedene anatomische Nischen mit potentiell unterschiedlicher, mikrobieller Besiedlung unterteilen. Zu diesen Nischen zählen unter anderem Lippen, Zunge, Tonsillen, harter/weicher Gaumen, Zähne und der sub-/supragingivale Raum. Dadurch und durch eine Vielzahl teils sehr unterschiedlicher Umwelteinflüsse, allen voran die Ernährung, mechanische und chemische Mundpflege und Rauchen, wird eine einheitliche Charakterisierung des oralen Mikrobioms erschwert (Sureda et al., 2020).

Als weit verbreitete Phyla im oralen Mikrobiom gelten Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteria, Proteobacteria und Spirochetes, während Actinomyces, Capnocytophaga, Corynebacterium, Fusobacterium, Leptotrichia, Prevotella, Rothia, Selenomonas, Streptococcus, Treponema und Veillonella als wichtige Genera beschrieben wurden (Sureda et al., 2020).

1.2.4 Das orale Mikrobiom und Parodontalerkrankungen

Mit einer exemplarischen Prävalenz von 42% bei US-Bürgern über 30 Jahren stellt Parodontitis eine große Belastung für Gesundheitssysteme weltweit dar (Eke et al., 2018). Seit dem International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions 1999 werden Erkrankungen des Zahnhalteapparates, oder Parodontalerkrankungen, in 8 Hauptgruppen unterteilt: Gingivale Erkrankungen (inklusive der Plaque-induzierten Gingivitis), chronische Parodontitis, aggressive Parodontitis, Parodontitis als Manifestation einer systemischen Erkrankung, nekrotisierende Parodontalerkrankung, Parodontitis assoziiert mit endodontalen Läsionen und entwicklungsbedingte und erworbenen Deformationen (Armitage, 2000). Dabei werden vor allem die inflammatorisch bedingte Gingivitis und Parodontitis mit Veränderungen des oralen Mikrobioms in Verbindung gebracht (Abusleme et al., 2021).

Die S3-Leitlinie zur Behandlung von Parodontitis der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie (DG PARO) definiert Parodontitis als “fortschreitende Destruktion des Zahnhalteapparats” mit “Verlust der parodontalen Gewebe, welcher sich durch Verlust an klinischem Attachmentlevel (Clinical Attachment Loss (CAL)) und radiologisch nachweisbaren Knochenabbau, die Ausbildung parodontaler Taschen und gingivale Blutung manifestiert” (DG PARO, DGZMK, AWMF 2020). Bezogen auf die Pathophysiologie wird die Parodontitis dabei bereits als “multifaktorielle, chronisch entzündliche Erkrankung im Zusammenhang mit einem dysbiotischen Biofilm” (DG PARO, DGZMK, AWMF 2020) beschrieben.

Bevor die Parodontitis als dysbiotische Erkrankung identifiziert wurde, existierte bereits eine Reihe von Krankheitshypothesen, die den Weg dorthin bereitet haben. Durch kulturelle Anzucht konnte man zunächst demonstrieren, dass die subgingivale, mikrobielle Zusammensetzung bei Parodontitis deutliche Veränderungen durchlief. Da man bei dieser Veränderung noch von einer klassischen, infektiologischen Hypothese ausging, versuchte man zunächst die entsprechenden Auslöser-Keime zu identifizieren. Das Ergebnis war die Charakterisierung des sogenannten “Red-complex” aus *Porphyromonas gingivalis* (PG), *Treponema denticola* und *Tannerella forsythia*. Weniger pathogene, jedoch immer noch-Parodontitis-assoziierte Bakterien wurden als Orange-Complex zusammengefasst, während andere Bakterien-Konstellationen, die mit oraler Gesundheit vereinbar zu sein schienen, als Blue-, Purple- und Green-Complex betitelt wurden (Abdulkareem et al., 2023, Hajishengallis und Lamont, 2012, Socransky et al., 1998). Die Tatsache, dass sich im Tierexperiment durch die “Implantation” von PG (damals noch unter dem Namen “*Bacteroides gingivalis*”) eine Parodontitis auslösen ließ, schien die infektiologische Hypothese zunächst zu unterstützen (Holt et al., 1988).

Mit Hilfe von Kultur-unabhängige Methoden konnte dieses Szenario einer durch exogen zugeführte Bakterien induzierten Infektion weitestgehend widerlegt werden, da die Bakterien des Red complex zum einen auch in gesunden Menschen zu finden sind und zum anderen eine Vielzahl anderer Spezies ebenfalls mit dem Krankheitszustand assoziiert sind (Hajishengallis und Lamont, 2012).

Mittlerweile geht man davon aus, dass eine Parodontitis das Ergebnis eines polymikrobiellen Synergismus ist: Mikroorganismen organisieren sich durch Interspezies-Kommunikation koadhäsiv in Form von Biofilmen und wirken proinflammatorisch, zunächst allerdings noch kontrolliert durch das Immunsystem

(Hajishengallis und Lamont, 2012). Das parodontale Gewebe verfügt dabei über ein spezialisiertes System von Mechanismen des angeborenen Immunsystems: Während zum Beispiel im Darm ein ausgeprägter Mucus-Film den Kontakt zwischen Epithel und Mikroorganismen limitiert, ist der Kontakt im Mund deutlich unmittelbarer. Zugleich weist das gingivale Epithel größere interzelluläre Räume auf, ist also insgesamt “durchlässiger”. Dadurch können permanent Neutrophile zwischen gingivalem Gewebe und gingivalem Spalt zirkulieren, ohne dass dieses erhöhte Aufkommen von Neutrophilen nur bei bakterieller Infektion vorzukommen scheint, wie es in anderen Körperregionen der Fall wäre. Diese Formation eines lokalen “Neutrophilen-Walls” wird möglich durch ein sehr spezifisch lokalisiertes Expressionsmuster von unter anderem Interleukin-8, Toll-like-Rezeptoren, Defensinen, Lipopolysaccharid-binding-protein und löslichem CD14 (Cluster of Differentiation) (Darveau, 2010).

Dieser Zustand kontrollierter Inflammation und immunologischer Homöostase kann dann vermittelt durch Schlüsselerreger durchbrochen werden. So können PG und *Treponema denticola* unter anderem die Interleukin-8-Sekretion-/Funktion hemmen. Das Fehlen eines Interleukin-8-Gradienten stört die lokalisierte Immunabwehr des gingivalen Epithels, was zur Enthemmung des bakteriellen Wachstums führt und die immunologische Reaktion weniger zielgerichtet stattfinden lässt (Darveau, 2010, Hajishengallis und Lamont, 2012).

1.2.5 Die Keystone-Hypothese oraler Dysbiose

Die Schlüsselrolle, die vor allem PG in der Pathophysiologie der Parodontitis einnehmen kann, wurde in der sogenannten Keystone-Hypothese festgehalten. Ein Keystone-Pathogen ist dabei ein Erreger, der nur in geringen Konzentrationen in einem mikrobiellen Ökosystem vorkommt, dort aber Mechanismen auslöst, die die Pathogenität der polymikrobiellen Gemeinschaft steigern. Der Gegenentwurf zu dieser Art der Pathogenität wäre ein dominanter Erreger, der andere Mikroorganismen verdrängt (Hajishengallis et al., 2012).

In diesem Szenario inhibiert PG zunächst Mechanismen der angeborenen Immunabwehr und enthemmt dadurch das Wachstum der Mikroorganismen im parodontalen Biofilm (Darveau, 2010). Dadurch kommt es zur initialen Verschiebung der mikrobiellen Gemeinschaft hin zu einem dysbiotischen Verband. Das unkontrollierte Wachstum löst eine zunehmend unkontrollierte, inflammatorische Immunreaktion aus, es kommt zur proteolytischen Gewebedestruktion, was zum einen die Mikroorganismen mit

Nährstoffen versorgt (unter anderem PG, der auf Häm-Eisen angewiesen ist (Olczak et al., 2005)) und zum anderen langfristig zum Parodontitis-typischen Verlust des parodontalen Gewebes führt (Hajishengallis et al., 2012).

Diese These wird durch eine Reihe von Tier-Experimenten gestützt: So induziert PG in Mäusen in Konzentrationen unter 0,01% zunächst eine dysbiotische Verschiebung des Mikrobioms, dem dann eine parodontale Entzündung und später Knochenabbau folgen (Hajishengallis et al., 2011).

Dabei ist dieser Prozess offenbar auch abhängig vom angeborenen Immunsystem und dem Synergismus der mikrobiellen Gemeinschaft: Weder in steril aufgezogenen “Germ-free mice”, noch in Mäusen defizient in Rezeptoren des Komplementsystems kann PG alleine eine Parodontitis auslösen (Hajishengallis et al., 2011).

1.2.6 Die Pathobionten-Hypothese

Eine weitere Hypothese, die sich mit der Rolle von PG in der Pathophysiologie der Parodontitis auseinandersetzt, ist die Pathobionten-Hypothese. Als Pathobiont werden dabei Mikroorganismen mit pathogenem Potential bezeichnet, die aber auch in der gesunden Bevölkerung zu finden sind, ohne dass sie dort pathologische Prozesse auslösen. In diesem Ruhezustand scheinen sie trotz ihres pathogenen Potentials nicht von mukosalen, dendritischen Zellen erkannt zu werden (Meghil und Cutler, 2020).

In diesem Szenario führt eine initiale Immunreaktion des angeborenen Immunsystems auf einen sich formierenden Biofilm dazu, dass PG “aufgeweckt” wird. Neben den zuvor genannten Mechanismen zum Unterlaufen der angeborenen Immunantwort kann das Bakterium in diesem “wachen” Zustand auch dendritische Zellen infizieren, in diesen der autophagischen Abwehr entgehen und die Apoptose seiner “Wirtszelle” hemmen. Dadurch steigt die Lebensdauer der dendritischen Zellen, die als Antigen-präsentierende Zellen nun eine unverhältnismäßige Reaktion des erworbenen Immunsystems begünstigen, was in zusätzlicher, inflammatorischer Destruktion resultiert (Meghil und Cutler, 2020). Diese Abhängigkeit von PG vom erworbenen Immunsystem konnte auch in CD4-T-Zell-defizienten Mäusen gezeigt werden, die nach oraler Infektion einen geringeren Knochenabbau als Kontrolltiere aufwiesen (Baker et al., 1999).

Die traditionelle Bedeutung von PG als Teil des Red complex (Hajishengallis und Lamont, 2012), seine Abhängigkeit von der mikrobiellen Gemeinschaft (Hajishengallis

et al., 2011) und dem Immunsystem (Baker et al., 1999, Hajishengallis et al., 2011), zusammen mit seinem Potential sowohl die angeborene (Darveau, 2010), als auch erworbene (Meghil und Cutler, 2020) Immunantwort zu dysregulieren machen dieses Bakterium zu einem potentiellen Schlüsselement bei der Entstehung oraler Dysbiose und potentiell assoziierter Erkrankungen.

1.3 Zusammenhänge zwischen oralen Pathologien, dem oralem Mikrobiom und der Alzheimer-Krankheit

1.3.1 Zusammenhänge zwischen Zahnverlust, Parodontalerkrankungen und der Alzheimer-Krankheit

Zahnverlust ist eine typische Folge unbehandelter Parodontitis bedingt durch den fortschreitenden Gewebeverlust (DG PARO, DGZMK, AWMF 2020). In Querschnittsstudien ist Zahnverlust dabei assoziiert mit kognitiver Einschränkung (Grabe et al., 2009, Naorungroj et al., 2013, Park et al., 2013, Ranjan et al., 2019, Takata et al., 2009) und Veränderungen der weißen Substanz (Minn et al., 2013), während longitudinale Arbeiten ein erhöhtes Risiko für kognitiven Abbau, Gedächtnisstörungen und Demenz zeigen (Batty et al., 2013, Kaye et al., 2010, Okamoto et al., 2015, Stein et al., 2007, Paganini-Hill et al., 2012, Reyes-Ortiz et al., 2013, Stewart et al., 2015, Takeuchi et al., 2017, Yamamoto et al., 2012, Yoo et al., 2019). Dabei kam zumindest eine Arbeit zu dem Schluss, dass dieser Zusammenhang bei der Alzheimer-Krankheit stärker ausgeprägt ist als bei vaskulärer Demenz (Takeuchi et al., 2017).

Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Arbeiten, die sich mit Parodontitis und der Alzheimer-Krankheit befassen: So weisen Parodontitis-Patienten ein höheres Risiko für späteren kognitiven Abbau, Demenz und Alzheimer auf (Chen et al., 2017, Choi et al., 2019, Iwasaki et al., 2019, Lee, Hu et al., 2017, Lee, Lee, Hu et al., 2017, Naorungroj et al., 2015). Ähnlich sieht es bei Probanden mit erhöhten Serum-Konzentrationen von Antikörpern gegen Parodontitis-Erreger aus, die ebenfalls ein gesteigertes Alzheimer-Risiko zeigen (Noble et al., 2014, Sparks-Stein et al., 2012). Auch bei bereits bestehender Diagnose konnte man zeigen, dass Patienten mit Alzheimer höhere Konzentrationen von Antikörpern aufwiesen als gesunde Kontrollen (Kamer et al., 2009). Andere Arbeiten konnten unabhängig von der kognitiven Leistung einen Zusammenhang zwischen der klinischen Parodontitis-Diagnose und der Aβ-

Konzentration im Blut (Gil-Montoya et al., 2017, Leira et al., 2020) und der A β -Last in der Bildgebung (Kamer et al., 2015) feststellen.

Dabei ist all diesen Ergebnissen gemeinsam, dass sie durch unterschiedliche Einflussfaktoren verzerrt werden können, da zum Beispiel Patienten mit Demenz eine schlechtere Mundhygiene zeigen (Marchini et al., 2019), während Parodontitis unter anderem als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen gilt (Sanz et al., 2020), die wiederum das Alzheimer-Risiko steigern (Gaugler et al., 2016).

1.3.2 *Porphyromonas gingivalis* und die Alzheimer-Krankheit

Neben einem allgemeinen Zusammenhang zwischen Parodontitis und der Alzheimer-Krankheit wird auch PG mit diesem Krankheitsbild in Verbindung gebracht. So konnte PG-DNA in Liquor und Saliva von Patienten mit kognitiver Einschränkung, wahrscheinlich zurückzuführen auf eine Demenz bei Alzheimer-Krankheit, nachgewiesen werden (Dominy et al., 2019).

Post-mortem konnte im Gehirn von Alzheimer-Patienten ebenfalls PG-DNA und darüber hinaus die PG-Protease Gingipain nachgewiesen werden. Deren immunhistochemischer Nachweis korrelierte mit dem Nachweis von Tau-Protein, das wiederum als Ziel der Proteolyse durch Gingipain identifiziert wurde (Dominy et al., 2019). Eine andere Arbeit konnte post-mortem PG-Lipopolysaccharide in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten, jedoch nicht bei gleich alten, gesunden Kontrollprobanden finden (Poole et al., 2013).

In Tier-experimentellen Studien konnte darüber hinaus wiederholt gezeigt werden, dass PG eine Alzheimer-typische Pathologie auslösen kann. Die Applikation von PG erfolgte dabei in den Mund (Ding et al., 2018, Dominy et al., 2019, Ilievski et al., 2018, Ishida et al., 2017, Poole et al., 2015) sowie intraperitoneal (Nie et al., 2019) und intrazerebral (Liu et al., 2017). Alternativ wurden PG-Lipopolysaccharide intraperitoneal (Wu et al., 2017), intrazerebroventrikulär (Hayashi et al., 2019) und periodontal (Qian et al., 2021) appliziert. Als Konsequenz kam es bei den Tieren zu kognitivem Abbau (Ding et al., 2018, Hayashi et al., 2019, Ishida et al., 2017, Qian et al., 2021, Wu et al., 2017), Anzeichen von Neurodegeneration (Dominy et al., 2019, Ilievski et al., 2018, Liu et al., 2017, Poole et al., 2015, Qian et al., 2021, Wu et al., 2017) und einer gesteigerten A β -Produktion (Ding et al., 2018, Dominy et al., 2019, Hayashi et al., 2019, Ishida et al., 2017, Nie et al., 2019, Qian et al., 2021).

Ein möglicher Kausalzusammenhang zwischen der Alzheimer-Krankheit und PG, beziehungsweise seiner Protease Gingipain wird außerdem durch Arbeiten zu einem möglichen therapeutischen Ansatz gestützt. Der small-molecule-Inhibitor COR388 ist ein oral bioverfügbarer, Blut-Hirn-Schranken-gängiger Inhibitor von Gingipain (Sabbagh und Decourt, 2022). Mäuse, denen oral PG appliziert wurde und die dann COR388 bekamen, zeigten eine geringere A β -Last und Neuroinflammation als unbehandelte Tiere (Dominy et al., 2019). Eine daraufhin durchgeführte Phase-1-Studie mit Alzheimer-Patienten und älteren, kognitiv gesunden Probanden kam zu dem Schluss, dass COR388 sicher ist und gut toleriert wird. Allerdings musste die folgende Phase-2-Studie aufgrund von hepatotoxischen Nebenwirkungen abgebrochen werden (Kaba et al., 2018, Sabbagh und Decourt, 2022).

Unabhängig von diesen Ergebnissen stellt sich darüber hinaus die Frage, wie eine mögliche Wirkung von PG, oder anderen oralen Mikroorganismen, auf die Pathologie der Alzheimer-Krankheit zu Stande kommen kann. Möglich wären hier zunächst indirekte Mechanismen, indem Parodontitis zum Beispiel eine systemische Entzündung fördert (Machado et al., 2021) und darüber Neuroinflammation (Teixeira et al., 2017), Störungen der Blut-Hirn-Schranke (Varatharaj und Galea, 2017), oder kardiometabolische Erkrankungen (Carrizales-Sepúlveda et al., 2018) begünstigt. Damit wäre allerdings der Nachweis verschiedener PG-Bestandteile im ZNS noch nicht hinreichend erklärt (Dominy et al., 2019, Poole et al., 2013).

Es ist wichtig zu betonen, dass bislang nur bakterielle Bestandteile, nicht aber das Bakterium selber im zentralen Nervensystem von Alzheimer-Patienten nachgewiesen wurden (Nara et al., 2021). Auch wenn mögliche Wege für einen direkten Bakterientransport postuliert wurden (Singhrao und Olsen, 2018), bleibt die Blut-Hirn-Schranke eine Hürde, die nicht selbstverständlich von einem Mikroorganismus überwunden werden kann (Nara et al., 2021, Singhrao und Olsen, 2018).

Aus diesem Grund wurde ein alternativer Erklärungsansatz postuliert, der die sogenannten “outer membrane vesicles” von PG in den Vordergrund rückt. Dabei handelt es sich um proteo-liposomale Strukturen, die sich von der Membran von PG ablösen und unter anderem Gingipain und andere Virulenzfaktoren, Lipopolysaccharide und genetisches Material enthalten (Nara et al., 2021). Diese Vesikel können von eukaryotischen Zielzellen aufgenommen werden, was bereits bei PG und anderen parodontalen Erregern demonstriert werden konnte (Choi et al., 2017). Auch wenn die

Bedeutung dieser Vesikel für die Pathogenität von Mikroorganismen erst seit relativ kurzer Zeit Beachtung findet (Nara et al., 2021), bieten sie doch einen attraktiven Erklärungsansatz für den Einfluss von PG auf die Alzheimer-Krankheit, da sie durch die enthaltenen Virulenzfaktoren viel von seinem pathogenen Potential beinhalten und dank ihrer Größe im Nanometer-Bereich deutlich wahrscheinlicher die Blut-Hirn-Schranke passieren könnten (Elashiry et al., 2024, Singhrao und Olsen, 2018). Im Tierexperiment konnte man bereits zeigen, dass PG-Vesikel nach oraler Gabe Gedächtnisstörungen, Neuroinflammation und Tau-Phosphorylierung auslösen. Außerdem konnte man mittels konfokaler Mikroskopie und fluoreszent markierter Vesikel visuell nachweisen, dass die Vesikel bis ins ZNS der Tiere gelangen (Gong et al., 2022).

1.3.3 Orale Dysbiose in Alzheimer-Patienten

Mindestens 24 klinische Studien haben sich bereits mit dem oralen Mikrobiom bei Demenz, beziehungsweise kognitivem Abbau auseinandergesetzt (Bathini et al., 2020, Chen, Cao et al., 2022, Chen, Wang et al., 2022, Chen, Xu et al., 2022, Chen et al., 2023, Cirstea et al., 2022, Cockburn et al., 2012, Da et al., 2023, Fogelholm et al., 2023, Fu et al., 2022, Guo, Li et al., 2023, Holmer et al., 2021, Issilbayeva et al., 2024, Lin et al., 2024, Liu et al., 2019, Na et al., 2024, Panzarella et al., 2022, Qiu et al., 2024, Tadjoeidin et al. 2022, Taati Moghadam et al., 2022, Troci et al., 2024, Wu et al., 2021, Yang, Tao et al., 2021, Yang et al., 2023). Da unsere Arbeitsgruppe erst kürzlich die Mehrzahl der genannten Studien in einem systematischen Review beleuchtet hat (Weber et al., 2023), sollen an dieser Stelle nur die wichtigsten Aspekte erwähnt werden:

23 Arbeiten hatten ein Querschnittsdesign, bei dem Patienten mit MCI (Da et al., 2023), einer allgemeinen Demenz (Chen et al., 2023, Cockburn et al., 2012), einer Demenz bei Alzheimer-Krankheit (Bathini et al., 2020, Chen, Wang et al., 2022, Chen, Xu et al., 2022, Cirstea et al., 2022, Fogelholm et al., 2023, Fu et al., 2022, Guo, Li et al., 2023, Holmer et al. 2021, Issilbayeva et al., 2024, Liu et al., 2019, Na et al., 2024, Panzarella et al., 2022, Qiu et al., 2024, Taati Moghadam et al., 2022, Troci et al., 2024, Wu et al., 2021, Yang, Tao et al., 2021, Yang et al., 2023), oder kognitiver Einschränkung (Lin et al., 2024, Tadjoeidin et al., 2022) mit gesunden Kontroll-Probanden und zum Teil einer weiteren Gruppe von Probanden mit milder Demenz bei Alzheimer-Krankheit (Chen, Xu et al., 2022), MCI (Bathini et al., 2020, Chen et al., 2023, Fogelholm et al., 2023, Holmer et al., 2021, Panzarella et al., 2022, Qiu et al., 2024, Troci et al., 2024, Wu et al., 2021), oder subjektivem, kognitivem Abbau (Chen et al., 2023, Fogelholm et al.,

2023, Holmer et al., 2021, Wu et al., 2021), verglichen wurden. Eine Arbeit verglich außerdem Alzheimer-Patienten mit unterschiedlichem Essverhalten, an Stelle einer Kontrollgruppe (Chen, Wang et al., 2022) und eine Arbeit untersuchte longitudinal das orale Mikrobiom von Alzheimer-Patienten vor und nach einer mehrwöchigen Mundpflege-Intervention (Chen, Chao et al., 2022).

Die klinische Diagnostik erfolgte in der Regel mittels MMST, einmal mit Varianten des CERAD (Lin et al., 2024), dreimal mittels Montreal cognitive Assessment Test (MoCA) (Chen et al., 2023, Qiu et al., 2024, Troci et al., 2024) und in drei Fällen zusätzlich mit Hilfe kranialer Bildgebung (Chen, Xu et al., 2022, Na et al., 2024, Taati Moghadam et al., 2022,). Das Probenmaterial variierte zwischen Saliva (Bathini et al., 2020, Da et al., 2023, Fu et al., 2022, Guo, Li et al., 2023, Issilbayeva et al., 2024, Liu et al., 2019, Yang, Tao et al., 2021, Yang et al., 2023), subgingivalen Proben (Chen, Cao et al., 2022, Chen, Wang et al., 2022, Chen, Xu et al., 2022, Chen et al., 2023, Cockburn et al., 2012, Fogelholm et al., 2023, Holmer et al., 2021, Issilbayeva et al., 2024, Na et al., 2024, Panzarella et al., 2022, Qiu et al., 2024, Taati Moghadam et al., 2022, Tadjoeidin et al., 2022), supragingivalen Proben (Chen, Cao et al., 2022, Holmer et al., 2021, Issilbayeva et al., 2024, Na et al., 2024, Taati Moghadam et al., 2022, Wu et al., 2021), zusätzlichen Stuhlproben (Chen, Wang et al., 2022, Chen, Xu et al., 2022, Cirstea et al., 2022, Troci et al., 2024), Gingivalflüssigkeit (Guo, Li et al., 2023), buccalen (Issilbayeva et al., 2024, Taati Moghadam et al. 2022, Na et al., 2024, Troci et al., 2024) lingualen Proben (Issilbayeva et al., 2024, Taati Moghadam et al., 2022) und Proben von der Zahnoberfläche (Taati Moghadam et al., 2022). Lin et al. verwendeten außerdem eine Mundspülung (Lin et al., 2024), während Issilbayeva et al. zusätzlich Abstriche von Gingiva, Gaumen, Tonsillen und Rachen einsetzten (Issilbayeva et al. 2024).

Alle Arbeiten außer Guo, Li et al., Wu et al., Panzarella et al., Qiu et al. und Taati Moghadam et al. nutzten Methoden zur Sequenzierung einzelner variabler Regionen des 16S-rRNA-Gens. Panzarella et al. und Taati Moghadam et al. führten stattdessen eine quantitative Real-time-PCR auf parodontale Pathogene durch, weswegen ihre Arbeiten nur begrenzt im Kontext des oralen Mikrobioms Berücksichtigung finden können (Panzarella et al., 2022, Taati Moghadam et al., 2022). Guo, Li et al., Wu et al. und Qiu et al. führten eine Full-Length-Sequenzierung der variablen Regionen V1 bis V9 mit Hilfe einer PacBio-Sequenzierungs-Plattform durch (Guo, Li et al., 2023, Qiu et al.,

2024, Wu et al., 2021), während die verbleibenden Arbeiten auf einer Illumina-Sequenzierungs-Plattform und den variablen Regionen V3 und V4, beziehungsweise nur V4 (Lin et al., 2024), oder V1 und V2 (Troci et al., 2024) basieren.

Alle genannten Arbeiten konnten signifikante Unterschiede im oralen Mikrobiom zwischen den verschiedenen Gruppen finden. Die Ergebnisse sind dabei jedoch teils widersprüchlich. Bezogen auf die Alpha-Diversität wurden sowohl eine höhere (Cirstea et al., 2022, Fogelholm et al., 2023, Holmer et al., 2021, Issilbayeva et al., 2024, Lin et al., 2024, Na et al., 2024), als auch eine niedrigere (Chen, Xu et al., 2022, Chen et al., 2023, Da et al., 2023, Liu et al., 2019, Wu et al., 2021, Yang, Tao et al., 2021) Diversität bei den Fällen, oder auch gar kein Unterschied (Cockburn et al., 2012, Bathini et al., 2020, Fu et al., 2022, Qiu et al., 2024, Tadjoeidin et al. 2022, Troci et al., 2024, Yang et al., 2023) dokumentiert. Bei der Beta-Diversität identifizierten alle Arbeiten Unterschiede auf verschiedensten taxonomischen Ebenen. Die Ergebnisse sind allerdings auch hier nicht einheitlich, wobei zum Beispiel auf Speziesebene orale Pathogene und vor allem PG in zum Teil höherer (Chen et al., 2023, Cirstea et al., 2022, Fu et al., 2022, Guo, Li et al., 2023, Holmer et al., 2021, Na et al., 2024, Panzarella et al., 2022, Taati Moghadam et al., 2022, Tadjoeidin et al., 2022, Troci et al., 2024) und niedrigerer (Bathini et al., 2020, Fu et al., 2022, Issilbayeva et al., 2024) Abundanz zu finden waren. Yang et al. konnten außerdem in einer parallelen metabolischen Analyse des Speichels signifikante Unterschiede im metabolischen Profil von Alzheimer-Patienten und Kontrollen identifizieren (Yang et al., 2023).

Mögliche Erklärungen für diese Heterogenität der Ergebnisse umfassen unter anderem die sehr unterschiedlichen Methoden und Lokalisationen der Probenentnahme im Mund und die uneinheitliche Differenzierung zwischen frühen und fortgeschrittenen Fällen von Demenz, wodurch potentiell Veränderungen zu sehr unterschiedlichen Zeitpunkten der Pathogenese verglichen werden. So konnten zum Beispiel Bathini et al. durch Differenzierung von Patienten mit MCI und Demenz bei Alzheimer-Krankheit und einer zusätzlichen Unterdifferenzierung anhand der olfaktorischen Dysfunktion (einem typischen Frühzeichen der Alzheimer-Krankheit (Kotecha et al., 2018)) eine stufenweise Veränderung des oralen Mikrobioms feststellen (Bathini et al., 2020). Hinzu kommt eine große Zahl unterschiedlicher Methoden der differentiellen Abundanzanalyse, die alle mit einem teils sehr variablen Risiko Falsch-positiver

Ergebnisse einhergehen und bekanntermaßen sehr unterschiedliche Ergebnisse erzielen (Nearing et al., 2022).

Dabei hat keine der genannten Arbeiten den Ansatz verfolgt, durch Kombination unterschiedlicher Sequenzierungsmethoden einige der Nachteile der unterschiedlichen Sequenzierungsmethoden auszugleichen und die Robustheit der Ergebnisse durch zusätzliche Hierarchisierung der Ergebnisse zu verbessern, was zu den Zielen der vorliegenden Arbeit führt.

1.4 Ziele der Arbeit

Mit dieser Arbeit sollen mehrere Fragen beantwortet werden, die sich im Kern darum drehen, ob das orale Mikrobiom die Entstehung und/oder das Fortschreiten der Alzheimer-Krankheit beeinflusst:

1. Unterscheidet sich das orale Mikrobiom von Alzheimer-Patienten von kognitiv gesunden Kontrollprobanden aus demselben Haushalt?
2. Lässt sich mittels Whole-Genome-Sequenzierung ein besseres Verständnis eines potentiellen Zusammenhangs zwischen dem oralen Mikrobiom und der Alzheimer-Krankheit schaffen als mit einer 16S rRNA-Sequenzierung?
3. Unterscheiden sich die Ergebnisse einer 16S rRNA-Sequenzierung der variablen Regionen V3 und V4 auf einer Illumina-Plattform von einer Sequenzierung der Regionen V1 bis V9 auf einer Oxford-Nanopore-Plattform?
4. Lassen sich als differentiell abundant identifizierte Taxa besser in einen biologischen Kontext einordnen, wenn man die Ergebnisse verschiedener Sequenzierungsplattformen kombiniert und die Taxa nach der Häufigkeit der Identifikation hierarchisiert?

2 Material und Methoden

2.1 Materialübersicht und Ablauf

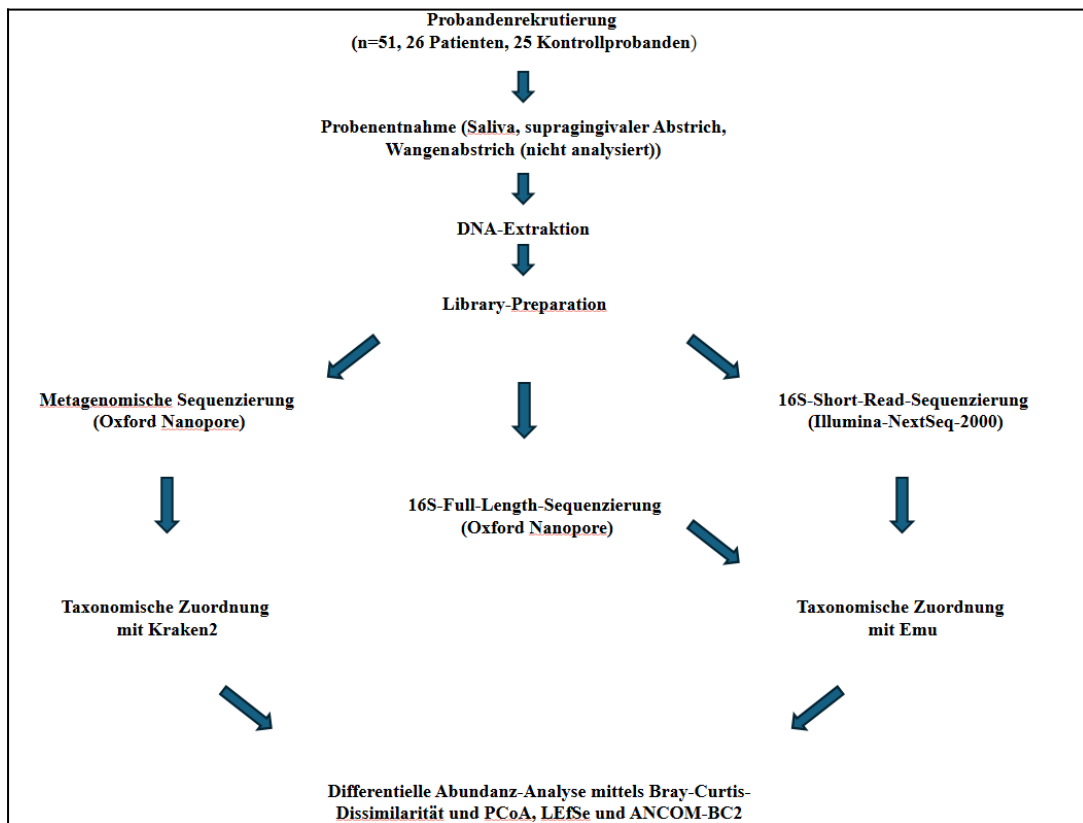
Tabelle 1 *Material*

Material	Produktdetails
70% Ethanol-Lösung	70mL 100% Ethanol mit 30mL Nuclease-freiem Wasser
96-Well-Platte	
Digital Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc.; Artikelnummer: 6240599
DNA/RNA Shield Collection Tube w/ Swab	Zymo Research; Artikelnummer: R1109
DNA/RNA Shield SafeCollect Saliva Collection Kit	Zymo Research; Artikelnummer: R1211
Eppendorf Kühlzentrifuge	Eppendorf AG; Eppendorf 5417 R Kühlzentrifuge; Modell: 5407
Eppendorf-Tubes (1,5mL)	Eppendorf AG; DNA LoBind Tubes; Katalog-Nummer: 0030108051
Flow Cell (R9.4.1)	Oxford Nanopore Technologies; FLO-MIN106D
Flow Cell (R10.4.1)	Oxford Nanopore Technologies; FLO-MIN114
Hula-Mixer	Thermo Fisher Scientific; Artikelnummer: 15920D
Magnet-Rack	
MinION Sequenziergerät	Oxford Nanopore Technologies; MIN-101B
Nuclease-freies Wasser	Thermo Fisher Scientific, Invitrogen; Artikelnummer: AM9937
PCR-Cycler	Bio-Rad Laboratories; Bio-Rad C1000 Touch PCR Thermal Cycler With Dual 48/48 Fast Reaction Module; Artikelnummer: 1851148
PCR-Tube (0,2mL)	
Pipetten (1-1000µL)	
Pipettenspitzen (1-1000µL)	
Qubit 3.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific, Invitrogen; Artikelnummer: Q33216
Qubit-Assay-Tube	Thermo Fisher Scientific, Invitrogen; Artikelnummer: Q32856
Sammel-Tube (2mL)	
Thermocycler	Eppendorf AG; Eppendorf 5332 Mastercycler
Tisch-Zentrifuge	VWR Mini-Star Centrifuge; VWR International; Artikelnummer: 05533
Tris-HCl-NaCl-Lösung	
Vortex-Mixer	VWR International; VWR Collection Reax Vortex Mixer; Artikelnummer: 444-1378
WHO-Parodontalsonde	

Tabelle 2 Laborkits mit Bestandteilen

Labor-Kits mit zu ergänzendem Material	Produktdetails
16S Barcoding Kit 1-24	Oxford Nanopore Technologies; Artikelnummer: SQK-16S024
- AMPure XP Beads	
- Flush-Buffer	
- Flush-Tether	
- Loading Beads	
- Primer	
- Rapid Adapter	
- Sequencing Buffer	
LongAMP Hot Start Taq 2X Master Mix	New England Biolabs; Artikelnummer: M0533S
Qubit 1X dsDNA Assay-Kit	Thermo Fisher Scientific, Invitrogen; Artikelnummer: Q33230
- Qubit 1X dsDNA HS Working Lösung (High Sensitivity)	
Sequencing gDNA – native barcoding Kit	Oxford Nanopore Technologies; Artikelnummer: SQK-NBD112.24
- Adapter Mix II HC (Native Adapter)	
- AMPure XP Beads	
- EDTA	
- Elution-Buffer	
- Flow Cell Flush-Buffer	
- Flow Cell Flush-Tether	
- Loading Beads II (Library Beads)	
- Native Barcodes	
- Sequencing Buffer II	
- Short-Fragment-Buffer	
NEB Blunt/TA Ligase Master Mix	New England Biolabs; Artikelnummer: M0367S
NEBNext FFPE DNA Repair Mix and Buffer	New England Biolabs; Artikelnummer: M6630S
NEBNext Quick Ligation Module	New England Biolabs; Artikelnummer: E6056S
- NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer	
- Quick T4 DNA Ligase	
NEBNext Ultra II End Repair/dA-Tailing Module	New England Biolabs; Artikelnummer: E7546S
- Ultra II End-prep enzyme Mix	
- Ultra II End-prep reaction Buffer	
ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit	Zymo Research; Artikelnummer: R2002
- DNA/RNA-Lysis-Buffer	
- DNA/RNA-Prep-Buffer	
- DNA/RNA-Wash-Buffer	24mL DNA/RNA-Wash-Buffer-Concentrate in 96mL 100% Ethanol
- DNase/RNase-freies Wasser	
- HRC-Prep-Solution	
- Spin-Away-Filter	

- Zymo-Spin-III-HRC-Filter	
BashingBead-Lysis-Tubes	Zymo Research; Artikelnummer: S6003-50



Figur 1 Schematische Darstellung der verschiedenen Arbeitsschritte von der Probandenrekrutierung bis zur Datenanalyse.

2.2 Probandenrekrutierung, Einschlusskriterien und Basisdaten

Die vorliegende Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität genehmigt (Nr.: 2020-1155_1). Die Rekrutierung der Probanden erfolgte zwischen Juni 2021 und März 2023 über die “Gedächtnissprechstunde” der gerontopsychiatrischen Institutsambulanz im Tagesklinik und Ambulanzzentrum auf dem Gelände des Universitätsklinikums Düsseldorf (Gebäude 14.99). Potentielle Probanden wurden dort, sowie teilweise über das LVR-Klinikum (Landschaftsverband Rheinland) Düsseldorf über die Möglichkeit einer Studien-Teilnahme informiert. Bei Interesse erfolgte ein Aufklärungsgespräch mit Aushändigung schriftlicher Informationen (siehe 8.1 Einwilligungsbogen und 8.2 Merkblatt). Mit einem Abstand von mindestens 24 Stunden zum Aufklärungsgespräch wurde ein Untersuchungstermin in der gerontopsychiatrischen Institutsambulanz vereinbart.

Geeignete Probanden für die Fallgruppe waren mindestens 50 Jahre alt und hatten eine sowohl klinisch diagnostizierte, als auch biochemisch mittels Liquor-Untersuchung bestätigte Demenz bei Alzheimer-Krankheit, entsprechend den Empfehlungen des NIA-AA (McKhann et al., 2011). Die Liquor-Untersuchung wurde dabei nicht von uns durchgeführt, sondern hatte als Teil der Demenz-Diagnostik der Patienten im Vorfeld stattgefunden. Der Befund wurde uns schriftlich übermittelt.

Darüber hinaus litten die Probanden unter keiner anderen neurologischen, oder psychiatrischen Erkrankung einschließlich Schlaganfall, Multipler Sklerose, Parkinson-Erkrankung, Epilepsie, Schizophrenie und Abhängigkeitserkrankung, sowie keiner infektiösen Erkrankung von Mundraum und oberen Atemwegen. Als Kontrollprobanden wurden fast ausschließlich die Lebenspartner rekrutiert. Diese wurden im Rahmen des Aufklärungsgesprächs mittels MMST auf das Nicht-Vorliegen eines kognitiven Defizits geprüft (definiert als eine Punktwertung über 27 Punkten). Eine Liquor-Untersuchung der Kontrollprobanden fand nicht statt, ansonsten mussten sie dieselben Einschlusskriterien erfüllen wie die Probanden der Fallgruppe.

Weitere Basisdaten, die mit erhoben wurden, umfassten Gewicht, Größe, Body-Mass-Index (BMI), Ausbildungsjahre, Vorerkrankungen, Nikotin- und Alkoholkonsum, Medikation und das Tragen einer Gebissprothese (siehe 8.3 Checkliste).

Alle Patienteninformationen und Proben wurden nach der schriftlichen Einwilligung der Probanden pseudonymisiert. Alle Probanden erhielten nach Untersuchung eine Aufwandsentschädigung in Höhe von 40,00€, die Auszahlung wurde schriftlich quittiert. Der Pseudonymisierungsschlüssel wird zusammen mit Einwilligungsbogen, Checklisten und Quittungen in der gerontopsychiatrischen Institutsambulanz für mindestens zehn Jahre aufbewahrt.

2.3 Evaluierung der Mundhygiene und Erhebung des Mundstatus

Zum Untersuchungszeitpunkt sollten die Probanden zwei Stunden zuvor nichts gegessen, getrunken, die Zähne geputzt, Zahnseide, oder Mundwasser benutzt, Kaugummis, oder Halsbonbons konsumiert haben. Über diese Voraussetzung waren sie zuvor im Aufklärungsgespräch informiert worden. Beim Untersuchungstermin wurde zunächst das Einhalten dieser Voraussetzung erfragt und dann die korrekte Dokumentation der Einschlusskriterien und Basisdaten erneut geprüft (siehe 8.3 Checkliste).

Anschließend erfolgte eine Anamnese auf die zahnmedizinische Patientenhistorie und Maßnahmen der Mundhygiene (siehe 8.4 Dokumentationsbogen). Mit Rücksicht auf die dementielle Grunderkrankung der Probanden aus der Fallgruppe erfolgte die Anamnese in Anwesenheit des Kontrollprobanden und in den meisten Fällen Lebenspartners.

Anschließend erfolgte die Entnahme von Proben für weiterführende mikrobiologische und biochemische Untersuchungen, geschildert unter 2.3 Probenentnahme, -transport und -lagerung. Der Untersuchungstermin wurde abgeschlossen mit einer rudimentären Evaluation des Mundstatus der Probanden. Diese umfasste eine Zählung der vorhandenen Zähne, sowie eine Erhebung des modifizierten Sulkus-Blutungs-Index (SBI). Für die Untersuchung wurde sterilisiertes Untersuchungsmaterial in Form einer WHO-Parodontalsonde (World Health Organization) und eines zahnärztlichen Untersuchungsspiegels vom Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde des Universitätsklinikums Düsseldorf (Gebäude 18.13) zur Verfügung gestellt.

Die Erhebung der numerischen Anzahl der Zähne erfolgte nach dem international anerkannten Schema der Fédération Dentaire Internationale (FDI) (Turp und Alt, 1995). Der modifizierte Sulkus-Blutungs-Index nach Lange dient der objektiven Untersuchung des gingivalen Gewebes auf das Vorliegen einer Blutung als Ausdruck einer Entzündung. Er ist dabei als orientierende Untersuchung auf das Vorliegen parodontaler

Erkrankungen und Entzündung zu verstehen und dient nicht zur differenzierten Diagnostik (Newbrun, 1996).

Zur Erhebung des Index wird der Zahnfleisch-Sulkus in den Quadranten 1 und 3 buccal und den Quadranten 2 und 4 oral schonend mit einer WHO-Parodontal-Sonde ausgestrichen. Anschließend werden 30 Sekunden abgewartet, um dann zu zählen, an wie vielen Zähnen es zu Blutungen kommt. Es wird ein Quotient aus der Zahl der Blutungspunkte und der Gesamtsumme der Messpunkte gebildet und dieser mit 100 multipliziert. Das Ergebnis wird als Prozentwert interpretiert und anhand von vier Schweregraden eingeordnet (Lange et al., 1977):

- Grad 1: 0-10%, klinische Normalität der äußeren Gingivaanteile
- Grad 2: 10-20%, schwächere Zahnfleischentzündung
- Grad 3: 20-50%, mittlere Zahnfleischentzündung
- Grad 4: 50-100%, starke und generalisierte Zahnfleischentzündung (Lange et al., 1977)

Zahnanzahl und SBI-Ergebnis wurden gemeinsam mit den anamnestischen Angaben zur zahnmedizinischen Patientenhistorie und Mundhygiene dokumentiert (siehe 8.4 Dokumentationsbogen).

2.4 Probenentnahme, -transport und -lagerung

Im Rahmen der Untersuchung wurden von jedem Probanden insgesamt vier Proben entnommen: Ein buccaler Abstrich, ein supragingivaler Abstrich und zwei Saliva-Proben (eine Saliva-Probe wurde für eine optionale spätere Untersuchung bei -20°C eingelagert; die entsprechende Untersuchung ist dabei nicht Gegenstand dieser Arbeit).

Anhand der bisherigen Studien im Kontext von oralem Mikrobiom und der Alzheimer-Krankheit kann kein einheitlicher, oder “idealer” Entnahmeort identifiziert werden (Weber et al., 2023). Aus diesem Grund haben wir Methoden zur Probenentnahme gewählt, die zum Beispiel im Vergleich zur subgingivalen Probenentnahme (Chen, Cao et al., 2022, Chen, Wang et al., 2022, Chen, Xu et al., 2022, Cockburn et al., 2012, Holmer et al., 2021, Taati Moghadam et al., 2022, Tadjoeidin et al., 2022) eine weniger präzise Handhabung und dadurch potentiell eine bessere Reproduzierbarkeit aufweisen.

Für die mikrobiologischen Proben wurde Material der Firma Zymo Research für die Entnahme und anschließende Stabilisierung von genetischem Material zur

mikrobiologischen Analyse genutzt (Abstrich: DNA/RNA Shield Collection Tube w/ Swab, Artikelnummer: R1109; Saliva-Entnahme-Hilfe: DNA/RNA Shield SafeCollect Saliva Collection Kit, Artikelnummer: R1211). Zu jedem Abstrich und jeder Saliva-Entnahme-Hilfe gehört dabei ein vorgefertigtes Gefäß mit einer Nukleinsäure-stabilisierenden DNA/RNA Shield-Lösung für die Probenaufbewahrung bei Raumtemperatur.

Der buccale Abstrich erfolgte an der rechten Wangeninnenseite, der supragingivale Abstrich am ersten Molar des rechten Unterkiefers oberhalb des Zahnfleischrandes. In beiden Fällen wurde der Tupfer für mehrere Sekunden und unter vorsichtigem Drehen um die Längsachse an der jeweiligen Oberfläche gerieben. Anschließend wurden die Abstriche in das zugehörige Gefäß mit DNA/RNA Shield-Lösung eingeführt, an der Sollbruchstelle abgebrochen und das Gefäß verschlossen.

Zur Entnahme der Saliva-Proben wurden die Probanden aufgefordert, Speichel im Mund zu sammeln und anschließend mit Hilfe des dafür vorgesehenen Mundstücks an der Saliva-Entnahme-Hilfe abzugeben. Dieser Vorgang wurde in der Regel mehrfach wiederholt, bis genug Material vorhanden war (den Anweisungen des Herstellers entsprechend etwa 2mL). Anschließend wurde das Gefäß mit dem Saliva mit DNA/RNA Shield-Lösung aufgefüllt. Die mikrobiologischen Proben konnten den Empfehlungen des Herstellers entsprechend anschließend bei Raumtemperatur gelagert werden.

Ein Patient war dabei nicht dazu in der Lage, ausreichend Speichel zu sammeln, weswegen jeweils 51 Abstriche und 50 salivare Proben im weiteren Verlauf zur Verfügung standen.

2.5 Mikrobiom-Analysen

2.5.1 DNA-Extraktion und Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Extraktion der DNA für alle späteren Sequenzierungen wurde das ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit (Artikelnummer: R2002) der Firma Zymo Research den Anweisungen des Herstellers folgend genutzt. Das Kit dient der Lysierung von Mikroorganismen mittels Zymo-Spin-Column-Technologie und Aufreinigung von DNA/RNA aus verschiedensten Probenmaterialien zur taxonomischen und/oder metagenomischen Analyse. Der Prozess basiert dabei auf einer mechanischen und

chemischen Lyse mit mehreren, sich anschließenden Filterungsschritten. Wenn nicht abweichend beschrieben fanden Inkubationsschritte bei Raumtemperatur statt.

Dem Protokoll entsprechend war im Vorfeld DNA/RNA-Wash-Buffer angesetzt worden, indem 96mL 100% Ethanol mit 24mL DNA/RNA-Wash-Buffer-Concentrate (ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit) gemischt worden waren.

Die Proben wurden zunächst einzeln für jeweils 5 Sekunden auf einem Vortex Mixer (VWR International; VWR Collection Reax Vortex Mixer; Artikelnummer: 444-1378) gemischt. Anschließend wurde je 1mL Probe in ein Eppendorf-Tube (Eppendorf AG; DNA LoBind Tubes; Katalog-Nummer: 0030108051) gegeben und bei 21°C und 10000rpm (revolutions per minute) in einer Eppendorf Kühlzentrifuge (Eppendorf AG; Eppendorf 5417 R Kühlzentrifuge; Modell: 5407) zentrifugiert. Anschließend wurden vorsichtig 300µL Überstand entnommen und verworfen und die verbleibenden 700µL in BashingBead-Lysis-Tubes (Zymo Research; Artikelnummer: S6003-50) gegeben und auf einem Digital Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Inc.; Artikelnummer: 6240599) auf höchster Umdrehungszahl für 30 Minuten lysiert. Die in den BashingBead-Lysis-Tubes enthaltenen Beads vermitteln dabei eine mechanische Lyse der Proben. Anschließend wurden die Tubes zunächst 10 Minuten stehen gelassen, damit sich der Inhalt absetzt.

Pro Probe wurden anschließend zunächst 800µL DNA/RNA-Lysis-Buffer (ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit) in ein neues Eppendorf-Tube vorgelegt und dann 400µL des Überstands der Probe zugegeben. Anschließend wurden die Proben 5 Sekunden auf dem Vortex Mixer gemischt.

Pro Probe wurde ein Spin-Away-Filter (ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit) in eine Sammel-Tube gesetzt. Darauf wurden 600µL des Proben-Gemischs gegeben. Anschließend wurden die Proben in einer Eppendorf Kühlzentrifuge bei 21°C und 14000rpm für 30 Sekunden zentrifugiert. Die abgefilterte Flüssigkeit wurde verworfen und der Vorgang mit den verbleibenden 600µL Proben-Gemisch wiederholt.

Auf den Filter im Sammel-Tube wurden anschließend 400µL DNA/RNA-Prep-Buffer (ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit) gegeben, die Proben analog zum vorangegangenen Schritt zentrifugiert und die Flüssigkeit verworfen. Dieser Vorgang wurde anschließend mit 700µL DNA/RNA-Wash-Buffer wiederholt.

In einem letzten Waschschrift wurden 400µL DNA/RNA-Wash-Buffer auf den Filter gegeben und die Proben für 2 Minuten bei ansonsten unveränderter Einstellung zentrifugiert. Die Filter wurden anschließend in ein neues Eppendorf-Tube umgesetzt.

Danach wurden zweimal 25µL DNase/RNase-freies Wasser (ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit) vorsichtig auf den Filter gegeben, jeweils 5 Minuten gewartet und dann erneut für 30 Sekunden bei 21°C und 14000rpm zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde dabei aufgehoben und die Filter nach dem zweiten Zentrifugationsschritt verworfen, sodass 50µL Probe in einem Eppendorf verblieben.

In eine zweite Sammel-Tube wurden Zymo-Spin-III-HRC-Filter (Hardness Rockwell; (ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit) gesetzt, 600µL HRC-Prep-Solution (ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit) darauf gegeben und die Tubes in der Eppendorf Kühlzentrifuge bei 21°C und 8600rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde anschließend verworfen und die insgesamt 50µL Probe aus dem vorangegangenen Schritt in den Zymo-Spin-III-HRC-Filter gegeben. Die Proben wurden erneut in der Eppendorf Kühlzentrifuge bei 21°C und 12300rpm für 3 Minuten zentrifugiert und die Filter anschließend verworfen.

Anschließend wurde die DNA-Konzentration mit einem Qubit 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific; Artikelnummer: Q33216) und dem Qubit 1X dsDNA Assay-Kit mit hoher Empfindlichkeit (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen; Artikelnummer: Q33230) (double stranded DNA) bestimmt. Dazu wurde 1µL Probenvolumen in 199µL Qubit 1X dsDNA HS Working Lösung (High Sensitivity) in ein Qubit-Assay-Tube (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen; Artikelnummer: Q32856) gegeben und anschließend die Konzentration doppelsträngiger DNA im High-Sensitivity-Modus bestimmt. Die DNA-Konzentrationen wurden für die weiterführende Probenverarbeitung notiert.

Die extrahierten und quantifizierten Proben wurden in Eppendorf-Tubes bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Die ermittelten DNA-Konzentrationen der Wangenabstriche erwiesen sich dabei als zu gering, um für mehrere Sequenzierungsmethoden herangezogen zu werden, weswegen sie für die weiterführenden Arbeitsschritte nicht mehr genutzt wurden.

2.5.2 Oxford-Nanopore-Sequenzierungen

2.5.2.1 Metagenomische Sequenzierung

Zur Library Preparation für die metagenomische Sequenzierung wurde das Ligation Sequencing gDNA – native barcoding Kit (Oxford Nanopore Technologies; Artikelnummer: SQK-NBD112.24) (genomic DNA) den Anweisungen des Herstellers entsprechend genutzt. In diesem Protokoll wird zuvor extrahierte genomische DNA zunächst endrepariert, um dann am 3'-Ende ein Adenin anzuhängen (dA-Tailing), was die Ligation individueller Barcode-Sequenzen zur späteren Probenzuordnung erlaubt. Anschließend erfolgen diverse Reinigungsschritte mit Hilfe magnetischer Beads und die Proben werden gepoolt, um zuletzt Sequenzierungs-Adapter zu ligieren, die in der Flow Cell die Bindung an die namensgebende Pore ermöglichen.

Das Kit erlaubt das Barcoding und Poolen von bis zu 24 Proben in einem Sequenzierungslauf. Wenn nicht abweichend beschrieben fanden Inkubationsschritte bei Raumtemperatur statt.

Ausgangsmaterial waren jeweils 1000ng, beziehungsweise 400ng DNA in DNase/RNase-freiem Wasser aus den in 2.4.1 extrahierten Proben, abhängig davon, ob bis zu 4, oder mehr als 4 Proben sequenziert wurden. Die Bestimmung des benötigten Volumens erfolgte nach folgender Berechnung:

$$1000\text{ng/Probenkonzentration (ng/}\mu\text{L)} = \text{Für Sequenzierung eingesetztes Volumen (}\mu\text{L)}$$

Das für die Sequenzierung eingesetzte Volumen wurde mit Nuclease-freiem Wasser (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen; Artikelnummer: AM9937) auf 48 μ L aufgefüllt. Die Proben wurden jeweils in einer 0,2mL PCR-Tube mit 3,5 μ L NEBNext FFPE DNA Repair Buffer (New England Biolabs; Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded; New England Biolabs; Artikelnummer: M6630S), 3,5 μ L Ultra II End-prep reaction Buffer (NEBNext Ultra II End Repair/dA-Tailing Module; New England Biolabs; Artikelnummer: E7546S), 2 μ L NEBNext FFPE DNA Repair Mix (New England Biolabs; Artikelnummer: M6630S) und 3 μ L Ultra II End-prep enzyme Mix (NEBNext Ultra II End Repair/dA-Tailing Module; New England Biolabs; Artikelnummer: E7546S) vermischt und mehrfach resuspendiert. NEBNext FFPE DNA Repair Buffer und Ultra II End-prep reaction Buffer wurden zuvor auf einem Vortex-Mixer gemischt. Anschließend wurden die Proben geschlossen in einem Thermocycler (Eppendorf 5332 Mastercycler) für 10 Minuten inkubiert, 5 Minuten bei 20°C, dann 5 Minuten bei 65°C.

Die Proben wurden anschließend in je ein Eppendorf-Tube gegeben. Auf Raumtemperatur gebrachte AMPure XP Beads (Automated Purification and Cleanup; Ligation Sequencing gDNA – native barcoding Kit) wurden auf einem Vortex-Mixer gemischt, 60µL zu den Proben gegeben und die Proben anschließend beschnippst und in einem Hula-Mixer (Thermo Fisher Scientific, Artikelnummer: 15920D) für 5 Minuten gemischt. Die AMPure XP Beads wurden im weiteren Verlauf vor jeder Anwendung erneut auf einem Vortex-Mixer gemischt. Anschließend kamen die Tubes in ein Magnet-Rack. Sobald die Proben klar waren, wurde die Flüssigkeit entnommen und verworfen und die Beads zweimal mit je 200µL 70%-Ethanol-Lösung in Nuclease-freiem Wasser unter mehrfachem Resuspendieren, aber ohne die Beads zu berühren, gewaschen. Zur Entfernung von Ethanol-Resten wurde die Proben anschließend 10 Sekunden auf einer Tisch-Zentrifuge (VWR Mini-Star Centrifuge; VWR International, Artikelnummer: 05533) zentrifugiert und die Ethanol-Reste entnommen.

Anschließend wurden die Proben aus dem Magnet-Rack gehoben, die Beads in jeweils 10µL Nuclease-freiem Wasser gelöst und 2 Minuten inkubiert. Dann kamen die Proben erneut ins Magnet-Rack und sobald die Proben klar waren, wurde das komplette Probenvolumen entnommen und in ein neues Eppendorf-Tube gegeben, ohne die Beads dabei zu berühren. Danach kamen in jede Probe je 2,5µL eines individuellen Native Barcodes (Ligation Sequencing gDNA – native barcoding Kit) und 10µL NEB Blunt/TA Ligase Master Mix (New England Biolabs; Artikelnummer: M0367S). Die Proben wurden mehrfach resuspendiert. Nach 10 Minuten wurden zusätzlich 2µL EDTA (Ethylendinitrilotetraessigsäure; Ligation Sequencing gDNA – native barcoding Kit) zugegeben, die Proben beschnippst und 10 Sekunden auf der Tisch-Zentrifuge zentrifugiert. Die Barcodes wurden zur späteren Probenzuordnung notiert.

Nun wurden alle Proben in ein Eppendorf-Tube gepoolt. Es folgten erneut die Zugabe von AMPure XP Beads ($0,8 \cdot$ dem gepoolten Gesamtvolumen), 5 Minuten Mischen im Hula-Mixer und zwei Waschschrte mit 70%-Ethanol-Lösung analog zu den vorangegangenen Schritten, sowie das Lösen der Beads in 35µL Nuclease-freiem Wasser. Die Proben wurden anschließend 2 Minuten inkubiert, zurück ins Magnet-Rack gesetzt und sobald die Proben klar waren, wurde das Gesamtvolumen in ein neues Eppendorf-Tube überführt.

Die gepoolten Proben wurden zur Adapter-Ligierung mit 5µL Adapter Mix II HC (Ligation Sequencing gDNA – native barcoding Kit), 10µL NEBNext Quick Ligation

Reaction Buffer (NEBNext Quick Ligation Modul; New England Biolabs; Artikelnummer: E6056S) und 5µL Quick T4 DNA Ligase (NEBNext Quick Ligation Module; New England Biolabs; Artikelnummer: E6056S) gemischt, mehrfach resuspendiert, beschnipst, für 10 Sekunden in der Tischzentrifuge zentrifugiert und anschließend 10 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die gepoolten Proben erneut mit 20µL AMPure XP Beads vermengt, 5 Minuten im Hula-Mixer gemischt und in ein Magnet-Rack gesetzt. Sobald die Proben wieder klar waren, wurde die Flüssigkeit entnommen und verworfen und die Beads zweimal mit je 125µL Short-Fragment-Buffer (Ligation Sequencing gDNA – native barcoding Kit) erst außerhalb des Magnet-Racks gelöst, um dann wieder im Magnet-Rack die Flüssigkeit zu entnehmen und zu verwerfen. Anschließend wurden die Proben 10 Sekunden auf der Tischzentrifuge zentrifugiert und Reste des Short-Read-Buffers entnommen. Die Beads wurden dann in 15µL Elution-Buffer (Ligation Sequencing gDNA – native barcoding Kit) gelöst und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend wieder ins Magnetrack gesetzt und das komplette Eluat, sobald die Proben wieder klar waren, in ein neues Eppendorf-Tube gegeben.

Sequencing Buffer II (Ligation Sequencing gDNA – native barcoding Kit) und Loading Beads II (Ligation Sequencing gDNA – native barcoding Kit) wurden zunächst auf einem Vortex-Mixer gemischt. Anschließend wurden 37,5µL Sequencing Buffer II und 25,5µL Loading Beads II zum Eluat gegeben und mehrfach resuspendiert.

Eine Flow Cell (R10.4.1) (Oxford Nanopore Technologies, FLO-MIN114) wurde in ein MinION Sequenziergerät (Oxford Nanopore Technologies, MIN-101B) eingesetzt und ein Flow Cell Check durchgeführt. Anschließend führte man ein Priming der Zelle durch, indem der Primer-Port geöffnet und mit einer 1000µL-Pipette entlüftet wird. Anschließend wurden 800µL einer Mischung aus 1000µL Flush Buffer (Ligation Sequencing gDNA – native barcoding Kit) und 30µL Flush Tether (Ligation Sequencing gDNA – native barcoding Kit) in den Primer-Port gefüllt. Nach fünf Minuten wurde die Spot-On-Öffnung geöffnet, 200µL der Mischung eingefüllt, erneut fünf Minuten gewartet und abschließend 75µL der Probe tröpfchenweise in die Spot-On-Öffnung gegeben. Mit einer minimalen Länge von 20bp und High-accuracy Base-calling wurde die Sequenzierung anschließend gestartet.

2.5.2.2 Full-Length-16S-rRNA-Sequenzierung

Zur Library Preparation für die Full-Length-16S-rRNA-Sequenzierung wurde das 16S Barcoding Kit 1-24 (Oxford Nanopore Technologies; Artikelnummer: SQK-16S024) der Firma Oxford Nanopore den Anweisungen des Herstellers entsprechend genutzt. In diesem Protokoll wird zunächst das komplette 16S-rRNA-Gen aus zuvor extrahierter DNA zunächst mittels PCR mit spezifischen 16S-Primern amplifiziert. Die Primer enthalten dabei zum einen Barcodes zur Probenzuordnung, sowie sogenannte 5'tags, die später eine Bindung von Sequenzierungs-Adaptoren ohne Ligase erlauben. Es folgen diverse Reinigungsschritte mit Hilfe magnetischer Beads, die Proben werden gepoolt und Sequenzierungs-Adapter zur Bindung an die namensgebende Pore in der Flow Cell werden verknüpft.

Das Kit erlaubt das Poolen und Barcoden von bis zu 24 Proben in einem Sequenzierungslauf. Wenn nicht abweichend beschrieben fanden Inkubationsschritte bei Raumtemperatur statt.

Ausgangsmaterial waren jeweils 10ng DNA in DNase/RNase-freiem Wasser aus den in 2.4.1 extrahierten Proben. Die Bestimmung des benötigten Volumens erfolgte nach folgender Berechnung:

$$10\text{ng/Probenkonzentration (ng/}\mu\text{L)} = \text{Für Sequenzierung eingesetztes Volumen (}\mu\text{L)}$$

Die Proben durchliefen zunächst eine PCR zur Amplifikation des 16S-rRNA-Gens. Dazu wurde das errechnete Probenvolumen in eine 0,2mL PCR-Tube gegeben, mit Nuclease-freiem Wasser auf 15 μ L aufgefüllt und mit 25 μ L LongAMP Hot Start Taq 2X Master Mix (New England Biolabs; Artikelnummer: M0533S) gemischt. Anschließend wurden zu jeder Probe 10 μ L eines individuellen 16S-Barcode-Primers (16S Barcoding Kit 1-24) gegeben, mehrfach resuspendiert und die Proben luftdicht geschlossen. Die Primer wurden zur späteren Zuordnung der Proben notiert. Dann kamen die Proben für 2 Stunden bei 95°C in einen PCR-Cycler (Bio-Rad C1000 Touch PCR Thermal Cycler With Dual 48/48 Fast Reaction Module; Bio-Rad Laboratories, Artikelnummer: 1851148).

Anschließend wurden die Proben in ein Eppendorf-Tube gegeben, mit jeweils 30 μ L AMPure XP Beads (16S Barcoding Kit 1-24) vermengt und 5 Minuten in einem Hula-Mixer gemischt. Anschließend kamen die Eppendorf-Tubes in ein Magnet-Rack und sobald die Flüssigkeit klar war, wurde sie vorsichtig entnommen und verworfen.

Anschließend wurden die Beads mit 200µL 70%-Ethanol-Lösung unter mehrfachem Resuspendieren, aber ohne die Beads zu berühren, gewaschen. Zur Entfernung von Ethanol-Resten wurden die Proben anschließend 10 Sekunden auf einer Tisch-Zentrifuge zentrifugiert und die Ethanol-Reste entnommen. Anschließend wurden die Beads in jeweils 10µL Tris-HCl-NaCl-Lösung (Chlorwasserstoffsäure; Natriumchlorid) gelöst und zwei Minuten inkubiert. Dann kamen die Proben zurück ins Magnet-Rack und sobald die Lösung wieder klar war, wurde das gesamte Volumen in neue Eppendorf-Tubes überführt, ohne die Beads zu berühren.

Anschließend wurde die Konzentration doppelsträngiger DNA in den Proben wie zuvor beschrieben mit einem Qubit 3.0 Fluorometer gemessen (siehe 2.4.1 DNA-Extraktion und Bestimmung der DNA-Konzentration). Ausgehend von den gemessenen Konzentrationen wurden je 100ng DNA pro Probe in einem neuen Eppendorf-Tube gepoolt (analog zur Berechnung der Ausgangsvolumina für die Sequenzierung) und mit Tris-HCl-NaCl-Lösung auf 10µL Gesamtvolumen aufgefüllt und mehrfach resuspendiert. Anschließend wurde 1µL Rapid Adapter (16S Barcoding Kit 1-24) hinzugegeben, resuspendiert, die Probe beschnipst, 10 Sekunden in der Tisch-Zentrifuge zentrifugiert und 5 Minuten inkubiert.

Eine Flow Cell (R9.4.1) (Oxford Nanopore Technologies, FLO-MIN106D) wurde in ein MinION Sequenziergerät eingesetzt. Anschließend wurden wie zuvor beschrieben ein Flow Cell Check und ein Priming der Zelle durchgeführt (siehe 2.4.2.1 Library Preparation Metagenomische Sequenzierung). Die gepoolten Proben wurden mit 34µL Sequencing Buffer (16S Barcoding Kit 1-24), 25,5µL Loading Beads (16S Barcoding Kit 1-24) und 4,5µL Nuclease-freiem Wasser gemischt und nach dem Priming der Zelle tröpfchenweise in die Spot-On-Öffnung gegeben. Mit einer minimalen Länge von 200bp und High-accuracy Base-calling wurde die Sequenzierung anschließend gestartet.

2.5.3 Illumina-Short-Read-16S-rRNA-Sequenzierung

2.5.3.1 Aliquotierung

Alle 101 salivaren und supragingivalen Proben wurden ebenfalls auf einer Illumina-Plattform auf das 16S rRNA-Gen hin sequenziert. Ausgangsmaterial war die bereits zuvor für die Sequenzierung auf einer Nanopore-Plattform genutzte DNA (siehe 2.4.1 DNA-Extraktion und Bestimmung der DNA-Konzentration). Von dieser DNA in DNase-/RNase-freiem Wasser wurden abhängig von der zuvor bestimmten DNA-

Konzentration 30µL in insgesamt zwei 96-Well-Platten aliquotiert. Proben mit einer Konzentration unter 5ng/µL wurden direkt aliquotiert. Proben mit einer Konzentration größer als 5ng/µL wurden auf diese Konzentration normalisiert, indem ein entsprechendes Volumen DNase-/RNase-freies Wasser vorgelegt wurde. Die zu Grunde liegende Rechnung sah wie folgt aus:

$$150\text{ng/Probenkonzentration (ng/}\mu\text{L)} = \text{Für Aliquotierung benötigtes Volumen (}\mu\text{L)}$$

$$30\mu\text{L} - \text{Für Aliquotierung benötigtes Volumen (}\mu\text{L)} = \text{Vorzulegendes Volumen DNase-/RNase-freies Wasser (}\mu\text{L)}$$

Die Probencodierung inklusive Probenart und DNA-Konzentration wurde in einem vorgegebenen, tabellarischen Format hinterlegt.

2.5.3.2 Externe Weiterverarbeitung

Die weiterführende Library preparation und Sequenzierung wurden extern im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt. Dort wurde von allen Proben eine Sequenzierung der Regionen V3 und V4 des 16S rRNA-Gens auf einer Illumina-NextSeq2000-Plattform mit einer Sequenziertiefe von 100000 Reads pro Probe durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als fastq-Dateien direkt auf unseren Account auf dem High-Performance-Computer (HPC) der Heinrich-Heine-Universität zur Verfügung gestellt.

2.6 Datenanalyse und Statistik

Die rechnergestützte Infrastruktur und Unterstützung erfolgte durch das Zentrum für Informations- und Medientechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die Verarbeitung der Rohdaten fand im Paket- und Umgebungs-Management-System Conda (Version 4.13.0) statt. Nach den verschiedenen Sequenzierungen wurden die Rohdaten der Nanopore-Sequenzierungen auf den HPC hochgeladen. Die Rohdaten wurden zunächst entpackt und in fastq-Dateien überführt. Die Ergebnisse der Illumina-Sequenzierung standen direkt als fastq zur Verfügung. Die bioinformatische Weiterverarbeitung der fastq erfolgte für die Daten aus den verschiedenen Sequenzierungs-Plattformen unterschiedlich:

Für die Weiterverarbeitung der Full-Length-16S-Sequenzierung wurde das Paket Emu (Version 3.4.5) verwendet (Curry et al., 2022). Emu dient der taxonomischen Zuordnung von Bakterien-Sequenzen aus Full-Length-16S-Sequenzierungen unter

Berücksichtigung der damit einhergehenden, höheren Rate an Sequenzierungsfehlern. Dazu führt Emu im ersten Schritt das sogenannte Alignment, beziehungsweise die Ausrichtung der Reads (R) an den Sequenzen (S) einer Referenzdatenbank durch. Dazu ermittelt Emu zunächst, wie oft vier verschiedene Fälle von nicht exakter Übereinstimmung aufgetreten sind: Mismatch, Insertion, Deletion und Softclip (eine Art weniger “strenge” Form der Übereinstimmung (Gao et al., 2024)). Daraus wird die Wahrscheinlichkeit $P(c)$ für das Auftreten dieser Nicht-Übereinstimmungen als Fehlerprofilierung bestimmt. Indem es die Häufigkeit der Nicht-Übereinstimmungen in jedem spezifischen Alignment normalisiert, berechnet Emu dann die Wahrscheinlichkeit $P(r|t)$, dass ein Read r zu einer bestimmten Spezies t gehört. Anschließend wird die Wahrscheinlichkeit $P(t|r)$ der Zugehörigkeit jedes Reads r zu jeder möglichen Spezies t in der Datenbank errechnet. Durch iterative Anwendung des Erwartungs-Maximierungs-Algorithmus wird die relative Abundanz $F(t)$ der Taxa in der Probe ständig verfeinert. Diese beiden letzten Schritte zur Bestimmung von $P(t|r)$ und $F(t)$ werden iterativ wiederholt, wobei hohe Abundanzen in $F(t)$ rückwirkend die Wahrscheinlichkeit $P(t|r)$ beeinflussen. Zuletzt werden Abundanzen unterhalb eines definierten Minimums entfernt (Curry et al., 2022). Als Referenz verwendet Emu eine kombinierte Datenbank aus den beiden Datenbanken rrnDB v5.6 (Stoddard et al., 2015) und NCBI 16S RefSeq (O’Leary et al., 2016) mit 49301 Sequenzen von 17555 Bakterien- und Archea-Spezies (Curry et al., 2022).

Die Weiterverarbeitung der metagenomischen Sequenzierungsdaten erfolgte mit dem Paket Kraken2 (Version 2.1.1) (Wood et al., 2019). Kraken2 ist dabei eine Weiterentwicklung von Kraken, einer Software, die mit sogenannten k-meren und dem Prinzip des “Lowest Common Ancestor” (LCA) arbeitet (Wood und Salzberg, 2014).

Ein k-mer ist dabei eine mögliche Sub-Sequenz einer längeren DNA-Sequenz der Länge k . Die Sequenz ATAG enthält demnach die 1-mers A, T, A und G, die 2-mers AT, TA und AG, die 3-mers ATA und TAG und den 4-mer ATAG. Kraken bildet entsprechend aus den Reads alle möglichen k-mere einer vorgegebenen Länge k und ordnet diese in einem taxonomischen Stammbaum entweder dem Taxon zu, in dem ein k-mer einzigartig vorkommt, oder dem LCA, also dem am weitesten an der “Wurzel” gelegenen Taxon im Stammbaum. Dadurch kann ein Unter-Stammbaum gebildet werden, in dem jedes Taxon mit der Zahl passender k-mere gewichtet wird und sich sogenannte “Wurzel-zu-Blatt”-Pfade ergeben. Die Summe der gewichteten Taxa in so

einem Pfad wird errechnet und der Pfad mit der höchsten Summe gewählt. Das oberste Taxon (das “Blatt”) dieses Pfades wird für die Klassifikation des Reads genutzt (Wood und Salzberg, 2014).

Nur die Reads mit der Zuordnung zum Superkingdom “Bacteria” wurden in der weiterführenden Analyse berücksichtigt. Die exakte Bestimmung der Abundanzen erfolgte anschließend mit der Software Bracken (Bayesian Reestimation of Abundance after Classification with Kraken) (Lu et al., 2016). Bracken erlaubt unter anderem durch Mitberücksichtigung der Readlänge eine präzisere Abschätzung der Abundanzen. Als Mindestanzahl zur Erfassung eines Taxons wurden dabei drei Reads festgelegt (Lu et al., 2016, Lu et al., 2022). Kraken2 nutzt dabei als Datenbank ebenfalls NCBI RefSeq (O’Leary et al., 2016).

Für die Daten der Short-Read-16S-Sequenzierung wurde ebenfalls Emu mit der dafür vorgesehenen Funktion verwendet (Curry et al., 2022).

Die taxonomischen Daten aus Emu und Kraken2 wurden anschließend getrennt nach Probenart, Sequenzierungsplattform und phylogenetischer Ebene statistisch weiter ausgewertet. Dazu wurden die Ergebnisse zunächst als OTU-Tabellen mit absoluten Readzahlen und relativen Abundanzen zusammengefasst.

Zur Bestimmung der Alpha-Diversität wurden die OTU-Tabellen auf Spezies-Ebene mit absoluten Readzahlen in R (Version 4.3.1) mit dem Paket Scaling with Ranked Subsampling (SRS; Version 0.2.3) normalisiert. Dabei wird eine neue OTU-Tabelle mit einer vorgegebenen Gesamt-Readzahl pro Probe erstellt (Beule und Karlovsky, 2020).

Für die Full-Length- und Short-Read-16S-Daten wurde hierfür die Gesamt-Readzahl der Probe mit der jeweils geringsten Sequenzierungstiefe gewählt. Für die metagenomischen Daten, die nach Filterung eukaryotischer und viraler DNA deutlich geringere Readzahlen aufwiesen, wurde ein Minimum von 500 Reads für die Normalisierung festgelegt, wodurch sechs der 50 Proben nicht in die Bestimmung der Alpha-Diversität einbezogen wurden.

Zur Quantifizierung der Alpha-Diversität wurden in Python (Version 3.7.3) mit dem Modul panda der Simpson- und Shannon-Index bestimmt. Der Simpson-Index kann dabei als die Wahrscheinlichkeit betrachtet werden, dass zwei Individuen, die man aus einer Gesamtheit von Individuen zufällig auswählt, nicht derselben Spezies angehören.

Er bewegt sich daher zwischen null und eins. Der Shannon-Index berücksichtigt neben der Anzahl von Spezies zusätzlich deren relative Häufigkeit. Er kann auch Werte größer eins annehmen, wobei höhere Werte eine größere Diversität beschreiben. Die zugrunde liegende Formel für den Simpson-Index, wobei n_i die Readzahl der Spezies i , N die Summe aller n_i und S die Gesamtzahl der Spezies ist, lautet (Xia und Sun, 2023):

$$D = 1 - \sum_{i=1}^S n_i \frac{(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

Die zugrunde liegende Formel für den Shannon-Index, wobei n_i die Readzahl der Spezies i , N die Summe aller n_i und S die Gesamtzahl der Spezies ist, lautet (Xia und Sun, 2023):

$$H = - \sum_{i=1}^S \left(\frac{n_i}{N} \right) * \ln \left(\frac{n_i}{N} \right)$$

Für die Beta-Diversität erfolgte zunächst die Bestimmung der Bray-Curtis-Dissimilarität und multidimensionale Skalierung (MDS), beziehungsweise Principal Coordinate Analysis (PCoA) in Python mit den Modulen `sklearn.manifold`, `scipy.spatial` und `matplotlib`. Die Bray-Curtis-Dissimilarität dient als Maß zur Bestimmung der Unterschiedlichkeit zwischen zwei Mengen von Daten. Im Kontext der Mikrobiom-Analyse handelt es sich dabei meist um Proben mit relativen Abundanzen von Bakterien-Spezies. Um zwei Proben miteinander zu vergleichen, werden alle Spezies zwischen den beiden Proben verglichen und für jede Spezies sowohl die Differenz, als auch die Summe zwischen den beiden Proben errechnet. Anschließend wird die Summe aller Differenzen und Summen errechnet und der Quotient aus beiden Summen bestimmt, wobei man einen Wert zwischen null und eins erhält. Ein Wert von null beschreibt dabei zwei identische Proben, während Werte nahe 1 für sehr unterschiedliche Proben sprechen. Die zu Grunde liegende Formel für n Spezies mit x_{ij} und x_{ik} als relative Abundanzen der Spezies i in den Proben j und k lautet (Bray und Curtis, 1957, Xia und Sun, 2023):

$$BC = \frac{\sum_{i=1}^n |x_{ij} - x_{ik}|}{\sum_{i=1}^n (x_{ij} + x_{ik})}$$

Die Bray-Curtis-Dissimilarität ist dabei robust gegenüber zahlreichen Null-Werten und gewichtet hoch-abundante Spezies stärker, wodurch fehlende, oder sehr seltene Spezies das Ergebnis nicht verzerren. Beim Vergleich von zwei Gruppen können diese Dissimilaritäten als Matrix dargestellt werden (Bray und Curtis, 1957, Xia und Sun, 2023).

Basierend auf einer Bray-Curtis-Dissimilaritäts-Matrix kann weiterführend eine MDS, beziehungsweise PCoA durchgeführt werden. Dabei handelt es sich um ein Verfahren zur Dimensions-Reduktion höherdimensionaler Daten, dass es unter anderem erlaubt, komplexe Datenstrukturen zweidimensional zu visualisieren und so die Ähnlichkeit zwischen Proben zu veranschaulichen. Ziel ist es, die Position jeder Probe in einem Raum niedriger Dimension zu finden, der die ursprünglichen Dissimilaritäten so gut wie möglich widerspiegelt. Das resultierende zweidimensionale Koordinatensystem stellt mit seinen Achsen die beiden Dimensionen dar, die die größte Varianz erklären, und ermöglicht die visuelle Erfassung der Beta-Diversität durch Gruppierung der Proben (Gower, 1966, Xia und Sun, 2023).

Zur Identifikation spezifischer Taxa, deren Abundanz sich zwischen den beiden Gruppen unterschied, kamen zwei weitere Methoden zum Einsatz. Zunächst wurden die relativen Abundanzen in Conda mit dem Paket Linear Discriminant Analysis Effect Size (LEfSe, Version 1.1.2) weiteruntersucht und die Ergebnisse grafisch aufbereitet. Dazu wurden die im Paket enthaltenen Skripte `format_input.py`, `run_lefse.py` und `lefse_plot_res.py` ausgeführt. LEfSe dient der Identifikation und Gewichtung von Merkmalen, die am ehesten den Unterschied zwischen zwei oder mehr biologischen Zuständen bedingen. Der Prozess basiert dabei auf drei Schritten: Einem Kruskal-Wallis-Rangsummen-Test zur Identifikation signifikant unterschiedlicher Taxa, gefolgt von paarweisen Wilcoxon-Rangsummen-Tests möglicher Subgruppen, insofern solche vorhanden sind. Das Signifikanzniveau (α -Fehler) dieser Tests kann dabei frei gewählt werden und wurde von uns auf den empfohlenen Standard von 0,05 festgelegt. Im dritten Schritt wird mittels linearer Diskriminanzanalyse die Effektstärke der zuvor identifizierten Merkmale bestimmt. Der Logarithmus zur Basis 10 des Ergebnisses ergibt dann den sogenannten LDA-Score (Linear Discriminant Analysis). Ein LDA-Score von 2,0 wurde dabei entsprechend den Standard-Empfehlungen als Schwellenwert für die Effektstärke eines relevanten Merkmals gewählt. Die Merkmale werden dann nach Effektstärke geordnet dargestellt (Segata et al., 2011).

Als zweite Methode wurden absolute Readzahlen mittels Analysis of Compositions of Microbiomes with Bias Correction 2 (ANCOM-BC2) mit dem Paket ANCOMBC (Version 2.4.0) der Open-Source-Software-Plattform Bioconductor (Version 3.19) in R analysiert. Dabei verwirft ANCOM-BC2 zunächst Taxa, die eine definierte Prävalenz in den Proben unterschreiten und berücksichtigt diese nicht in der eigentlichen Analyse. Als Grenzwert für die Prävalenz wurde der Standard-Wert von 0,1 gewählt. Anschließend erfolgt eine logarithmische Transformation der Readzahlen, wobei Null-Werte als fehlend betrachtet werden. Im nächsten Schritt erfolgt eine Schätzung Sample-spezifischer Bias und eine Schätzung und Korrektur Taxon-spezifischer Bias. Sample-spezifische Bias sind dabei im Wesentlichen unterschiedliche Sequenziertiefen der Proben. Die Korrektur Taxon-spezifischer Bias arbeitet mit der Grundannahme, dass die meisten Taxa nicht differentiell abundant sind. Mit den log-transformierten Daten wird anschließend ein lineares Modell erstellt, wobei die Bias-Schätzungen von den jeweiligen Koeffizienten subtrahiert werden und man Bias-korrigierte Schätzungen erhält. Dann können die eigentlichen Hypothesentests inklusive Kontrolle der FDR durchgeführt und das Ergebnis als Log-fold-change mit p-Wert und adjustiertem p-Wert dargestellt werden. Als Methode zur FDR-Kontrolle wurde die Option Benjamini-Hochberg gewählt. Anschließend erfolgt noch eine Bewertung der Robustheit der Ergebnisse gegenüber unterschiedlichen Pseudo-Counts, die an Stelle der Nullwerte eingesetzt werden. Für die eigentliche Analyse werden dabei keine Pseudo-Counts verwendet. Indem jedoch aufsteigend Pseudo-Counts von 0,01 bis 0,5 dahingehend getestet werden, ob sie Einfluss darauf nehmen, dass das entsprechende Taxon als statistisch signifikant identifiziert wird, erhält man ein zusätzliches Kriterium für die Robustheit der Ergebnisse, wenn ein Taxon über alle Pseudo-Counts hinweg statistisch signifikant bleibt (Lin und Peddada, 2020a, Lin und Peddada, 2024). Die graphische Aufbereitung der Ergebnisse von ANCOM-BC2 fand ebenfalls in Python mit den Modulen panda und matplotlib statt.

Eine Besonderheit der Analyse mittels ANCOM-BC2 ist die separate Identifikation struktureller Nullen. Als strukturelle Null gilt dabei im einfachsten Fall ein Taxon, das in einer Gruppe überhaupt nicht vorkommt, in der anderen jedoch schon. Entsprechende Taxa werden als separate Ergebnisse behandelt und nicht in die eigentliche Analyse einbezogen, was die Anzahl der zu analysierenden Taxa zusätzlich reduziert. Dabei können unterschiedliche Kriterien an die Identifikation struktureller Nullen angelegt

werden: Im einfachsten Fall wird nur der relative Anteil von Nullen p innerhalb einer Gruppe ermittelt und eine strukturelle Null identifiziert, wenn p exakt bei 0 liegt. Ist die Anzahl an Proben pro Gruppe relativ hoch (als Beispiel nennen die Autoren $n = 30$), kann als zusätzliches, strengeres Kriterium für die Identifikation struktureller Nullen die Einstellung Negative lower bound gewählt werden. In diesem Fall werden auch solche Taxa als strukturelle Null identifiziert, die für einen relativen Anteil p und einen Probenzahl n folgende Bedingung erfüllen (Kaul et al., 2017, Lin und Peddada, 2020a, Lin und Peddada, 2024):

$$p - 1,96 \sqrt{\left(\frac{p \cdot (1-p)}{n} \right)} < 0$$

Da in dieser Arbeit die Probenanzahl pro Gruppe bei maximal 26 lag, wurde nur der relative Anteil von Nullen als Kriterium zur Identifikation struktureller Nullen gewählt. Da ein Großteil der auf diese Art identifizierten Taxa nur in sehr wenigen Proben vorkommt, wurden nur Taxa, die in mindestens drei Proben identifiziert wurden, als hinreichend prävalente strukturelle Null mit potentieller Relevanz definiert und im Ergebnisteil aufgeführt.

ANCOM-BC2 ist damit die konservativere Methode, da es sehr effektiv Verzerrungen durch unterschiedliche Sequenzierungstiefe und Probenahmefraktion korrigiert, Nullwerte berücksichtigt und die FDR gut kontrolliert. Es besteht jedoch das Risiko, dass die Sensitivität durch diese methodische Strenge abnimmt. Umgekehrt geht LEfSe durch den Verzicht auf eine Methode zur Korrektur multiplen Testens mit einer potentiell höheren FDR einher und berücksichtigt durch die Verwendung relativer Abundanzen nicht die Unterschiede in der Sequenzierungstiefe, kann jedoch durch diesen weniger konservativeren Ansatz als die potentiell sensitivere Methode betrachtet werden. Taxa, die in beiden Methoden als statistisch signifikant identifiziert werden, dürften daher als relativ robustes Ergebnis betrachtet werden (Nearing et al., 2022).

Die statistische Auswertung der klinischen Parameter und der Alpha-Diversität, sowie die Berechnung von Korrelationen erfolgte in IBM-SPSS-Statistics (Version 28.0.1.1). Das Signifikanzniveau (α -Fehler) wurde auf 0,05 festgelegt. Intervallskalierte Parameter wurden mittels Median, Mittelwert, Standardabweichung und 95%-Konfidenzintervall beschrieben. Wenn nicht anders beschrieben werden die Ergebnisse als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben.

Nominalskalierte Parameter wurden weiterführend mittels Chi-Quadrat-Test untersucht. Intervallskalierte Parameter wurden dann mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Nicht-normalverteilte, intervallskalierte Parameter wurden weiterführend mittels Mann-Whitney-U-Test untersucht. Normalverteilte, intervallskalierte Parameter wurden mittels Levene's-Test auf Varianzgleichheit geprüft und bei Vorliegen dieser Voraussetzung mittels T-Test für unabhängige Stichproben weiteruntersucht. Korrelationen wurden mittels Korrelationskoeffizient nach Pearson und Spearman berechnet.

Die graphische Aufbereitung der Verteilung der relativen Abundanzen auf Phylum- und Genus-Ebene fand in LibreOffice Calc (Version 7.5.2.2) statt. Die Erstellung der Heatmaps zur Darstellung der Spezies-Verteilung fand ebenfalls in Python mit den Modulen pandas, matplotlib und seaborn statt. Venn-Diagramme wurden mit dem online verfügbaren Tool Bioinformatics & Evolutionary Genomics der Universität Gent erstellt (online abrufbar: <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

3 Ergebnisse

3.1 Probandencharakteristiken

Insgesamt konnten 51 Probanden rekrutiert werden. Davon wiesen 26 eine klinisch und biochemisch diagnostizierte Demenz bei Alzheimer-Krankheit auf. Bei den 25 Kontrollprobanden handelte es sich in der Regel um die im selben Haushalt wohnhaften Lebenspartner, die mittel MMST auf das Vorliegen eventueller kognitiver Defizite untersucht wurden. Die Geschlechterverteilung belief sich auf 27 Frauen und 24 Männer mit 14 Frauen und 12 Männern in der Patienten- und 13 Frauen und 12 Männern in der Kontrollgruppe.

Das mittlere Alter von Patienten und Kontrollen lag bei 67,85 Jahren ($\pm 8,26$ Jahre), beziehungsweise 67,36 Jahren ($\pm 9,15$ Jahre). Mittleres Gewicht, Größe und BMI der Patienten lagen bei 69,50kg ($\pm 13,04$ kg), 1,71m ($\pm 0,10$ m) und 23,73kg/m² ($\pm 3,52$ kg/m²), bei den Kontrollen bei 77,42kg ($\pm 12,64$ kg), 1,73m ($\pm 0,09$ m) und 25,79kg/m² ($\pm 3,91$ kg/m²) (siehe Tabelle 3).

Die Patienten wiesen durchschnittlich 15,31 Ausbildungsjahre ($\pm 3,94$ Jahre) auf, die Kontrollen 17,18 Jahre ($\pm 2,98$ Jahre). Das durchschnittliche Ergebnis im MMST belief sich in der Patientengruppe auf 23,77 ($\pm 3,80$), in der Kontrollgruppe auf 29,48 ($\pm 1,12$). Die genannten Parameter wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung und mittels Levene's-Test auf Varianzhomogenität getestet. Mit Ausnahme des MMST und der Ausbildungsjahre zeigten alle Parameter eine Normalverteilung und Varianzhomogenität und wurden mittels T-Test für unabhängige Stichproben analysiert. Dabei zeigte sich, dass die beiden Gruppen lediglich im Hinblick auf das Körpergewicht einen signifikanten Unterschied mit einem höheren Gewicht in der Kontrollgruppe aufwiesen ($p = 0,03$; 95%-KI: -15,15; -0,69) (siehe Tabelle 3).

MMST und Ausbildungsjahre zeigten keine Normalverteilung im Shapiro-Wilk-Test und wurden mittels Mann-Whitney-U-Test analysiert. Dabei ergab sich, dass die Kontrollprobanden einen signifikante höheren MMST ($p < 0,01$) und signifikant mehr Ausbildungsjahre ($p = 0,03$) aufwiesen (siehe Tabelle 3).

Von den 51 Probanden konnten erfolgreich alle Abstriche entnommen werden. Ein Patient war dabei jedoch nicht dazu in der Lage, ausreichend Speichel zu sammeln, weswegen jeweils 51 Abstriche und 50 salivare Proben im weiteren Verlauf zur Verfügung standen.

Tabelle 3 Allgemeine Probandencharakteristiken verglichen mit T-Test für unabhängige Stichproben, beziehungsweise Mann-Whitney-U-Test ($\alpha = 0,05$; signifikante Ergebnisse mit *)

Parameter	Pat. (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) (n = 26)	Kon. (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) (n = 25)	p-Wert	95%-KI
Alter (Jahre)	67,85 ($\pm$ 8,26)	67,36 ($\pm$ 9,15)	0,84	-4,42; 5,39
Gewicht (kg)	69,50 ($\pm$ 13,04)	77,42 ($\pm$ 12,64)	0,03*	-15,15; -0,69
Größe (m)	1,71 ($\pm$ 0,10)	1,73 ($\pm$ 0,09)	0,35	-0,08; 0,03
BMI (kg/m ²)	23,73 ($\pm$ 3,52)	25,79 ($\pm$ 3,91)	0,05	-4,15; 0,03
Ausbildungsjahre (Jahre)	15,31 ($\pm$ 3,94)	17,18 ($\pm$ 2,98)	0,03*	-
MMST	23,77 ($\pm$ 3,80)	29,48 ($\pm$ 1,12)	0,01*	-

3.2 Mundhygiene und Mundstatus

Zur orientierenden Erfassung der Mundgesundheit wurden der SBI und die Zahnanzahl nach FDI-Schema erhoben. Zusätzlich wurde anamnestisch die Mundhygiene eruiert. Die Patienten hatten durchschnittlich 23,42 ($\pm$ 7,49), die Kontrollprobanden 24,20 ($\pm$ 6,85) Zähne. Der SBI lag für die Patienten bei 1,48 ($\pm$ 0,59) und für die Kontrollen bei 1,55 ($\pm$ 0,67).

SBI und Zahnanzahl wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung und mittels Levene's-Test auf Varianzhomogenität getestet. Beide Parameter zeigten keine Normalverteilung im Shapiro-Wilk-Test und wurden mittels Mann-Whitney-U-Test analysiert, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gefunden werden konnten.

Die anamnestischen Parameter (siehe 8.4 Dokumentationsbogen) wurden mittels Chi-Quadrat-Test, beziehungsweise exaktem Test nach Fisher bei Zellohäufigkeiten unter fünf analysiert. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen identifiziert werden. Die exakte Verteilung der Antworten ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4 Anamnestisch erhobene Parameter der Mundgesundheit und –hygiene
verglichen mit Chi-Quadrat-Test, beziehungsweise exaktem Test nach Fisher ($\alpha = 0,05$)

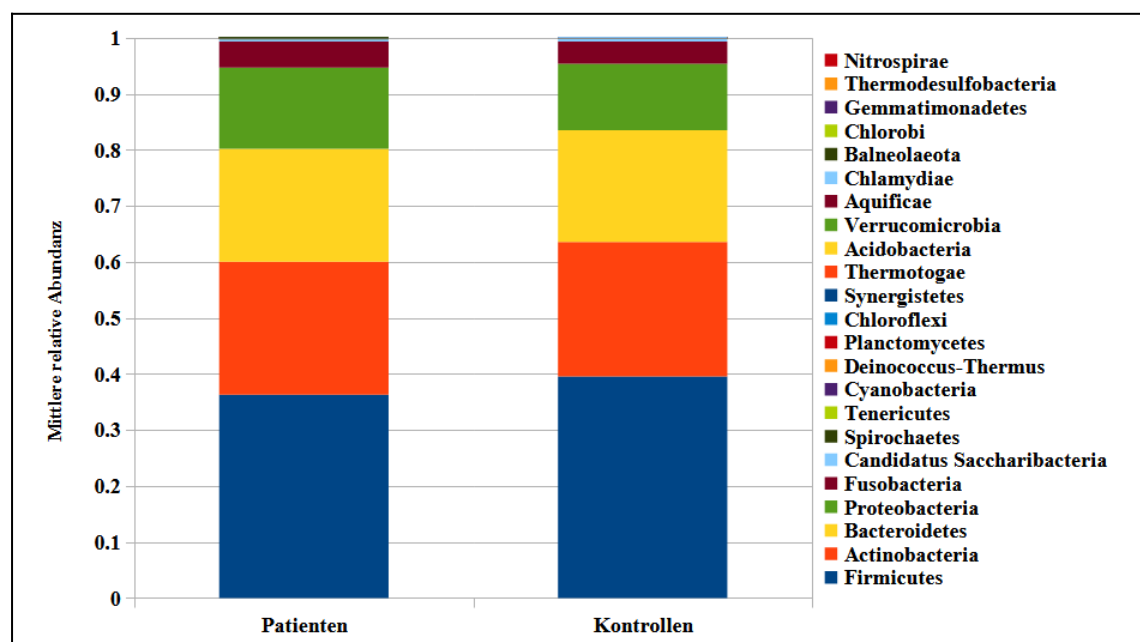
Parameter	Patienten Antwort “Ja”	Kontrollen Antwort “Ja”	p-Wert
Vorliegen einer Parodontitis?	4	5	0,73
Vorliegen einer Parodontitis in den letzten 10 Jahren?	5	7	0,46
Parodontitis-Behandlung in den letzten 10 Jahren?	2	3	0,67
Vorliegen von Karies?	5	3	0,70
Vorliegen von Karies in den letzten 10 Jahren?	13	14	0,67
Karies-Behandlung in den letzten 10 Jahren?	12	14	0,48
Zahn-Extraktion in den letzten 10 Jahren?	10	15	0,12
Zahnprothese?	6	4	0,73
Wahrnehmung von Zahnarztkontrolluntersuchungen?	21	22	0,70
Tägliche Durchführung von Maßnahmen der Mundhygiene?	25	24	1,00
Vorhandensein subjektiver Mundtrockenheit?	5	3	0,70

3.3 Whole-Genome-Sequenzierung

3.3.1 Durchschnittliche relative Abundanzen

Insgesamt konnten im Rahmen der metagenomischen Sequenzierung von 50 salivaren Proben 11578948 Reads mit einer mittleren Länge von 2487bp und einer mittleren Readzahl von 231578 sequenziert werden.

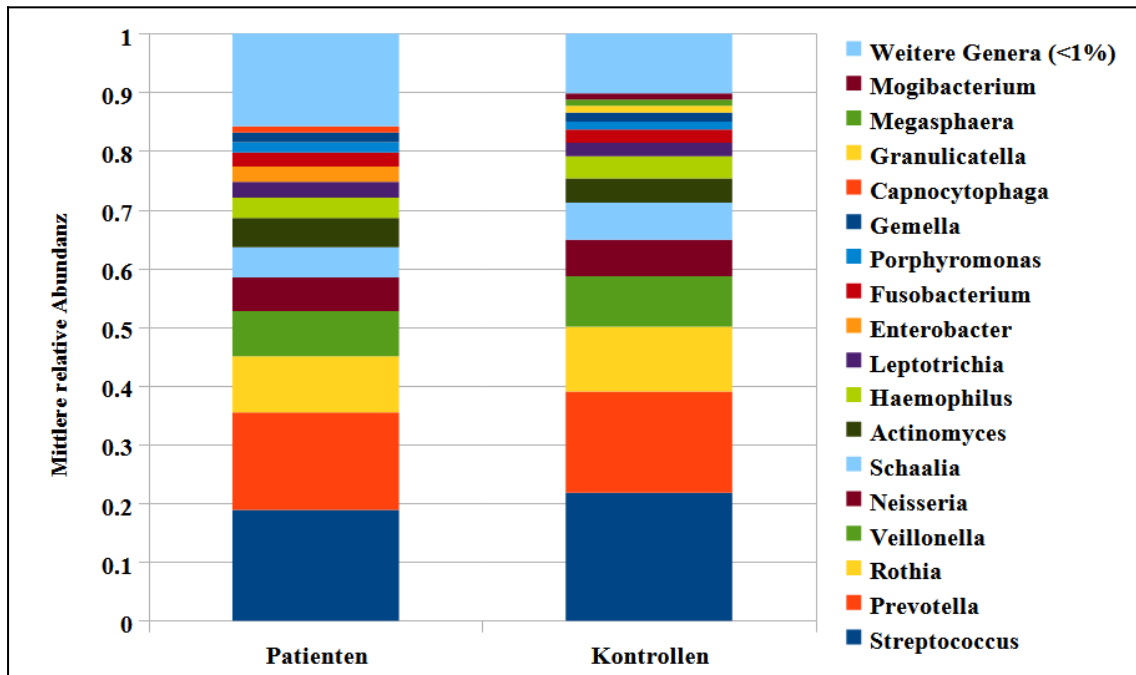
Die Phyla mit der höchsten relativen Abundanz über alle Proben hinweg waren Firmicutes mit 36,25% bei den Patienten und 39,53% bei den Kontrollen, Actinobacteria mit 23,77% bei den Patienten und 24,00% bei den Kontrollen, Bacteroidetes mit 20,17% bei den Patienten und 19,92% bei den Kontrollen, Proteobacteria mit 14,47% bei den Patienten und 11,89% bei den Kontrollen und Fusobacteria mit 4,67% bei den Patienten und 3,96% bei den Kontrollen (siehe Figur 2).



Figur 2 Verteilung der relativen Abundanzen auf Phylum-Ebene der metagenomischen Sequenzierung von 50 salivaren Proben aufgeteilt nach Patienten und Kontrollen. Aufgeführt sind alle identifizierten Phyla.

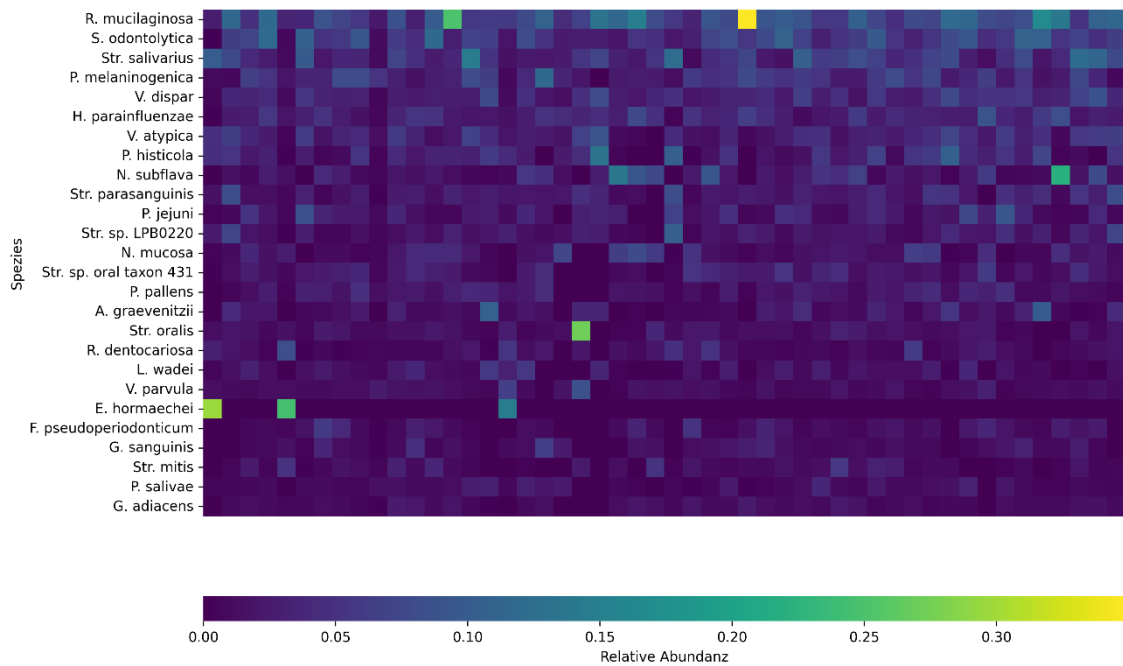
Auf Genus-Ebene konnten Streptococcus (18,90% bei den Patienten, 21,80% bei den Kontrollen), Prevotella (16,60% bei den Patienten, 17,21% bei den Kontrollen), Rothia (9,55% bei den Patienten, 11,04% bei den Kontrollen), Veillonella (7,68% bei den Patienten, 8,60% bei den Kontrollen), Neisseria (5,74% bei den Patienten, 6,22% bei

den Kontrollen), *Schaalia* (5,14% bei den Patienten, 6,32% bei den Kontrollen), *Actinomyces* (5,00% bei den Patienten, 4,14% bei den Kontrollen) und *Haemophilus* (3,42% bei den Patienten, 3,74% bei den Kontrollen) als Taxa mit hoher relativer Abundanz identifiziert werden (siehe Figur 3).



Figur 3 Verteilung der relativen Abundanzen auf Genus-Ebene der metagenomischen Sequenzierung von 50 salivaren Proben aufgeteilt nach Patienten und Kontrollen. Aufgeführt sind alle identifizierten Genera mit einer relativen Abundanz von mindestens 1%, alle weiteren Genera sind gebündelt dargestellt.

Auf Spezies-Ebene konnten als Taxa mit hoher Abundanz absteigend geordnet unter anderem *Rothia mucilaginosa*, *Schaalia odontolytica*, *Prevotella melaninogenica*, *Veillonella dispar*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Veillonella atypica*, *Prevotella histicola*, *Neisseria subflava* und *Streptococcus parasanguinis* identifiziert werden. Figur 4 zeigt die Verteilung der relativen Abundanzen aller Spezies, deren mittlere Abundanz über alle Proben hinweg mindestens 1% erreicht (siehe Figur 4).



Figur 4 Heatmap zur Darstellung der relativen Abundanzen auf Spezies-Ebene der metagenomischen Sequenzierung von 50 salivaren Proben. Von links nach rechts sind zunächst alle Patienten, gefolgt von allen Kontrollen dargestellt. Aufgeführt sind alle identifizierten Spezies mit einer relativen Abundanz von mindestens 1% über alle Proben hinweg, alle weiteren Spezies sind nicht aufgeführt. Von oben nach unten sind die Spezies absteigend geordnet nach ihrer mittleren Abundanz.

3.3.2 Alpha-Diversität

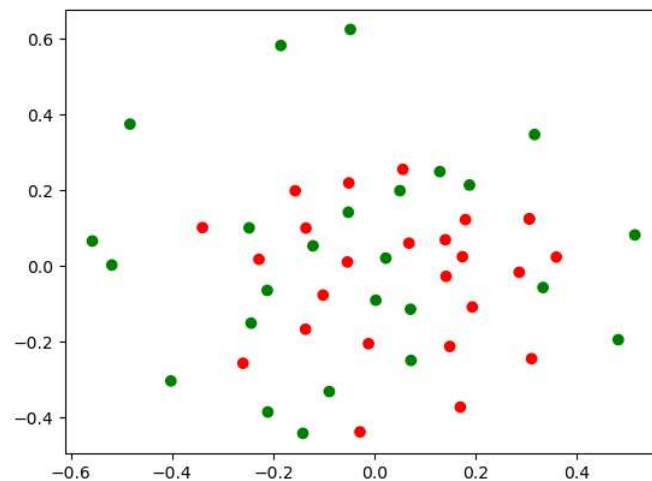
Die Alpha-Diversität wurde in Form des Simpson- und Shannon-Index ermittelt. Die absoluten Readzahlen wurden hierfür mit SRS in R auf eine Gesamt-Readzahl von 500 Reads pro Probe normalisiert. Sechs Proben (fünf in der Patientengruppe und eine in der Kontrollgruppe) wurden dadurch nicht in der Bestimmung der Alpha-Diversität der 50 salivaren Proben der metagenomischen Sequenzierung berücksichtigt.

Simpson- und Shannon-Index wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung und mittels Levene's-Test auf Varianzhomogenität getestet, wobei beide Tests Varianzhomogenität, jedoch der Simpson-Index im Gegensatz zum Shannon-Index keine Normalverteilung zeigten. Der Simpson-Index wurde daher mittels Mann-Whitney-U- und der Shannon-Index mittels T-Test für unabhängige Stichproben analysiert. Dabei ergab sich für beide Indizes kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen (siehe 8.5 Weitere Tabellen).

3.3.3 Beta-Diversität

Zur Bestimmung der Beta-Diversität wurden die Bray-Curtis-Dissimilarität und PCoA ermittelt, sowie eine differentielle Abundanz-Analyse mittels LEfSe und ANCOM-BC2 für Spezies-, Genus-, Familie-, Ordnungs-, Klasse- und Phylum-Ebene durchgeführt. Im Folgenden werden die Ergebnisse auf Spezies-Ebene beschrieben. Für die Ergebnisse der anderen taxonomischen Ebenen siehe 8.5 Weitere Tabellen und 8.6 Weitere Graphen.

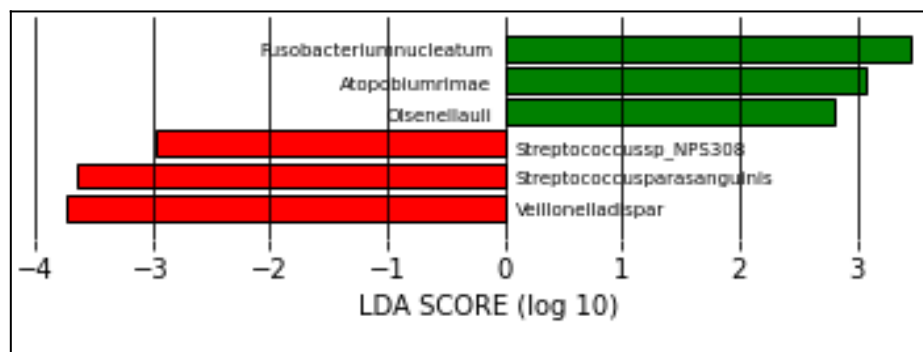
Bei der Analyse der metagenomischen Sequenzierung von 50 salivaren Proben wurden insgesamt 2122 unterschiedliche Spezies identifiziert. Für die Bray-Curtis-Dissimilarität wurden die Proben auf die Anwesenheit und Abundanz dieser Bakterien-Spezies hin untersucht und anschließend die PCoA durchgeführt, um die Dissimilaritäten in einem zweidimensionalen Raum darzustellen und eine eventuelle Gruppierung von Patienten und Kontrollen zu erfassen. Die PCoA zeigt dabei eine Trennung zwischen Patienten (in grün) und Kontrollen (in rot). Obwohl sich die Proben aus beiden Gruppen überlappen, zeigen die Proben aus der Kontrollgruppe eine engere Gruppierung, während die Proben aus der Patientengruppe weiter gestreut sind. Diese Anordnung kann als Hinweis auf unterschiedliche bakterielle Gemeinschaften auf Spezies-Ebene betrachtet werden (siehe Figur 5).



Figur 5 PCoA basierend auf der Bray-Curtis-Dissimilarität der metagenomischen Sequenzierung von 50 salivaren Proben. Patienten sind in grün und Kontrollen in rot dargestellt. Die Proben der Kontrollgruppe zeigen eine engere Gruppierung, während die Proben der Patientengruppe weiter gestreut sind.

Im Rahmen der differentiellen Abundanz-Analyse mit LEfSe auf Spezies-Ebene wurden sechs Taxa identifiziert, deren relative Abundanz sich zwischen Patienten- und Kontrollgruppe statistisch signifikant unterschied und die im Rahmen der linearen Diskriminanz-Analyse mindestens einen LDA-Score von 2, beziehungsweise -2 erreicht haben und daher als potentielle Biomarker zur Differenzierung der beiden Gruppen eingestuft wurden.

Absteigend geordnet nach LDA-Score wurden *Fusobacterium nucleatum*, *Atopobium rimae* und *Olsenella uli* als Spezies mit höherer Abundanz in der Patientengruppe und *Veillonella dispar*, *Streptococcus parasanguinis* und *Streptococcus_NPS 308* als Spezies mit höherer Abundanz in der Kontrollgruppe identifiziert (siehe Figur 6 und Tabelle 5).



Figur 6 Bakterien-Spezies, die mittels LEfSe im Rahmen der Analyse der metagenomischen Sequenzierung von 50 salivaren Proben als statistisch signifikant identifiziert wurden. Dargestellt sind Taxa, die im Rahmen der linearen Diskriminanz-Analyse einen LDA-Score von mindestens 2, beziehungsweise -2 erreicht haben. Insgesamt konnten sechs Bakterien-Spezies identifiziert werden, die als potentielle Biomarker zur Differenzierung der beiden Gruppen mit höherer Abundanz in der Patienten-Gruppe (in grün), beziehungsweise Kontroll-Gruppe (in rot) dienen können.

Tabelle 5 Mit LEfSe identifizierte Bakterien-Spezies in der metagenomischen Sequenzierung von 50 salivaren Proben geordnet nach LDA-Score.

Taxon	Gruppe mit erhöhtem Vorkommen	LDA-Score (log10)
Fusobacterium nucleatum	Patienten	3,44
Atopobium rimae	Patienten	3,08
Olsenella uli	Patienten	2,81
Veillonella dispar	Kontrollen	-3,73
Streptococcus parasanguinis	Kontrollen	-3,63
Streptococcus sp_NPS308	Kontrollen	-2,98

Mit Hilfe der zweiten Methode zur differentiellen Abundanz-Analyse ANCOM-BC2 konnten insgesamt 52 Bakterien-Spezies identifiziert werden, deren absolute Readzahl einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollgruppe zeigte. Davon kamen 9 Spezies mit einer höheren Abundanz in der Patienten- und 43 mit einer höheren Abundanz in der Kontrollgruppe vor. Absteigend geordnet nach der Log-fold-change wurden dabei Enterobacter hormaechei, Lactobacillus vaginalis, Parascardovia denticolens, Streptococcus agalactiae, Lactobacillus gasseri, Ottowia sp. oral taxon 894, Olsenella uli, Prevotella oralis und Lactobacillus fermentum als Taxa mit höherer Abundanz in der Patientengruppe identifiziert. In der Kontrollgruppe konnten umgekehrt unter anderem Bacteroides zoogloformans, Filifactor alocis, Neisseria sp. KEM232, Alloprevotella rava, Schaalia odontolytica, Streptococcus parasanguinis und Veillonella dispar als Taxa mit höherer Abundanz identifiziert werden (siehe Figur 7 und Tabelle 6).

Zusätzlich konnte Luteimonas sp. Gr-4 als hinreichend prävalente strukturelle Null identifiziert werden mit einem Vorkommen in drei Proben in der Patientengruppe. 16 der 52 identifizierten Bakterien-Spezies blieben dabei außerdem im Rahmen der Sensitivitäts-Analyse mit aufsteigenden Pseudo-Counts weiterhin statistisch signifikant (siehe Tabelle 6). Die vier Spezies Streptococcus parasanguinis, Olsenella uli, Veillonella dispar und Streptococcus sp. NPS 308 wurden dabei außerdem sowohl mittels LEfSe, als auch ANCOM-BC2 identifiziert.

Figur 7 Bakterien-Spezies, die mittels ANCOM-BC2 im Rahmen der Analyse der metagenomischen Sequenzierung von 50 salivaren Proben als statistisch signifikant identifiziert wurden. Dargestellt ist die Log-fold-change mit Standardfehler der Patienten- zur Kontroll-Gruppe als Wasserfall-Diagramm. Taxa mit höherer Abundanz in der Patienten-Gruppe sind in grün und für die Kontroll-Gruppe in rot dargestellt. Insgesamt konnten 52 Bakterien-Spezies identifiziert werden, deren Abundanz zwischen den beiden Gruppen einen statistisch signifikanten Unterschied zeigte.

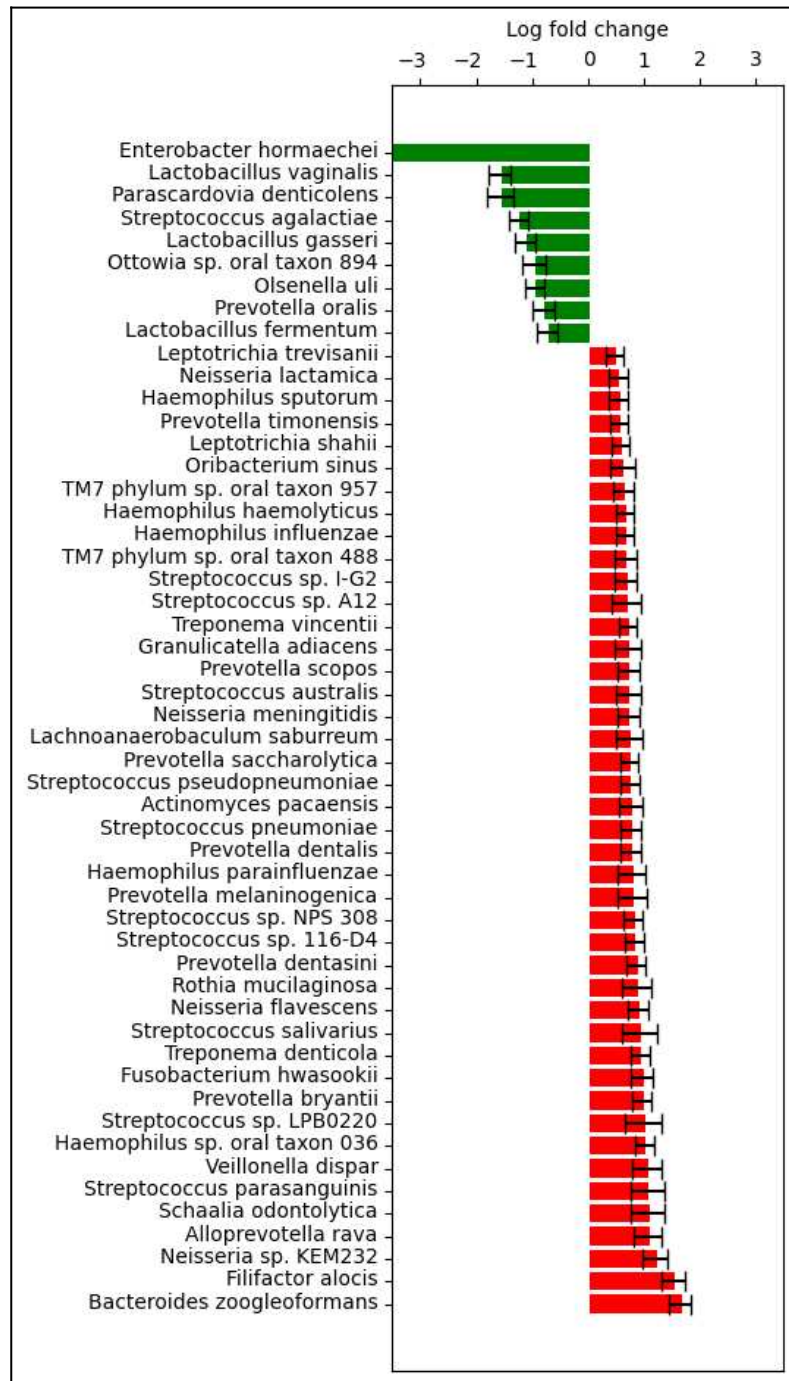


Tabelle 6 Mit ANCOM-BC2 identifizierte Bakterien-Spezies der metagenomischen Sequenzierung von 50 salivaren Proben geordnet nach Log-fold-change. Aufgeführt sind außerdem der adjustierte p-Wert und das Ergebnis der Sensitivitätsanalyse mit aufsteigenden Pseudo-Counts.

Taxon	Log-fold-change	Standardfehler	p-Wert	Robust nach Sensitivitätsanalyse
Enterobacter hormaechei	-5.51	0.33	0.01	FALSE
Lactobacillus vaginalis	-1.58	0.19	0.01	FALSE
Parascardovia denticolens	-1.57	0.24	0.01	FALSE
Streptococcus agalactiae	-1.25	0.17	0.03	TRUE
Lactobacillus gasseri	-1.12	0.18	0.03	FALSE
Ottowia sp. oral taxon 894	-0.97	0.21	0.03	FALSE
Olsenella uli	-0.97	0.17	0.01	FALSE
Prevotella oralis	-0.80	0.19	0.03	FALSE
Lactobacillus fermentum	-0.73	0.18	<0.05 (0,049)	FALSE
Leptotrichia trevisanii	0.48	0.16	0.04	FALSE
Neisseria lactamica	0.54	0.17	<0.05 (0,049)	FALSE
Haemophilus sputorum	0.55	0.18	0.05	FALSE
Prevotella timonensis	0.56	0.16	0.03	FALSE
Leptotrichia shahii	0.58	0.16	0.03	FALSE
Oribacterium sinus	0.62	0.23	<0.05 (0,049)	TRUE
TM7 phylum sp. oral taxon 957	0.63	0.19	0.03	FALSE
Haemophilus haemolyticus	0.66	0.16	0.01	FALSE
Haemophilus influenzae	0.66	0.16	0.02	FALSE
TM7 phylum sp. oral taxon 488	0.67	0.20	0.03	FALSE
Streptococcus sp. I-G2	0.68	0.20	0.03	TRUE
Streptococcus sp. A12	0.69	0.26	<0.05 (0,049)	FALSE
Treponema vincentii	0.70	0.16	<0.05 (0,049)	FALSE
Granulicatella adiacens	0.71	0.23	0.03	TRUE
Prevotella scopos	0.72	0.19	0.01	FALSE
Streptococcus australis	0.72	0.22	0.03	FALSE
Neisseria meningitidis	0.72	0.19	0.01	TRUE
Lachnoanaerobaculum saburreum	0.73	0.24	0.03	FALSE
Prevotella saccharolytica	0.74	0.16	0.03	FALSE
Streptococcus pseudopneumoniae	0.74	0.17	0.01	FALSE
Actinomyces pacaensis	0.76	0.21	0.01	FALSE
Streptococcus pneumoniae	0.76	0.19	0.01	FALSE
Prevotella dentalis	0.77	0.17	0.02	FALSE
Haemophilus parainfluenzae	0.78	0.25	0.03	TRUE
Prevotella melaninogenica	0.79	0.27	0.03	TRUE

Streptococcus sp. NPS 308	0.80	0.18	0.01	TRUE
Streptococcus sp. 116-D4	0.83	0.17	0.01	FALSE
Prevotella dentasini	0.86	0.17	0.04	FALSE
Rothia mucilaginosa	0.86	0.26	0.02	TRUE
Neisseria flavescens	0.90	0.19	0.01	FALSE
Streptococcus salivarius	0.92	0.33	0.04	TRUE
Treponema denticola	0.93	0.17	0.01	FALSE
Fusobacterium hwasookii	0.97	0.20	0.03	TRUE
Prevotella bryantii	0.97	0.17	<0.05 (0,049)	FALSE
Streptococcus sp. LPB0220	0.99	0.33	0.03	TRUE
Haemophilus sp. oral taxon 036	1.01	0.18	0.03	FALSE
Veillonella dispar	1.06	0.27	0.01	TRUE
Streptococcus parasanguinis	1.06	0.30	0.01	TRUE
Schaalia odontolytica	1.07	0.31	0.01	TRUE
Alloprevotella rava	1.07	0.25	0.01	FALSE
Neisseria sp. KEM232	1.20	0.22	0.03	FALSE
Filifactor alocis	1.53	0.20	0.01	TRUE
Bacteroides zoogloformans	1.65	0.20	0.03	FALSE

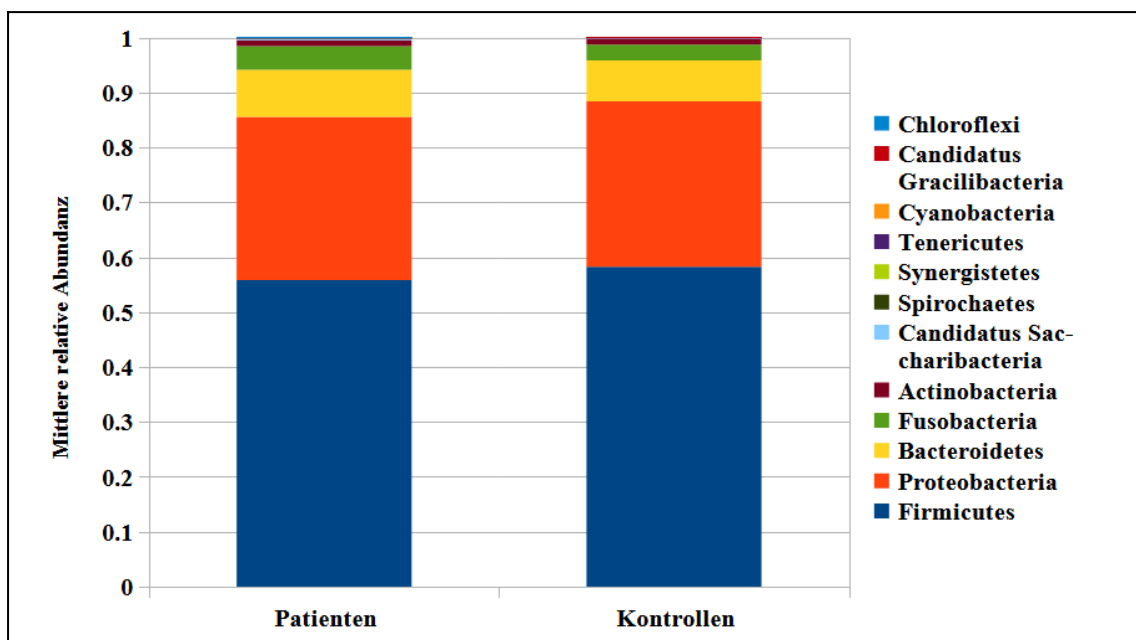
3.4 Full-Length-16S-Sequenzierung

3.4.1 Saliva

3.4.1.1 Durchschnittliche relative Abundanzen

Insgesamt konnten im Rahmen der Full-Length-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben 5611792 Reads mit einer mittleren Länge von 1400bp und einer mittleren Readzahl von 112236 sequenziert werden.

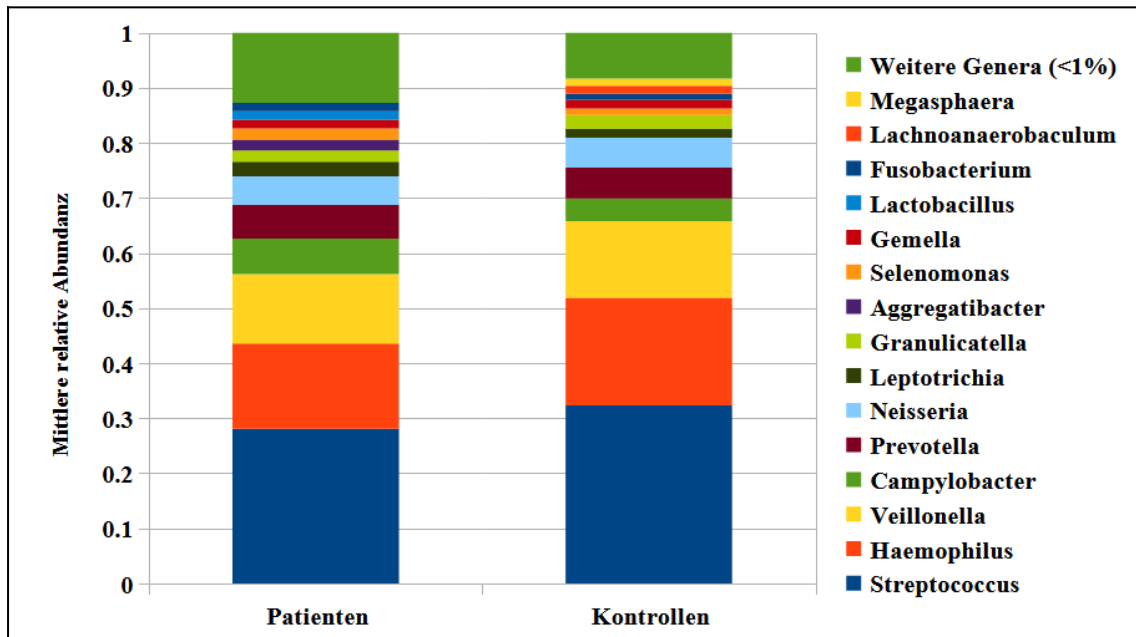
Die Phyla mit der höchsten relativen Abundanz über alle Proben hinweg waren Firmicutes mit 55,84% bei den Patienten und 58,27% bei den Kontrollen, Proteobacteria mit 29,71% bei den Patienten und 30,15% bei den Kontrollen, Bacteroidetes mit 8,60% bei den Patienten und 7,44% bei den Kontrollen, Fusobacteria mit 4,31% bei den Patienten und 2,87% bei den Kontrollen und Actinobacteria mit 1,08% bei den Patienten und 1,00% bei den Kontrollen (siehe Figur 8).



Figur 8 Verteilung der relativen Abundanzen auf Phylum-Ebene der Full-Length-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben aufgeteilt nach Patienten und Kontrollen. Aufgeführt sind alle identifizierten Phyla.

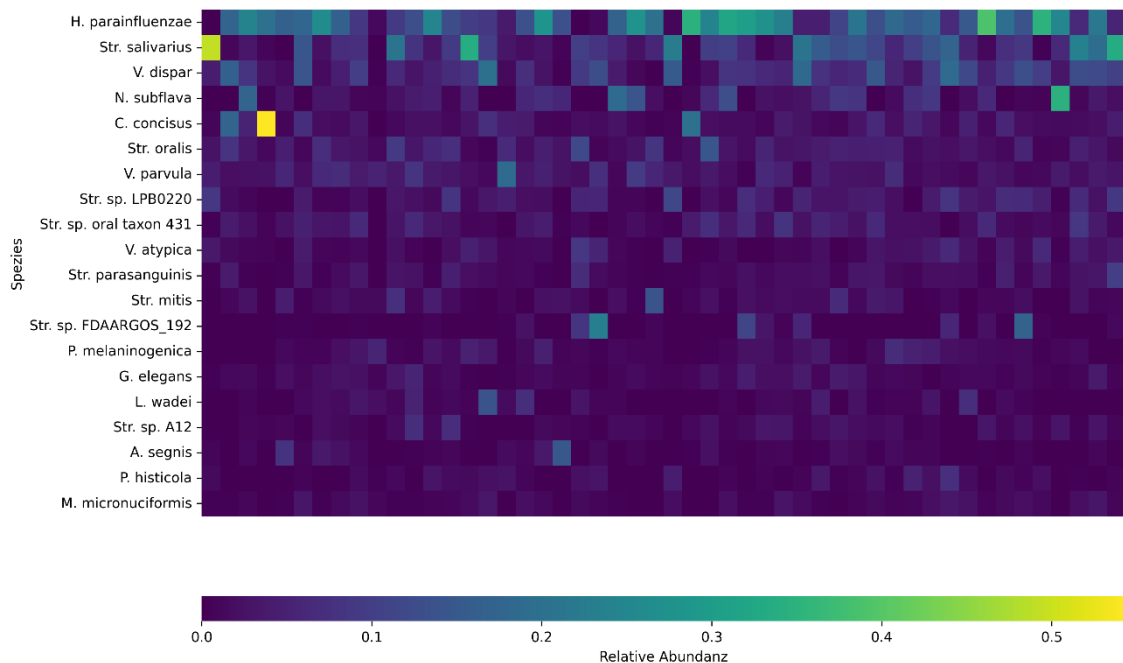
Auf Genus-Ebene konnten Streptococcus (28,08% bei den Patienten, 32,32% bei den Kontrollen), Haemophilus (15,48% bei den Patienten, 19,55% bei den Kontrollen), Veillonella (12,65% bei den Patienten, 13,89% bei den Kontrollen), Campylobacter

(6,43% bei den Patienten, 4,13% bei den Kontrollen), Prevotella (6,06% bei den Patienten, 5,60% bei den Kontrollen), Neisseria (5,24% bei den Patienten, 5,42% bei den Kontrollen) und Leptotrichia (2,62% bei den Patienten, 1,67% bei den Kontrollen) als Taxa mit hoher relativer Abundanz identifiziert werden (siehe Figur 9).



Figur 9 Verteilung der relativen Abundanzen auf Genus-Ebene der Full-Length-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben aufgeteilt nach Patienten und Kontrollen. Aufgeführt sind alle identifizierten Genera mit einer relativen Abundanz von mindestens 1%, alle weiteren Genera sind gebündelt dargestellt.

Auf Spezies-Ebene konnten als Taxa mit hoher Abundanz absteigend geordnet unter anderem Haemophilus parainfluenzae, Streptococcus salivarius, Veillonella dispar, Neisseria subflava, Campylobacter concisus, Streptococcus oralis und Veillonella parvula identifiziert werden. Figur 10 zeigt die Verteilung der relativen Abundanzen aller Spezies, deren mittlere Abundanz über alle Proben hinweg mindestens 1% erreicht (siehe Figur 10).



Figur 10 Heatmap zur Darstellung der relativen Abundanzen auf Spezies-Ebene der Full-Length-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben. Von links nach rechts sind zunächst alle Patienten, gefolgt von allen Kontrollen dargestellt. Aufgeführt sind alle identifizierten Spezies mit einer relativen Abundanz von mindestens 1% über alle Proben hinweg, alle weiteren Spezies sind nicht aufgeführt. Von oben nach unten sind die Spezies absteigend geordnet nach ihrer mittleren Abundanz.

3.4.1.2 Alpha-Diversität

Die Alpha-Diversität wurde in Form des Simpson- und Shannon-Index ermittelt. Die absoluten Readzahlen wurden hierfür mit SRS in R auf eine Gesamt-Readzahl von 22945 Reads, entsprechend der Readzahl der Probe mit der geringsten Sequenzierungstiefe normalisiert.

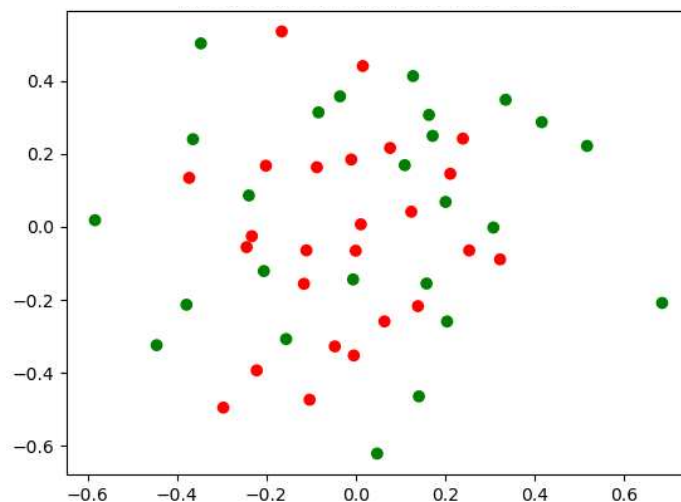
Simpson- und Shannon-Index wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung und mittels Levene's-Test auf Varianzhomogenität getestet, wobei beide Tests Varianzhomogenität, jedoch der Simpson-Index im Gegensatz zum Shannon-Index keine Normalverteilung zeigten. Der Simpson-Index wurde daher mittels Mann-Whitney-U- und der Shannon-Index mittels T-Test für unabhängige Stichproben analysiert. Dabei ergab sich für beide Indizes kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen (siehe 8.5 Weitere Tabellen).

3.4.1.3 Beta-Diversität

Wie bereits in 3.3.3 Beta-Diversität beschrieben wurde die Beta-Diversität mittels Bray-Curtis-Dissimilarität und PCoA, LEfSe und ANCOM-BC2 analysiert. Im Folgenden werden die Ergebnisse auf Spezies-Ebene beschrieben. Für die Ergebnisse der anderen taxonomischen Ebenen siehe 8.5 Weitere Tabellen und 8.6 Weitere Graphen.

Bei der Analyse der Full-Length-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben wurden insgesamt 511 unterschiedliche Spezies identifiziert. Für die Bray-Curtis-Dissimilarität wurden die Proben auf die Anwesenheit und Abundanz dieser Bakterien-Spezies hin untersucht und anschließend die PCoA durchgeführt

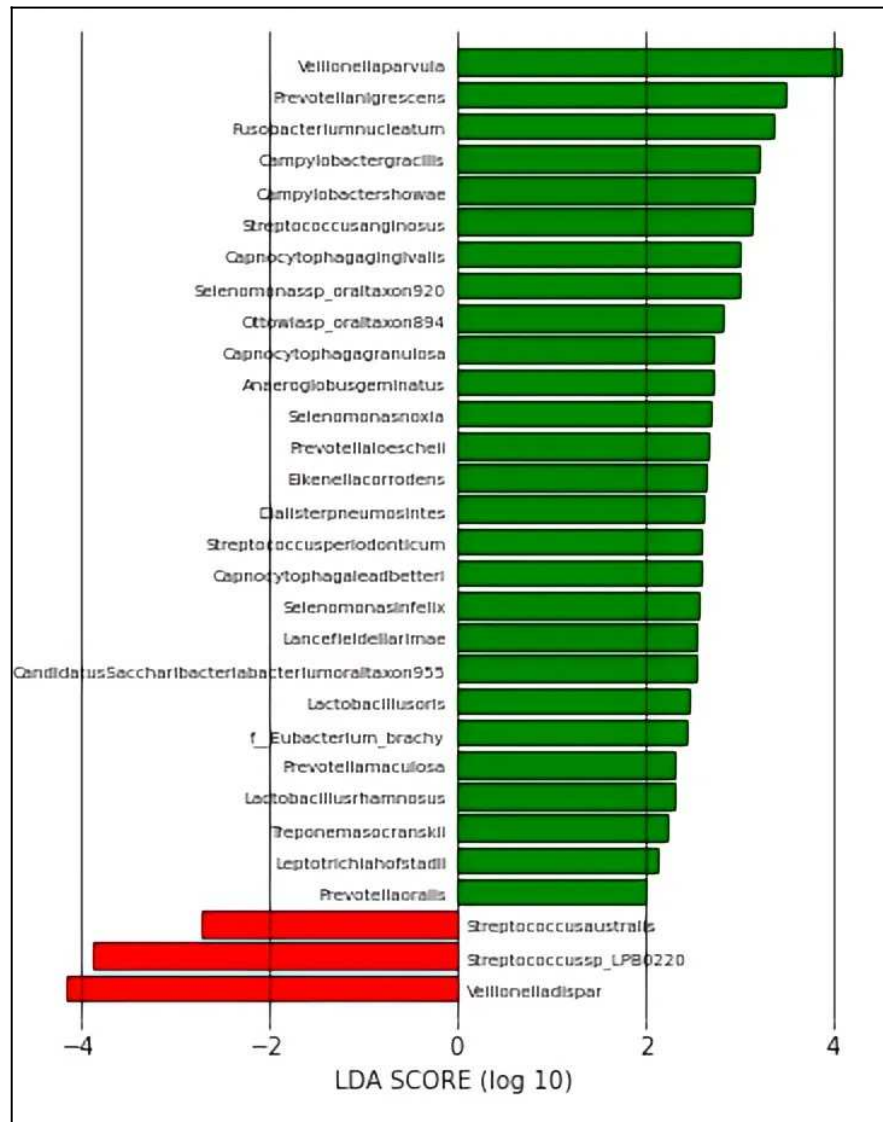
Die PCoA zeigt dabei eine weniger deutliche Trennung zwischen Patienten (in grün) und Kontrollen (in rot) als die Proben der metagenomischen Sequenzierung (siehe 3.3.3 Beta-Diversität). Trotzdem lässt sich eine weitere Streuung der Proben aus der Patientengruppe erkennen (siehe Figur 11).



Figur 11 PCoA basierend auf der Bray-Curtis-Dissimilarität der Full-Length-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben. Patienten sind in grün und Kontrollen in rot dargestellt. Die Proben der Kontrollgruppe zeigen eine engere Gruppierung, während die Proben der Patientengruppe weiter gestreut sind.

Im Rahmen der differentiellen Abundanz-Analyse mit LEfSe auf Spezies-Ebene wurden 30 Taxa identifiziert, deren relative Abundanz sich zwischen Patienten- und Kontrollgruppe statistisch signifikant unterschied und die im Rahmen der linearen Diskriminanz-Analyse mindestens einen LDA-Score von 2, beziehungsweise -2 erreicht haben.

Absteigend geordnet nach LDA-Score wurden unter anderem *Veillonella parvula*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter showae*, *Streptococcus anginosus* und *Capnocytophaga gingivalis* als Spezies mit höherer Abundanz in der Patientengruppe und *Veillonella dispar*, *Streptococcus_LPB 0220* und *Streptococcus australis* als Spezies mit höherer Abundanz in der Kontrollgruppe identifiziert (siehe Figur 12 und Tabelle 7).



Figur 12 Bakterien-Spezies, die mittels LEfSe im Rahmen der Analyse der Full-Length-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben als statistisch signifikant identifiziert wurden. Dargestellt sind Taxa, die im Rahmen der linearen Diskriminanz-Analyse einen LDA-Score von mindestens 2, beziehungsweise -2 erreicht haben. Insgesamt konnten 30 Bakterien-Spezies identifiziert werden, die als potentielle Biomarker zur Differenzierung der beiden Gruppen mit höherer Abundanz in der Patienten-Gruppe (in grün), beziehungsweise Kontroll-Gruppe (in rot) dienen können.

Tabelle 7 Mit LEfSe identifizierte Bakterien-Spezies in der Full-Length-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben geordnet nach LDA-Score.

Taxon	Gruppe mit erhöhtem Vorkommen	LDA-Score (log10)
Veillonella parvula	Patienten	4,06
Prevotella nigrescens	Patienten	3,48
Fusobacterium nucleatum	Patienten	3,36
Campylobacter gracilis	Patienten	3,20
Campylobacter showae	Patienten	3,15
Streptococcus anginosus	Patienten	3,13
Capnocytophaga gingivalis	Patienten	3,01
Selenomonas sp_oraltaxon920	Patienten	2,99
Ottowia sp_oraltaxon894	Patienten	2,81
Capnocytophaga granulosa	Patienten	2,72
Anaeroglobus geminatus	Patienten	2,72
Selenomonas noxia	Patienten	2,68
Prevotella loescheii	Patienten	2,66
Eikenella corrodens	Patienten	2,63
Dialister pneumosintes	Patienten	2,61
Streptococcus periodonticum	Patienten	2,59
Capnocytophaga leadbetteri	Patienten	2,58
Selenomonas infelix	Patienten	2,57
Lancefieldella rimae	Patienten	2,55
Candidatus_saccharibacteria_bacterium_oraltaxon955	Patienten	2,54
Lactobacillus oris	Patienten	2,46
f_Eubacterium_brachy	Patienten	2,43
Prevotella maculosa	Patienten	2,31
Lactobacillus rhamnosus	Patienten	2,30
Treponema socranskii	Patienten	2,23
Leptotrichia hofstadii	Patienten	2,12
Prevotella oralis	Patienten	2,01
Veillonella dispar	Kontrollen	-4,15
Streptococcus sp_LPB0220	Kontrollen	-3,87
Streptococcus australis	Kontrollen	-2,71

Mit ANCOM-BC2 konnten insgesamt 49 Bakterien-Spezies identifiziert werden, deren absolute Readzahl einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollgruppe zeigte. Davon kamen 41 Spezies mit einer höheren Abundanz in der Patienten- und acht mit einer höheren Abundanz in der Kontrollgruppe vor. Absteigend geordnet nach der Log-fold-change wurden dabei unter anderem *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus vaginalis*, *Prevotella pleuritidis*, *Lactobacillus ultunensis*, *Neisseria sicca*, *Lactobacillus salivarius*, *Prevotella multiformis*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus lactarius* und *Prevotella intermedia* als Taxa mit höherer Abundanz in der Patientengruppe identifiziert. In der Kontrollgruppe konnten umgekehrt *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Pseudobutyribrio xylanivorans*, *Streptococcus* sp. LPB 0220, *Haemophilus sputorum*, *Haemophilus influenzae*, *Lautropia dentalis*, *Neisseria flavescens* und *Oribacterium sinus* als Taxa mit höherer Abundanz identifiziert werden (siehe Figur 13 und Tabelle 8).

Zusätzlich konnten 15 Spezies als hinreichend prävalente strukturelle Nullen identifiziert werden, wovon zehn in der Patienten- und fünf in der Kontrollgruppe identifiziert wurden (siehe Tabelle 9). Nur vier der 49 identifizierten Bakterien-Spezies blieben dabei außerdem im Rahmen der Sensitivitäts-Analyse mit aufsteigenden Pseudo-Counts weiterhin statistisch signifikant. Diese Spezies waren *Prevotella oralis*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas noxia* und *Prevotella maculosa*. Darüber hinaus konnten die sechs Spezies *Prevotella nigrescens*, *Prevotella oralis*, *Prevotella maculosa*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia* und *Dialister pneumosintes* sowohl mittels LEfSe, als auch ANCOM-BC2 identifiziert werden.

Figur 13 Bakterien-Spezies, die mittels ANCOM-BC2 im Rahmen der Analyse der Full-Length-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben als statistisch signifikant identifiziert wurden. Dargestellt ist die Log-fold-change mit Standardfehler der Patienten- zur Kontroll-Gruppe als Wasserfall-Diagramm. Taxa mit höherer Abundanz in der Patienten-Gruppe sind in grün und für die Kontroll-Gruppe in rot dargestellt. Insgesamt konnten 49 Bakterien-Spezies identifiziert werden, deren Abundanz zwischen den beiden Gruppen einen statistisch signifikanten Unterschied zeigte.

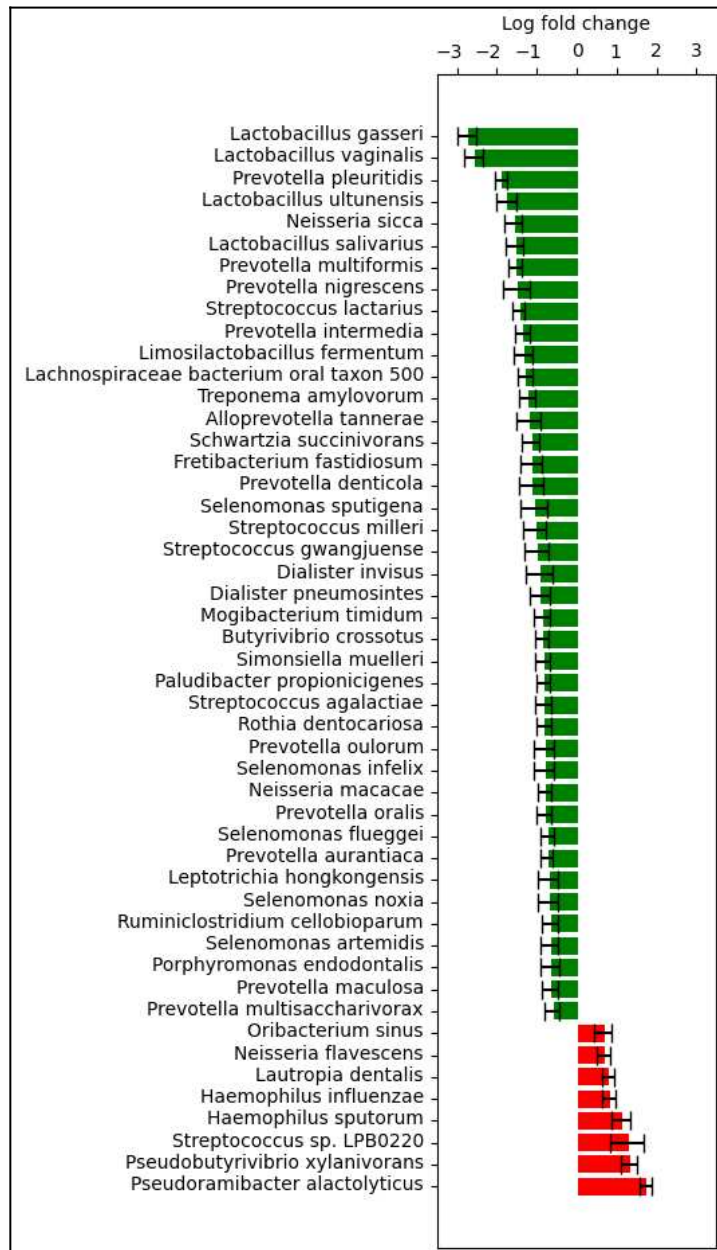


Tabelle 8 Mit ANCOM-BC2 identifizierte Bakterien-Spezies der Full-Length-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben geordnet nach Log-fold-change. Aufgeführt sind außerdem der adjustierte p-Wert und das Ergebnis der Sensitivitätsanalyse mit aufsteigenden Pseudo-Counts.

Taxon	Log-fold-change	Standardfehler	p-Wert	Robust nach Sensitivitätsanalyse
Lactobacillus gasseri	-2.76	0.23	<0.01	FALSE
Lactobacillus vaginalis	-2.57	0.24	<0.01	FALSE
Prevotella pleuritidis	-1.90	0.16	<0.01	FALSE
Lactobacillus ultunensis	-1.77	0.25	<0.01	FALSE
Neisseria sicca	-1.58	0.22	<0.01	FALSE
Lactobacillus salivarius	-1.55	0.22	<0.01	FALSE
Prevotella multiformis	-1.53	0.17	<0.01	FALSE
Prevotella nigrescens	-1.51	0.34	<0.01	FALSE
Streptococcus lactarius	-1.46	0.16	<0.01	FALSE
Prevotella intermedia	-1.36	0.19	<0.01	FALSE
Limosilactobacillus fermentum	-1.35	0.24	<0.01	FALSE
Lachnospiraceae bacterium oral taxon 500	-1.29	0.17	<0.01	FALSE
Treponema amylovorum	-1.24	0.21	0.01	FALSE
Alloprevotella tanneriae	-1.20	0.29	<0.01	FALSE
Schwartzia succinivorans	-1.15	0.22	<0.01	FALSE
Fretibacterium fastidiosum	-1.14	0.26	<0.01	FALSE
Prevotella denticola	-1.12	0.30	0.01	FALSE
Selenomonas sputigena	-1.08	0.32	0.02	FALSE
Streptococcus milleri	-1.05	0.29	0.01	FALSE
Streptococcus gwangjuense	-0.99	0.30	0.03	FALSE
Dialister invisus	-0.94	0.34	<0.05 (0,049)	FALSE
Dialister pneumosintes	-0.93	0.24	0.01	FALSE
Mogibacterium timidum	-0.88	0.20	<0.01	FALSE
Butyrivibrio crossotus	-0.87	0.16	0.01	FALSE
Simonsiella muelleri	-0.85	0.18	0.02	FALSE
Paludibacter propionicigenes	-0.84	0.17	<0.01	FALSE
Streptococcus agalactiae	-0.83	0.21	0.02	FALSE
Rothia dentocariosa	-0.83	0.18	<0.01	FALSE
Prevotella oulorum	-0.82	0.26	0.03	FALSE
Selenomonas infelix	-0.82	0.24	0.02	FALSE
Neisseria macacae	-0.82	0.17	<0.05 (0,049)	FALSE
Prevotella oralis	-0.81	0.18	0.02	TRUE
Selenomonas flueggei	-0.74	0.18	0.02	TRUE
Prevotella aurantiaca	-0.74	0.15	0.05	FALSE
Leptotrichia hongkongensis	-0.72	0.24	0.04	FALSE
Selenomonas noxia	-0.72	0.25	<0.05	TRUE

			(0,045)	
Ruminiclostridium cellobioparum	-0.68	0.21	0.03	FALSE
Selenomonas artemidis	-0.67	0.22	0.04	FALSE
Porphyromonas endodontalis	-0.67	0.22	0.05	FALSE
Prevotella maculosa	-0.66	0.21	0.04	TRUE
Prevotella multisaccharivorax	-0.62	0.17	0.04	FALSE
Oribacterium sinus	0.66	0.23	0.04	FALSE
Neisseria flavescens	0.68	0.17	0.04	FALSE
Lautropia dentalis	0.78	0.16	0.03	FALSE
Haemophilus influenzae	0.80	0.17	0.01	FALSE
Haemophilus sputorum	1.11	0.23	<0.01	FALSE
Streptococcus sp. LPB0220	1.27	0.42	0.03	FALSE
Pseudobutyrvibrio xylanivorans	1.31	0.20	<0.01	FALSE
Pseudoramibacter alactolyticus	1.72	0.16	0.02	FALSE

Tabelle 9 Spezies der Full-Length-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben, die mittels ANCOM-BC2 als strukturelle Nullen identifiziert wurden. Dargestellt sind Taxa, die in mindestens drei Proben identifiziert wurden. Aufgeführt sind die Gruppe, in der ein höheres Vorkommen identifiziert wurde, sowie die Anzahl an Probanden bei denen die Spezies identifiziert werden konnte.

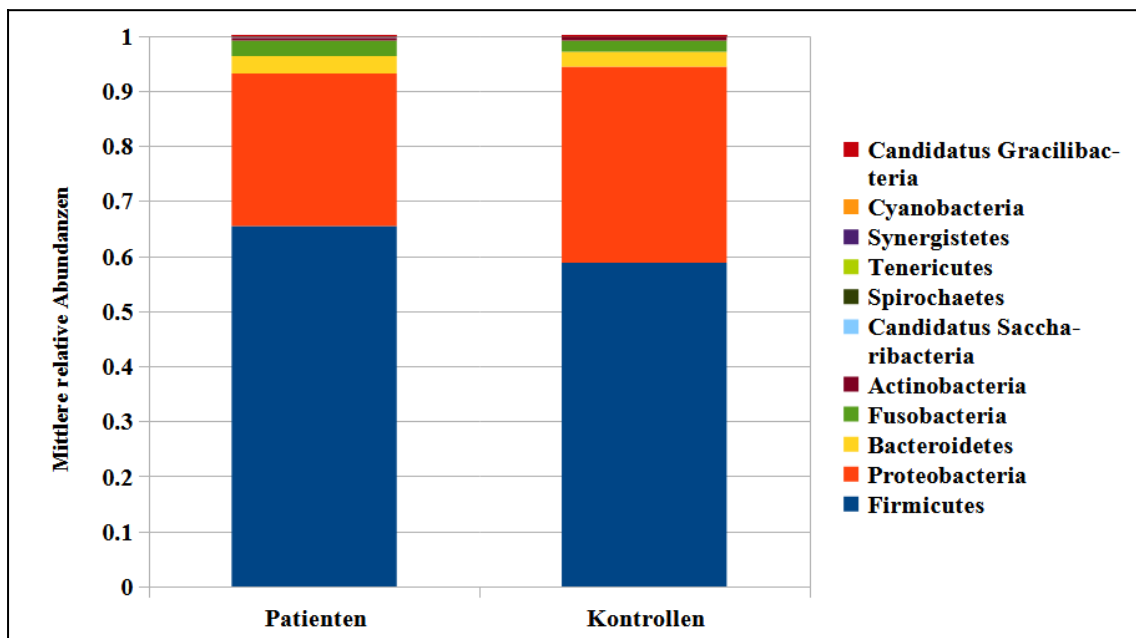
Spezies	Gruppe mit erhöhtem Vorkommen	Anzahl Treffer
[Eubacterium] minutum	Patienten	4
Peptoniphilus lacrimalis	Patienten	4
Lachnospiraceae bacterium Choco86	Kontrollen	4
Acidovorax temperans	Patienten	3
Mycoplasma salivarium	Patienten	3
Arthrobacter sp. YN	Kontrollen	3
Prevotella albensis	Kontrollen	3
Prevotella dentasini	Patienten	3
Alloscardovia omnicolens	Patienten	3
Ihubacter massiliensis	Patienten	3
Moryella indoligenes	Kontrollen	3
Propionibacterium acidifaciens	Patienten	3
Capnocytophaga ochracea	Patienten	3
Staphylococcus capitis	Kontrollen	3
Streptococcus constellatus	Patienten	3

3.4.2 Supragingival

3.4.2.1 Durchschnittliche relative Abundanzen

Insgesamt konnten im Rahmen der Full-Length-16S-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben 3414757 Reads mit einer mittleren Länge von 1375bp und einer mittleren Readzahl von 66956 sequenziert werden.

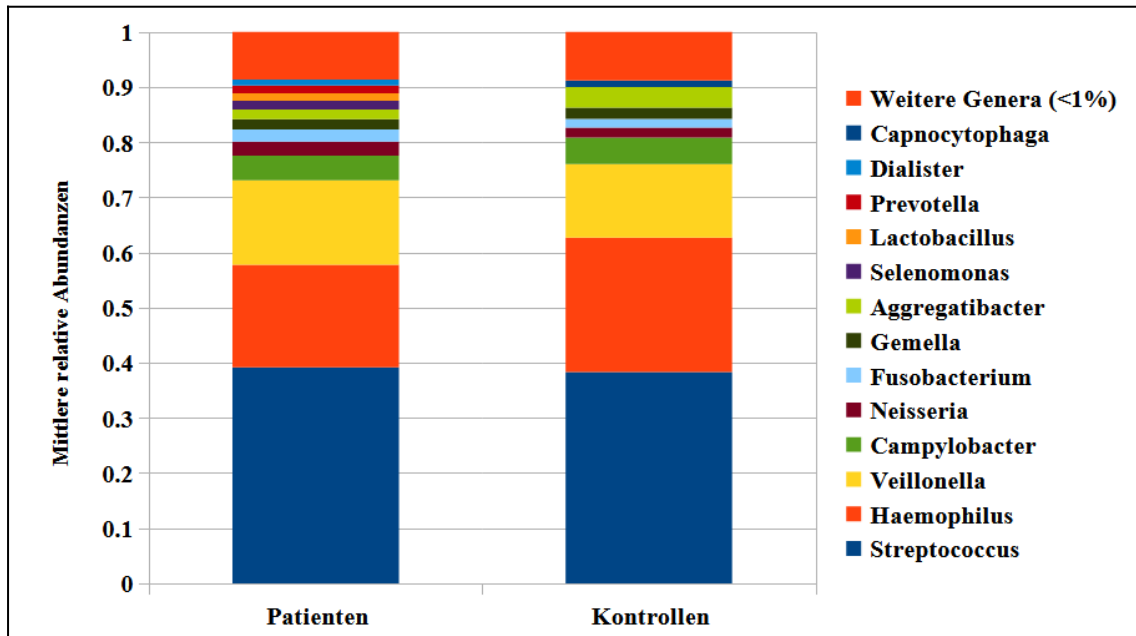
Die Phyla mit der höchsten relativen Abundanz über alle Proben hinweg waren Firmicutes mit 65,45% bei den Patienten und 58,78% bei den Kontrollen, Proteobacteria mit 27,66% bei den Patienten und 35,59% bei den Kontrollen, Bacteroidetes mit 3,16% bei den Patienten und 2,71% bei den Kontrollen und Fusobacteria mit 2,87% bei den Patienten und 2,07% bei den Kontrollen (siehe Figur14).



Figur 14 Verteilung der relativen Abundanzen auf Phylum-Ebene der Full-Length-16S-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben aufgeteilt nach Patienten und Kontrollen. Aufgeführt sind alle identifizierten Phyla.

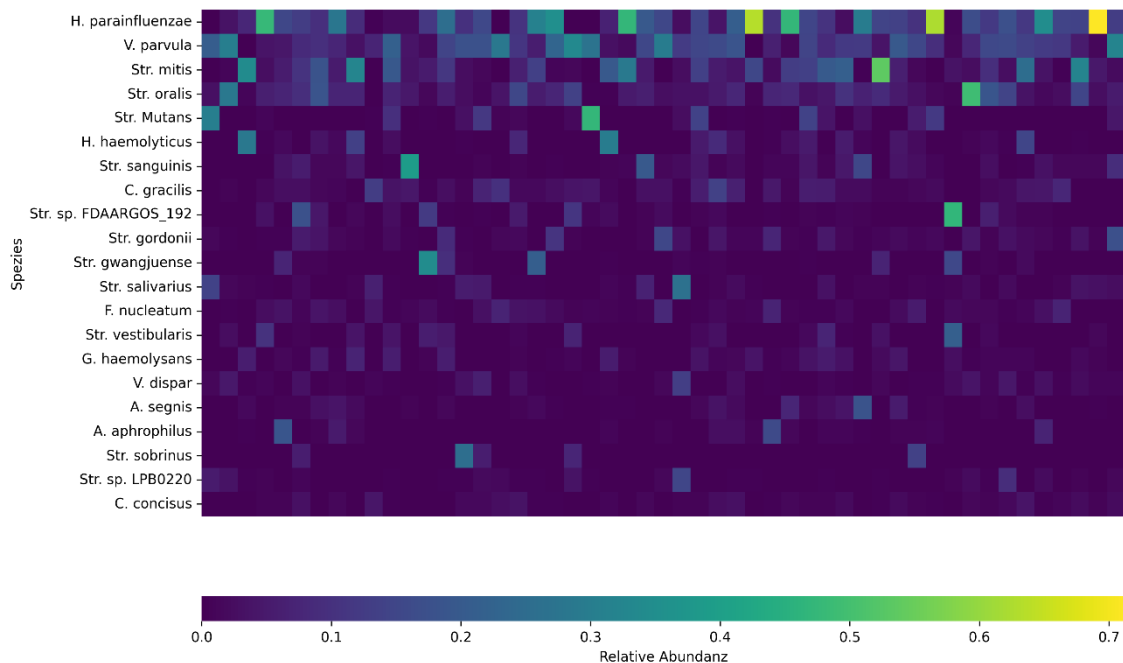
Auf Genus-Ebene konnten Streptococcus (39,16% bei den Patienten, 38,33% bei den Kontrollen), Haemophilus (18,59% bei den Patienten, 24,34% bei den Kontrollen), Veillonella (15,32% bei den Patienten, 13,37% bei den Kontrollen), Campylobacter (4,49% bei den Patienten, 4,77% bei den Kontrollen), Neisseria (2,51% bei den Patienten, 1,80% bei den Kontrollen) und Fusobacterium (2,23% bei den Patienten,

1,61% bei den Kontrollen) als Taxa mit hoher relativer Abundanz identifiziert werden (siehe Figur 15).



Figur 15 Verteilung der relativen Abundanzen auf Genus-Ebene der Full-Length-16S-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben aufgeteilt nach Patienten und Kontrollen. Aufgeführt sind alle identifizierten Genera mit einer relativen Abundanz von mindestens 1%, alle weiteren Genera sind gebündelt dargestellt.

Auf Spezies-Ebene konnten als Taxa mit hoher Abundanz absteigend geordnet unter anderem *Haemophilus parainfluenzae*, *Veillonella parvula*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans*, *Haemophilus haemolyticus*, *Streptococcus sanguinis* und *Campylobacter gracilis* identifiziert werden. Figur 16 zeigt die Verteilung der relativen Abundanzen aller Spezies, deren mittlere Abundanz über alle Proben hinweg mindestens 1% erreicht (siehe Figur 16).



Figur 16 Heatmap zur Darstellung der relativen Abundanzen auf Spezies-Ebene der Full-Length-16S-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben. Von links nach rechts sind zunächst alle Patienten, gefolgt von allen Kontrollen dargestellt. Aufgeführt sind alle identifizierten Spezies mit einer relativen Abundanz von mindestens 1% über alle Proben hinweg, alle weiteren Spezies sind nicht aufgeführt. Von oben nach unten sind die Spezies absteigend geordnet nach ihrer mittleren Abundanz.

3.4.2.2 Alpha-Diversität

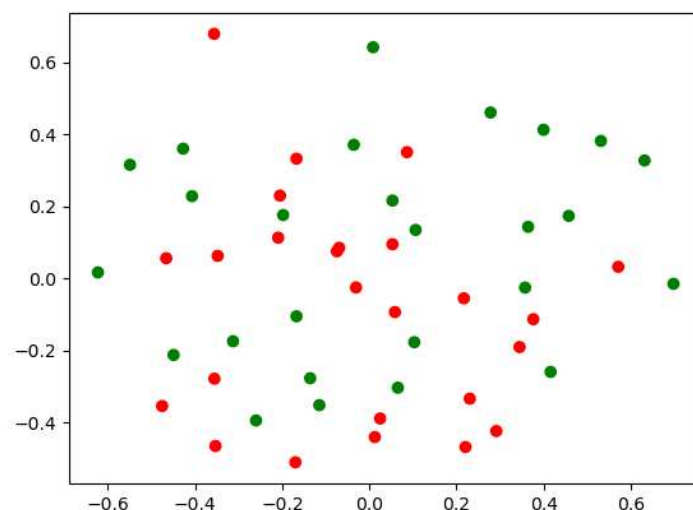
Die Alpha-Diversität wurde in Form des Simpson- und Shannon-Index ermittelt. Die absoluten Readzahlen wurden hierfür mit SRS in R auf eine Gesamt-Readzahl von 2626 Reads, entsprechend der Readzahl der Probe mit der geringsten Sequenzierungstiefe normalisiert.

Simpson- und Shannon-Index wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung und mittels Levene's-Test auf Varianzhomogenität getestet, wobei beide Tests Varianzhomogenität, jedoch der Simpson-Index im Gegensatz zum Shannon-Index keine Normalverteilung zeigten. Der Simpson-Index wurde daher mittels Mann-Whitney-U- und der Shannon-Index mittels T-Test für unabhängige Stichproben analysiert. Dabei ergab sich für beide Indizes kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen (siehe 8.5 Weitere Tabellen).

3.4.2.3 Beta-Diversität

Wie in 3.3.3 Beta-Diversität beschrieben wurde die Beta-Diversität mittels Bray-Curtis-Dissimilarität und PCoA, LEfSe und ANCOM-BC2 analysiert. Im Folgenden werden die Ergebnisse auf Spezies-Ebene beschrieben. Für die Ergebnisse der anderen taxonomischen Ebenen siehe 8.5 Weitere Tabellen und 8.6 Weitere Graphen.

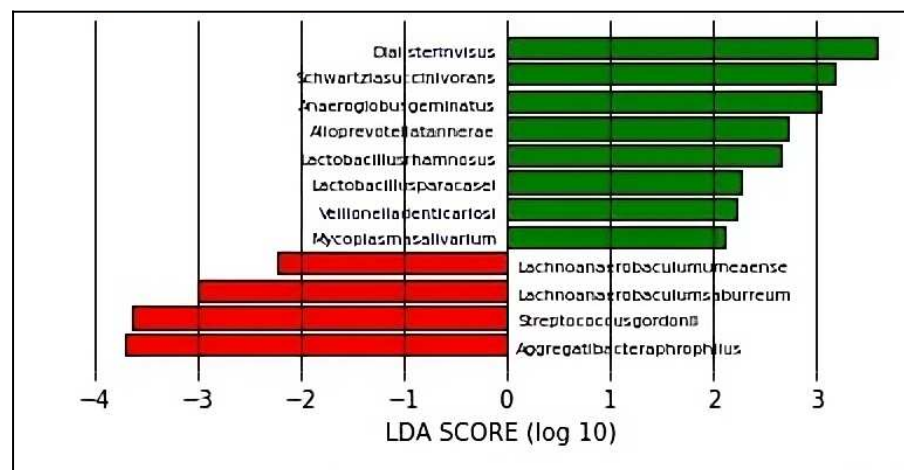
Bei der Analyse der Full-Length-16S-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben wurden insgesamt 321 unterschiedliche Spezies identifiziert. Für die Bray-Curtis-Dissimilarität wurden die Proben auf die Anwesenheit und Abundanz dieser Bakterien-Spezies hin untersucht und anschließend die PCoA durchgeführt. Die PCoA zeigt dabei eine weniger deutliche Trennung zwischen Patienten (in grün) und Kontrollen (in rot) als die salivaren Proben der metagenomischen Sequenzierung (siehe 3.3.3 Beta-Diversität). Trotzdem lässt sich eine weitere Streuung der Proben aus der Patientengruppe erkennen, in etwa vergleichbar mit den Ergebnissen der Full-Length-16S-Sequenzierung der salivaren Proben (siehe 3.4.1.3 Beta-Diversität) (siehe Figur 17).



Figur 17 PCoA basierend auf der Bray-Curtis-Dissimilarität der Full-Length-16S-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben. Patienten sind in grün und Kontrollen in rot dargestellt. Die Proben der Kontrollgruppe zeigen eine engere Gruppierung, während die Proben der Patientengruppe weiter gestreut sind.

Im Rahmen der differentiellen Abundanz-Analyse mit LEfSe wurden zwölf Bakterien-Spezies identifiziert, deren relative Abundanz sich zwischen Patienten- und Kontrollgruppe statistisch signifikant unterschied und die im Rahmen der linearen Diskriminanz-Analyse mindestens einen LDA-Score von 2, beziehungsweise -2 erreicht haben.

Absteigend geordnet nach LDA-Score wurden *Dialister invisus*, *Schwartzia succinivorans*, *Anaeroglobus geminatus*, *Alloprevotella tannerae*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Veillonella dentocariosa* und *Mycoplasma salivarium* als Spezies mit höherer Abundanz in der Patientengruppe und *Aggregatibacter aphrophilus*, *Streptococcus gordonii*, *Lachnoanaerobaculum saburreum* und *Lachnoanaerobaculum umeaense* als Spezies mit höherer Abundanz in der Kontrollgruppe identifiziert (siehe Figur 18 und Tabelle 10).



Figur 18 Bakterien-Spezies, die mittels LEfSe im Rahmen der Analyse der Full-Length-16S-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben als statistisch signifikant identifiziert wurden. Dargestellt sind Taxa, die im Rahmen der linearen Diskriminanz-Analyse einen LDA-Score von mindestens 2, beziehungsweise -2 erreicht haben. Insgesamt konnten zwölf Bakterien-Spezies identifiziert werden, die als potentielle Biomarker zur Differenzierung der beiden Gruppen mit höherer Abundanz in der Patienten-Gruppe (in grün), beziehungsweise Kontroll-Gruppe (in rot) dienen können.

Tabelle 10 Mit LEfSe identifizierte Bakterien-Spezies in der Full-Length-16S-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben geordnet nach LDA-Score.

Taxon	Gruppe mit erhöhtem Vorkommen	LDA-Score (log10)
Dialister invisus	Patienten	3,58
Schwartzia succinivorans	Patienten	3,18
Anaeroglobus geminatus	Patienten	3,04
Alloprevotella tannerae	Patienten	2,73
Lactobacillus rhamnosus	Patienten	2,67
Lactobacillus paracasei	Patienten	2,27
Veillonella denticariosi	Patienten	2,22
Mycoplasma salivarium	Patienten	2,11
Lachnoanaerobaculum umeanse	Kontrollen	-2,22
Lachnoanaerobaculum saburreum	Kontrollen	-3,01
Streptococcus gordonii	Kontrollen	-3,64
Aggregatibacter aphrophilus	Kontrollen	-3,71

Mit ANCOM-BC2 konnten insgesamt 36 Bakterien-Spezies identifiziert werden, deren absolute Readzahl einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollgruppe zeigte. Davon kamen zwölf Spezies mit einer höheren Abundanz in der Patienten- und 24 mit einer höheren Abundanz in der Kontrollgruppe vor. Absteigend geordnet nach der Log-fold-change wurden dabei *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus vaginalis*, *Prevotella denticola*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Prevotella nigrescens*, *Colibacter massiliensis*, *Neisseria sicca*, *Streptococcus periodonticum*, *Haemophilus pittmaniae*, *Prevotella oulorum* und *Schwartzia succinivorans* als Taxa mit höherer Abundanz in der Patientengruppe identifiziert. In der Kontrollgruppe konnten unter anderem *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus pseudopneumoniae*, *Neisseria cinerea*, *Haemophilus sputorum*, *Tannerella* sp. oral taxon HOT-286, *Aggregatibacter segnis*, *Prevotella pleuritidis* und *Capnocytophaga granulosa* als Taxa mit höherer Abundanz identifiziert werden (siehe Figur 19 und Tabelle 11).

Zusätzlich konnten 15 Spezies als hinreichend prävalente strukturelle Nullen identifiziert werden, wobei alle in der Patientengruppe identifiziert wurden (siehe Tabelle 12). Sieben der 36 identifizierten Bakterien-Spezies blieben dabei außerdem im Rahmen der Sensitivitäts-Analyse mit aufsteigenden Pseudo-Counts weiterhin statistisch signifikant. Diese Spezies waren *Haemophilus pittmaniae*, *Streptococcus parasanguinis*, *Campylobacter concisus*, *Streptococcus* sp. oral taxon 431, *Kingella oralis*, *Aggregatibacter aphrophilus* und *Haemophilus sputorum*. Außerdem konnten die

Spezies *Schwartzia succinivorans*, *Lachnoanaerobaculum saburreum* und *Aggregatibacter aphrophilus* sowohl mittels LEfSe, als auch ANCOM-BC2 identifiziert werden.

Figur 19 Bakterien-Spezies, die mittels ANCOM-BC2 im Rahmen der Analyse der Full-Length-16S-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben als statistisch signifikant identifiziert wurden. Dargestellt ist die Log-fold-change mit Standardfehler der Patienten- zur Kontroll-Gruppe als Wasserfall-Diagramm. Taxa mit höherer Abundanz in der Patienten-Gruppe sind in grün und für die Kontroll-Gruppe in rot dargestellt. Insgesamt konnten 36 Bakterien-Spezies identifiziert werden, deren Abundanz zwischen den beiden Gruppen einen statistisch signifikanten Unterschied zeigte.

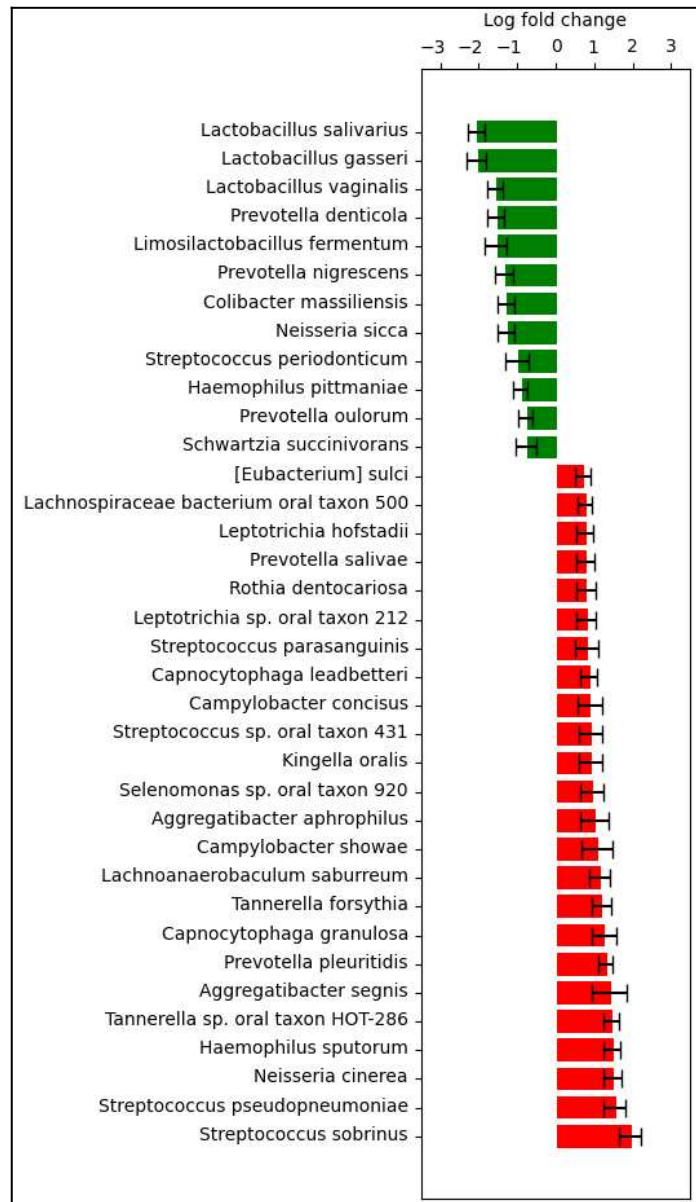


Tabelle 11 Mit ANCOM-BC2 identifizierte Bakterien-Spezies der Full-Length-16S-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben geordnet nach Log-fold-change. Aufgeführt sind außerdem der adjustierte p-Wert und das Ergebnis der Sensitivitätsanalyse mit aufsteigenden Pseudo-Counts.

Taxon	Log-fold-change	Standardfehler	p-Wert	Robust nach Sensitivitätsanalyse
Lactobacillus salivarius	-2.07	0.21	<0.01	FALSE
Lactobacillus gasseri	-2.06	0.26	<0.01	FALSE
Lactobacillus vaginalis	-1.56	0.20	0.02	FALSE
Prevotella denticola	-1.55	0.21	0.01	FALSE
Limosilactobacillus fermentum	-1.55	0.29	0.02	FALSE
Prevotella nigrescens	-1.35	0.24	<0.01	FALSE
Colibacter massiliensis	-1.29	0.21	0.03	FALSE
Neisseria sicca	-1.29	0.23	0.01	FALSE
Streptococcus periodonticum	-1.01	0.29	0.03	FALSE
Haemophilus pittmaniae	-0.92	0.18	0.03	TRUE
Prevotella oulorum	-0.78	0.19	0.02	FALSE
Schwartzia succinivorans	-0.76	0.27	0.04	FALSE
[Eubacterium] sulci	0.70	0.21	0.03	FALSE
Lachnospiraceae bacterium oral taxon 500	0.76	0.19	0.04	FALSE
Leptotrichia hofstadii	0.77	0.22	0.03	FALSE
Prevotella salivae	0.77	0.25	0.04	FALSE
Rothia dentocariosa	0.78	0.26	0.04	FALSE
Leptotrichia sp. oral taxon 212	0.79	0.25	0.03	FALSE
Streptococcus parasanguinis	0.80	0.29	0.04	TRUE
Capnocytophaga leadbetteri	0.86	0.23	0.02	FALSE
Campylobacter concisus	0.89	0.33	<0.05 (0,049)	TRUE
Streptococcus sp. oral taxon 431	0.90	0.31	0.03	TRUE
Kingella oralis	0.91	0.31	0.04	TRUE
Selenomonas sp. oral taxon 920	0.95	0.30	0.03	FALSE
Aggregatibacter aphrophilus	1.01	0.36	0.04	TRUE
Campylobacter showae	1.07	0.39	0.04	FALSE
Lachnoanaerobaculum saburreum	1.15	0.26	<0.01	FALSE
Tannerella forsythia	1.19	0.24	0.01	FALSE
Capnocytophaga granulosa	1.25	0.32	0.01	FALSE
Prevotella pleuritidis	1.30	0.19	0.03	FALSE
Aggregatibacter segnis	1.40	0.45	0.03	FALSE
Tannerella sp. oral taxon HOT-286	1.43	0.20	<0.01	FALSE
Haemophilus sputorum	1.47	0.22	0.03	TRUE
Neisseria cinerea	1.49	0.23	0.03	FALSE

Streptococcus pseudopneumoniae	1.53	0.29	0.03	FALSE
Streptococcus sobrinus	1.93	0.28	0.02	FALSE

Tabelle 12 Spezies der Full-Length-16S-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben, die mittels ANCOM-BC2 als strukturelle Nullen identifiziert wurden. Dargestellt sind Taxa, die in mindestens drei Proben identifiziert wurden. Aufgeführt sind die Gruppe, in der ein höheres Vorkommen identifiziert wurde, sowie die Anzahl an Probanden bei denen die Spezies identifiziert werden konnte.

Spezies	Gruppe mit erhöhtem Vorkommen	Anzahl Treffer
Lactobacillus paracasei	Patienten	5
Veillonella denticariosi	Patienten	4
Lancefieldella parvula	Patienten	4
Lactobacillus rhamnosus	Patienten	4
Mycoplasma salivarium	Patienten	4
Lactobacillus crispatus	Patienten	3
Prevotella baroniae	Patienten	3
Lancefieldella rimae	Patienten	3
[Eubacterium] infirmum	Patienten	3
Dialister microaerophilus	Patienten	3
Shuttleworthia satelles	Patienten	3
Candidatus Saccharibacteria oral taxon TM7x	Patienten	3
Ottowia sp. oral taxon 894	Patienten	3
Actinomyces graevenitzi	Patienten	3
Treponema amylovorum	Patienten	3

3.5 Short-Read-16S-Sequenzierung

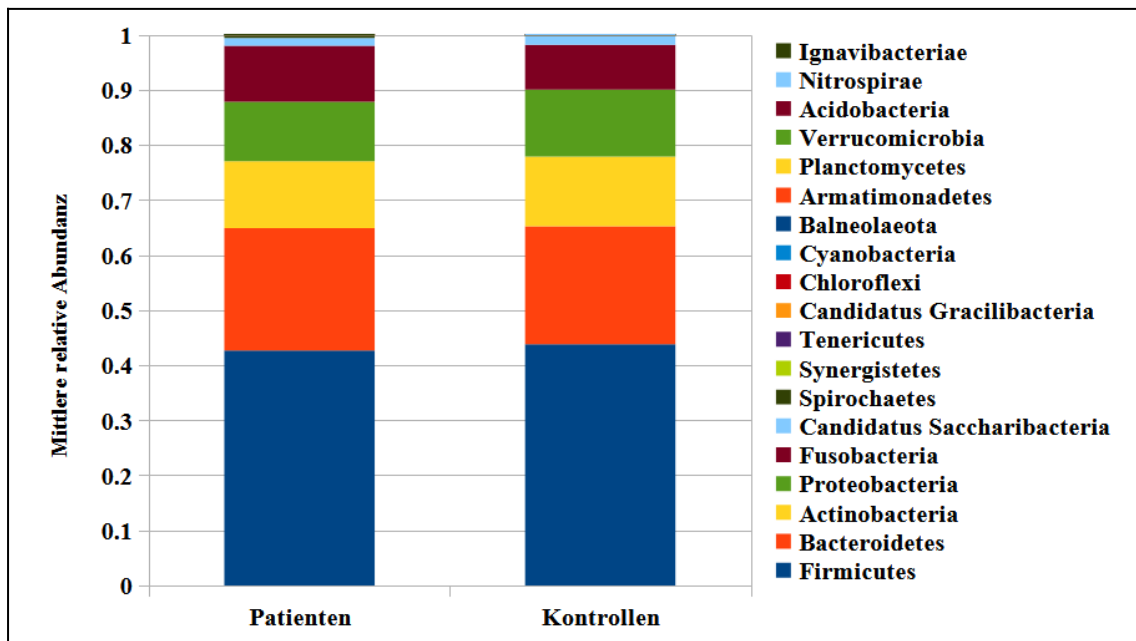
3.5.1 Saliva

3.5.1.1 Durchschnittliche relative Abundanzen

Insgesamt konnten im Rahmen der Short-Read-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben 105339270 Reads mit einer mittleren Länge von 561bp und einer mittleren Readzahl von 2106785 sequenziert werden.

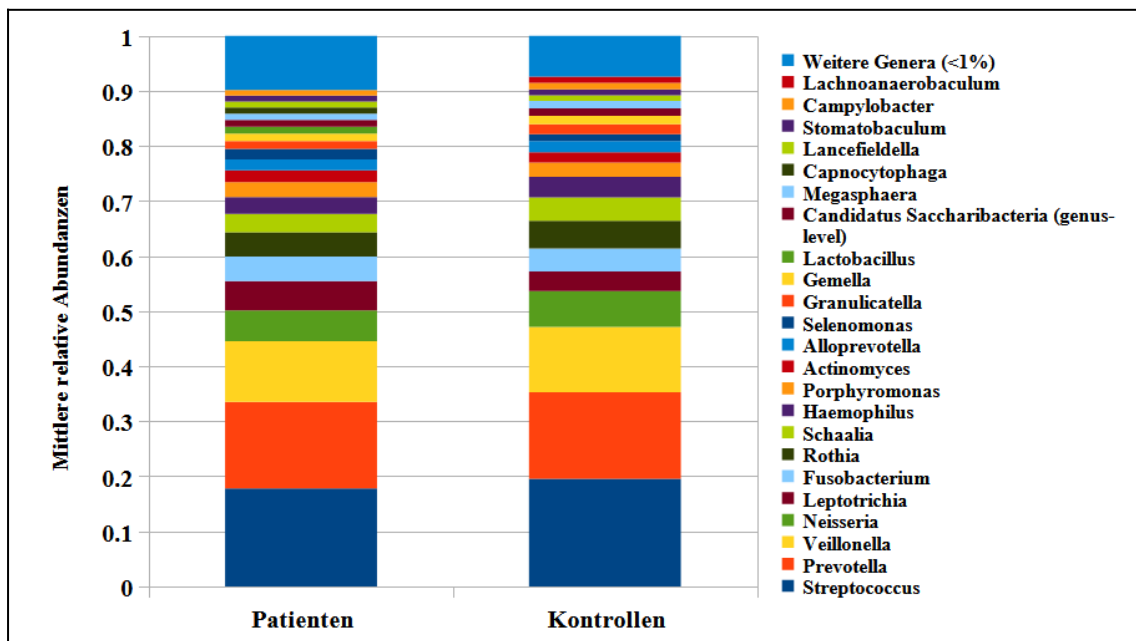
Die Phyla mit der höchsten relativen Abundanz über alle Proben hinweg waren Firmicutes mit 42,65% bei den Patienten und 43,78% bei den Kontrollen, Bacteroidetes

mit 22,24% bei den Patienten und 21,46% bei den Kontrollen, Actinobacteria mit 12,12% bei den Patienten und 12,64% bei den Kontrollen, Proteobacteria mit 10,82% bei den Patienten und 12,16% bei den Kontrollen und Fusobacteria mit 10,19% bei den Patienten und 8,11% bei den Kontrollen (siehe Figur 20).



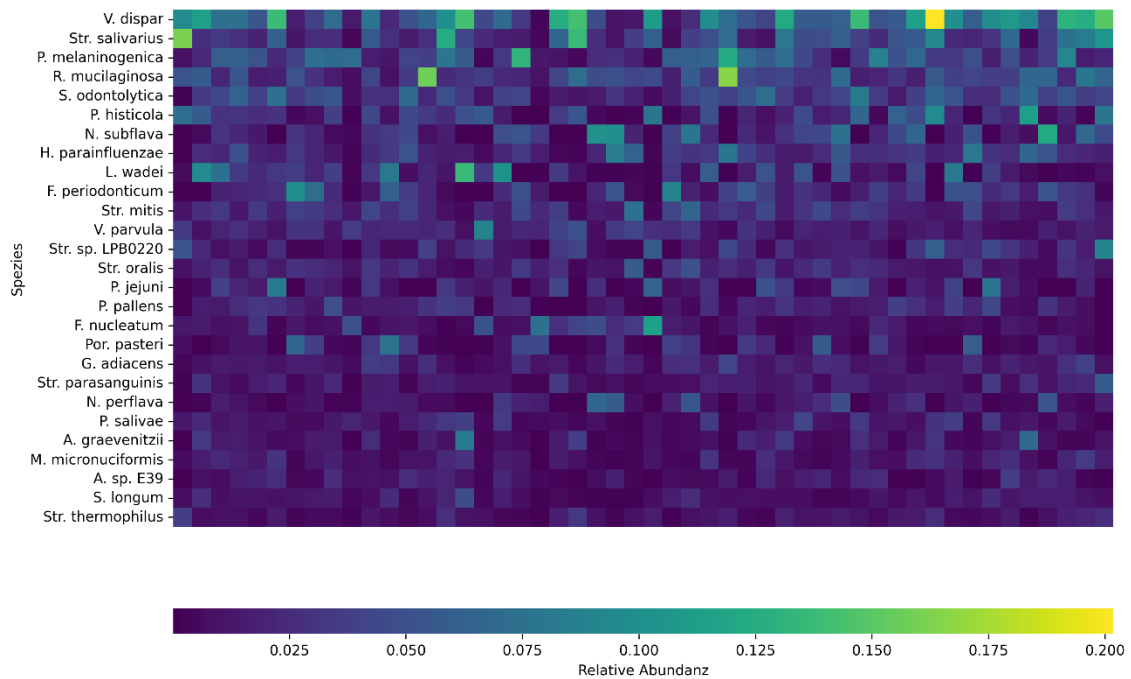
Figur 20 Verteilung der relativen Abundanzen auf Phylum-Ebene der Short-Read-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben aufgeteilt nach Patienten und Kontrollen. Aufgeführt sind alle identifizierten Phyla.

Auf Genus-Ebene konnten Streptococcus (17,81% bei den Patienten, 19,54% bei den Kontrollen), Prevotella (15,71% bei den Patienten, 15,73% bei den Kontrollen), Veillonella (11,02% bei den Patienten, 11,87% bei den Kontrollen), Neisseria (5,57% bei den Patienten, 6,50% bei den Kontrollen), Leptotrichia (5,33% bei den Patienten, 3,54% bei den Kontrollen), Fusobacterium (4,49% bei den Patienten, 4,19% bei den Kontrollen), Rothia (4,37% bei den Patienten, 5,06% bei den Kontrollen), Schaalia (3,36% bei den Patienten, 4,24% bei den Kontrollen), Haemophilus (3,07% bei den Patienten, 3,72% bei den Kontrollen), Porphyromonas (2,70% bei den Patienten, 2,58% bei den Kontrollen), Actinomyces (2,12% bei den Patienten, 1,85% bei den Kontrollen) und Alloprevotella (2,01% bei den Patienten, 2,03% bei den Kontrollen) als Taxa mit hoher relativer Abundanz identifiziert werden (siehe Figur 21).



Figur 21 Verteilung der relativen Abundanzen auf Genus-Ebene der Short-Read-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben aufgeteilt nach Patienten und Kontrollen. Aufgeführt sind alle identifizierten Genera mit einer relativen Abundanz von mindestens 1%, alle weiteren Genera sind gebündelt dargestellt.

Auf Spezies-Ebene konnten als Taxa mit hoher Abundanz absteigend geordnet unter anderem Veillonella dispar, Streptococcus salivarius, Prevotella melaninogenica, Rothia mucilaginosa, Schaalia odontolytica, Prevotella histicola, Neisseria subflava, Haemophilus parainfluenzae und Leptotrichia wadei identifiziert werden. Figur 22 zeigt die Verteilung der relativen Abundanzen aller Spezies, deren mittlere Abundanz über alle Proben hinweg mindestens 1% erreicht (siehe Figur 22).



Figur 22 Heatmap zur Darstellung der relativen Abundanzen auf Spezies-Ebene der Short-Read-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben. Von links nach rechts sind zunächst alle Patienten, gefolgt von allen Kontrollen dargestellt. Aufgeführt sind alle identifizierten Spezies mit einer relativen Abundanz von mindestens 1% über alle Proben hinweg, alle weiteren Spezies sind nicht aufgeführt. Von oben nach unten sind die Spezies absteigend geordnet nach ihrer mittleren Abundanz.

3.5.1.2 Alpha-Diversität

Die Alpha-Diversität wurde in Form des Simpson- und Shannon-Index ermittelt. Die absoluten Readzahlen wurden hierfür mit SRS in R auf eine Gesamt-Readzahl von 768222 Reads, entsprechend der Readzahl der Probe mit der geringsten Sequenzierungstiefe normalisiert.

Simpson- und Shannon-Index wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung und mittels Levene's-Test auf Varianzhomogenität getestet, wobei beide Tests Varianzhomogenität, jedoch der Simpson-Index im Gegensatz zum Shannon-Index keine Normalverteilung zeigten. Der Simpson-Index wurde daher mittels Mann-Whitney-U- und der Shannon-Index mittels T-Test für unabhängige Stichproben analysiert. Dabei ergab sich für den Simpson-Index kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen. Es zeigte sich jedoch ein signifikant höheres

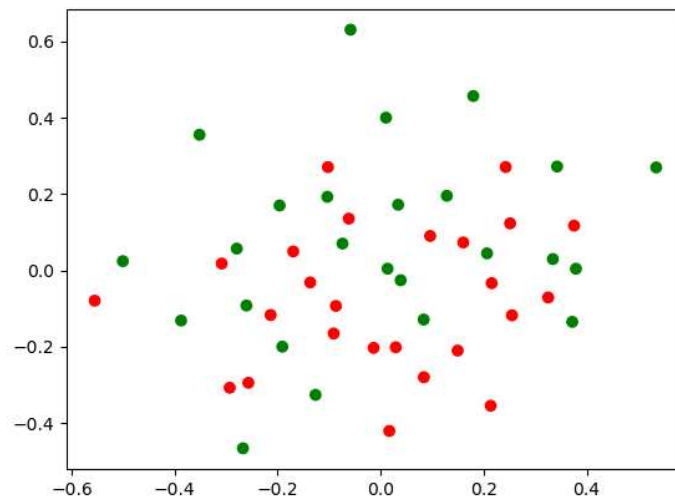
Ergebnis des Shannon-Index in der Patientengruppe ($p = 0,028$; 95%-KI: 0,022; 0,36) (siehe 8.5 Weitere Tabellen).

3.5.1.3 Beta-Diversität

Wie in 3.3.3 Beta-Diversität beschrieben wurde die Beta-Diversität mittels Bray-Curtis-Dissimilarität und PCoA, LEfSe und ANCOM-BC2 analysiert. Im Folgenden werden die Ergebnisse auf Spezies-Ebene beschrieben. Für die Ergebnisse der anderen taxonomischen Ebenen siehe 8.5 Weitere Tabellen und 8.6 Weitere Graphen.

Bei der Analyse der Short-Read-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben wurden insgesamt 897 unterschiedliche Spezies identifiziert. Für die Bray-Curtis-Dissimilarität wurden die Proben auf die Anwesenheit und Abundanz dieser Bakterien-Spezies hin untersucht und anschließend die PCoA durchgeführt.

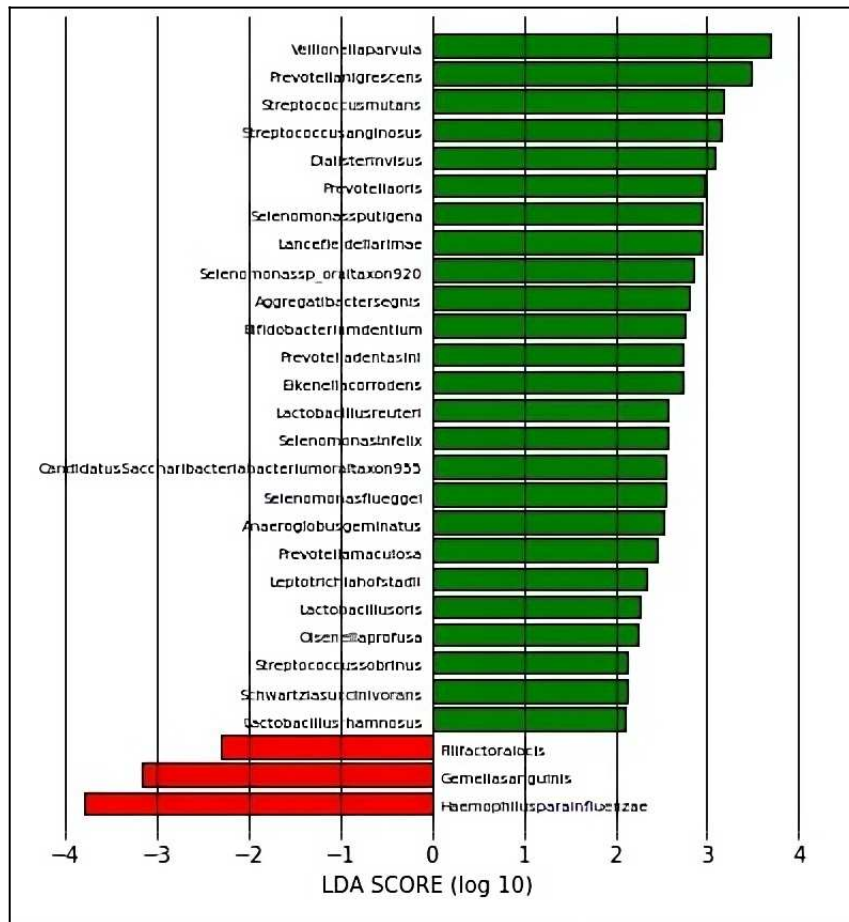
Die PCoA zeigt dabei eine Trennung zwischen Patienten (in grün) und Kontrollen (in rot), vergleichbar mit den salivaren Proben der metagenomischen Sequenzierung (siehe 3.3.3 Beta-Diversität) und stärker ausgeprägt als bei den salivaren und supragingivalen Proben der Full-Length-16S-Sequenzierung (siehe 3.4.1.3 Beta-Diversität und 3.4.2.3 Beta-Diversität). Es lässt sich eine weitere Streuung der Proben aus der Patientengruppe erkennen, während die Proben der Kontrollgruppe enger gruppiert sind (siehe Figur 23).



Figur 23 PCoA basierend auf der Bray-Curtis-Dissimilarität der Short-Read-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben. Patienten sind in grün und Kontrollen in rot dargestellt. Die Proben der Kontrollgruppe zeigen eine engere Gruppierung, während die Proben der Patientengruppe weiter gestreut sind.

Im Rahmen der differentiellen Abundanz-Analyse mit LEfSe wurden 28 Bakterien-Spezies identifiziert, deren relative Abundanz sich zwischen Patienten- und Kontrollgruppe statistisch signifikant unterschied und die im Rahmen der linearen Diskriminanz-Analyse mindestens einen LDA-Score von 2, beziehungsweise -2 erreicht haben.

Absteigend geordnet nach LDA-Score wurden unter anderem *Veillonella parvula*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus anginosus*, *Dialister invisus*, *Prevotella oris*, *Selenomonas sputigena* und *Lancefieldella rimae* als Spezies mit höherer Abundanz in der Patientengruppe und *Haemophilus parainfluenzae*, *Gemella sanguinis* und *Filifactor alocis* als Spezies mit höherer Abundanz in der Kontrollgruppe identifiziert (siehe Figur 24 und Tabelle 13).



Figur 24 Bakterien-Spezies, die mittels LEfSe im Rahmen der Analyse der Short-Read-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben als statistisch signifikant identifiziert wurden. Dargestellt sind Taxa, die im Rahmen der linearen Diskriminanz-Analyse einen LDA-Score von mindestens 2, beziehungsweise -2 erreicht haben. Insgesamt konnten 28 Bakterien-Spezies identifiziert werden, die als potentielle Biomarker zur Differenzierung der beiden Gruppen mit höherer Abundanz in der Patienten-Gruppe (in grün), beziehungsweise Kontroll-Gruppe (in rot) dienen können.

Tabelle 13 Mit LEfSe identifizierte Bakterien-Spezies in der Short-Read-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben geordnet nach LDA-Score.

Taxon	Gruppe mit erhöhtem Vorkommen	LDA-Score (log10)
Veillonella parvula	Patienten	3,68
Prevotella nigrescens	Patienten	3,48
Streptococcus mutans	Patienten	3,19
Streptococcus anginosus	Patienten	3,16
Dialister invisus	Patienten	3,09
Prevotella oris	Patienten	2,97
Selenomonas sputigena	Patienten	2,95
Lancefieldella rimae	Patienten	2,94
Selenomonas sp_oraltaxon920	Patienten	2,85
Aggregatibacter segnis	Patienten	2,81
Bifidobacterium dentium	Patienten	2,75
Prevotella dentasini	Patienten	2,73
Eikenella corrodens	Patienten	2,72
Lactobacillus reuteri	Patienten	2,56
Selenomonas infelix	Patienten	2,56
Candidatus_saccharibacteria_bacterium_oraltaxon955	Patienten	2,55
Selenomonas flueggei	Patienten	2,54
Anaeroglobus geminatus	Patienten	2,52
Prevotella maculosa	Patienten	2,46
Leptotrichia hofstadii	Patienten	2,33
Lactobacillus oris	Patienten	2,28
Olsenella profusa	Patienten	2,25
Streptococcus sobrinus	Patienten	2,13
Schwartzia succinivorans	Patienten	2,12
Lactobacillus rhamnosus	Patienten	2,11
Filifactor alocis	Kontrollen	-2,31
Gemella sanguinis	Kontrollen	-3,16
Haemophilus parainfluenzae	Kontrollen	-3,80

Mit ANCOM-BC2 konnten insgesamt 49 Bakterien-Spezies identifiziert werden, deren absolute Readzahl einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollgruppe zeigte. Davon kamen 31 Spezies mit einer höheren Abundanz in der Patienten- und 18 mit einer höheren Abundanz in der Kontrollgruppe vor. Absteigend geordnet nach der Log-fold-change wurden dabei unter anderem Lactobacillus crispatus, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus rhamnosus, Neisseria dentiae, Prevotella multisaccharivorax, Bergeyella porcorum, Bergeriella dentrificans, Neisseria sp. KEM232, Lactobacillus paracasei, Streptococcus anginosus und Prevotella

nigrescens als Taxa mit höherer Abundanz in der Patientengruppe identifiziert. In der Kontrollgruppe konnten unter anderem *Lactobacillus delbrueckii*, *Staphylococcus capitis*, *Mannheimia granulomatis*, *Lactobacillus frumenti*, *Lactobacillus kitasatonis*, *Sneathia sanguinegens*, *Microthricus speluncae* und *Prevotella enoeca* als Taxa mit höherer Abundanz identifiziert werden (siehe Figur 25 und Tabelle 14).

Zusätzlich konnten 19 Spezies als hinreichend prävalente strukturelle Nullen identifiziert werden, wovon 14 in der Patienten- und fünf in der Kontrollgruppe identifiziert wurden (siehe Tabelle 15). Acht der 49 identifizierten Bakterien-Spezies blieben dabei außerdem im Rahmen der Sensitivitäts-Analyse mit aufsteigenden Pseudo-Counts weiterhin statistisch signifikant. Diese Spezies waren *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus anginosus*, *Prevotella nigrescens*, *Lactobacillus oris*, *Prevotella maculosa*, *Selenomonas* sp. oral taxon 920, *Prevotella koreensis* und *Staphylococcus capitis*. Außerdem konnten die Spezies *Prevotella nigrescens*, *Lactobacillus oris*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Prevotella maculosa*, *Streptococcus anginosus* und *Selenomonas* sp. oral taxon 920 sowohl mittels LEfSe, als auch ANCOM-BC2 identifiziert werden.

Figur 25 Bakterien-Spezies, die mittels ANCOM-BC2 im Rahmen der Analyse der Short-Read-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben als statistisch signifikant identifiziert wurden. Dargestellt ist die Log-fold-change mit Standardfehler der Patienten- zur Kontroll-Gruppe als Wasserfall-Diagramm. Taxa mit höherer Abundanz in der Patienten-Gruppe sind in grün und für die Kontroll-Gruppe in rot dargestellt. Insgesamt konnten 49 Bakterien-Spezies identifiziert werden, deren Abundanz zwischen den beiden Gruppen einen statistisch signifikanten Unterschied zeigte.

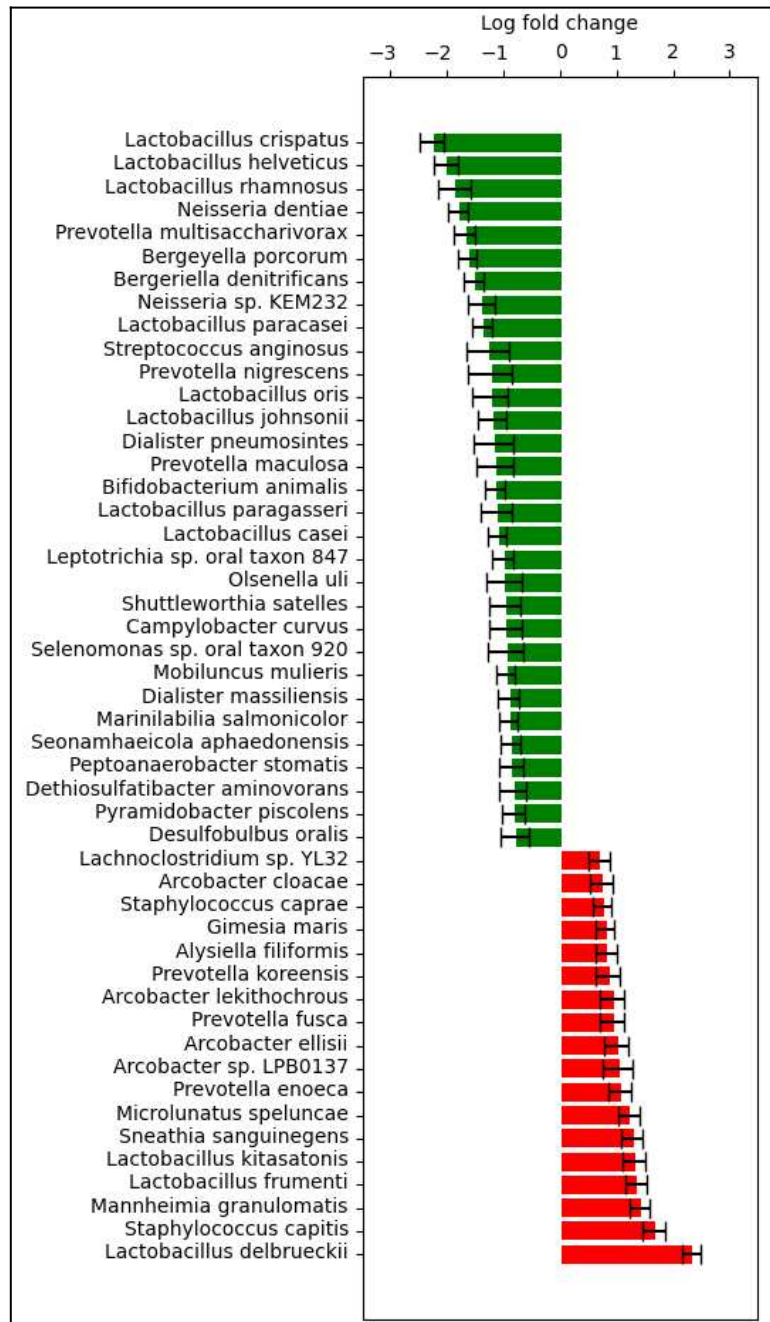


Tabelle 14 Mit ANCOM-BC2 identifizierte Bakterien-Spezies der Short-Read-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben geordnet nach Log-fold-change. Aufgeführt sind außerdem der adjustierte p-Wert und das Ergebnis der Sensitivitätsanalyse mit aufsteigenden Pseudo-Counts.

Taxon	Log-fold-change	Standardfehler	p-Wert	Robust nach Sensitivitätsanalyse
Lactobacillus crispatus	-2.27	0.21	0.02	FALSE
Lactobacillus helveticus	-2.02	0.22	0.01	FALSE
Lactobacillus rhamnosus	-1.87	0.30	0.01	TRUE
Neisseria dentiae	-1.80	0.18	0.03	FALSE
Prevotella multisaccharivorax	-1.68	0.19	0.02	FALSE
Bergeyella porcorum	-1.64	0.17	0.02	FALSE
Bergeriella denitrificans	-1.53	0.17	0.03	FALSE
Neisseria sp. KEM232	-1.39	0.24	0.02	FALSE
Lactobacillus paracasei	-1.38	0.18	0.01	FALSE
Streptococcus anginosus	-1.27	0.38	0.03	TRUE
Prevotella nigrescens	-1.23	0.39	0.03	TRUE
Lactobacillus oris	-1.23	0.32	0.04	TRUE
Lactobacillus johnsonii	-1.20	0.25	0.02	FALSE
Dialister pneumosintes	-1.18	0.35	0.02	FALSE
Prevotella maculosa	-1.15	0.32	0.02	TRUE
Bifidobacterium animalis	-1.15	0.17	0.02	FALSE
Lactobacillus paragasseri	-1.13	0.28	0.03	FALSE
Lactobacillus casei	-1.11	0.16	0.02	FALSE
Leptotrichia sp. oral taxon 847	-1.01	0.19	0.02	FALSE
Olsenella uli	-1.00	0.31	0.03	FALSE
Shuttleworthia satelles	-0.98	0.28	0.02	FALSE
Campylobacter curvus	-0.97	0.28	0.03	FALSE
Selenomonas sp. oral taxon 920	-0.96	0.31	0.03	TRUE
Mobiluncus mulieris	-0.96	0.16	0.03	FALSE
Dialister massiliensis	-0.91	0.19	0.02	FALSE
Marinilabilia salmonicolor	-0.91	0.16	0.01	FALSE
Seonamhaeicola aphaedonensis	-0.88	0.17	0.02	FALSE
Peptoanaerobacter stomatis	-0.87	0.20	0.02	FALSE
Dethiosulfatibacter aminovorans	-0.83	0.24	0.03	FALSE
Pyramidobacter piscicolens	-0.82	0.20	0.04	FALSE
Desulfobulbus oralis	-0.80	0.24	0.03	FALSE
Lachnoclostridium sp. YL32	0.69	0.18	0.03	FALSE
Arcobacter cloacae	0.73	0.20	0.03	FALSE
Staphylococcus caprae	0.75	0.16	0.03	FALSE
Gimesia maris	0.80	0.17	0.02	FALSE
Alysiella filiformis	0.81	0.19	0.02	FALSE

Prevotella koreensis	0.84	0.22	0.04	TRUE
Arcobacter lekithochrous	0.92	0.20	0.02	FALSE
Prevotella fusca	0.93	0.21	0.02	FALSE
Arcobacter ellisii	1.00	0.22	0.02	FALSE
Arcobacter sp. LPB0137	1.02	0.26	0.02	FALSE
Prevotella enoeca	1.06	0.21	0.02	FALSE
Microbunus speluncae	1.22	0.18	0.02	FALSE
Sneathia sanguinegens	1.27	0.19	0.01	FALSE
Lactobacillus kitasatonis	1.30	0.20	0.02	FALSE
Lactobacillus frumenti	1.33	0.19	0.01	FALSE
Mannheimia granulomatis	1.40	0.17	0.01	FALSE
Staphylococcus capitis	1.66	0.20	0.02	TRUE
Lactobacillus delbrueckii	2.32	0.16	0.01	FALSE

Tabelle 15 Spezies der Short-Read-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben, die mittels ANCOM-BC2 als strukturelle Nullen identifiziert wurden. Dargestellt sind Taxa, die in mindestens drei Proben identifiziert wurden. Aufgeführt sind die Gruppe, in der ein höheres Vorkommen identifiziert wurde, sowie die Anzahl an Probanden bei denen die Spezies identifiziert werden konnte.

Spezies	Gruppe mit erhöhtem Vorkommen	Anzahl Treffer
Peptoniphilus coxii	Patienten	4
Peptoniphilus grossensis	Patienten	4
Lactobacillus coleohominis	Patienten	4
Lactiplantibacillus plantarum	Patienten	4
Prevotella corporis	Kontrollen	4
Chryseobacterium soli	Kontrollen	4
Lactobacillus gallinarum	Patienten	4
Herbaspirillum robiniae	Patienten	4
Eubacterium pyruvativorans	Patienten	4
Chryseobacterium haifense	Kontrollen	3
Acidovorax sp. RAC01	Patienten	3
Fannyhessea vaginae	Kontrollen	3
Carboxylicivirga flava	Kontrollen	3
Propionibacterium freudenreichii	Patienten	3
Lactobacillus taiwanensis	Patienten	3
Cloacibacterium normanense	Patienten	3
Lactobacillus hominis	Patienten	3
Streptococcus troglodytae	Patienten	3

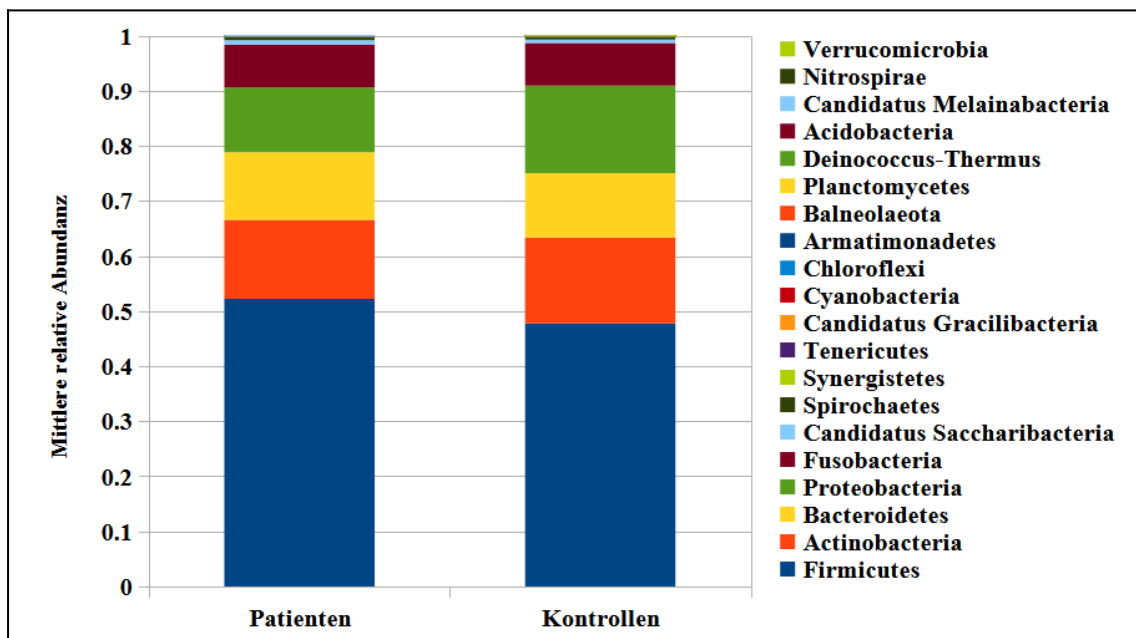
Chroococcidiopsis thermalis	Patienten	3

3.5.2 Supragingival

3.5.2.1 Durchschnittliche relative Abundanzen

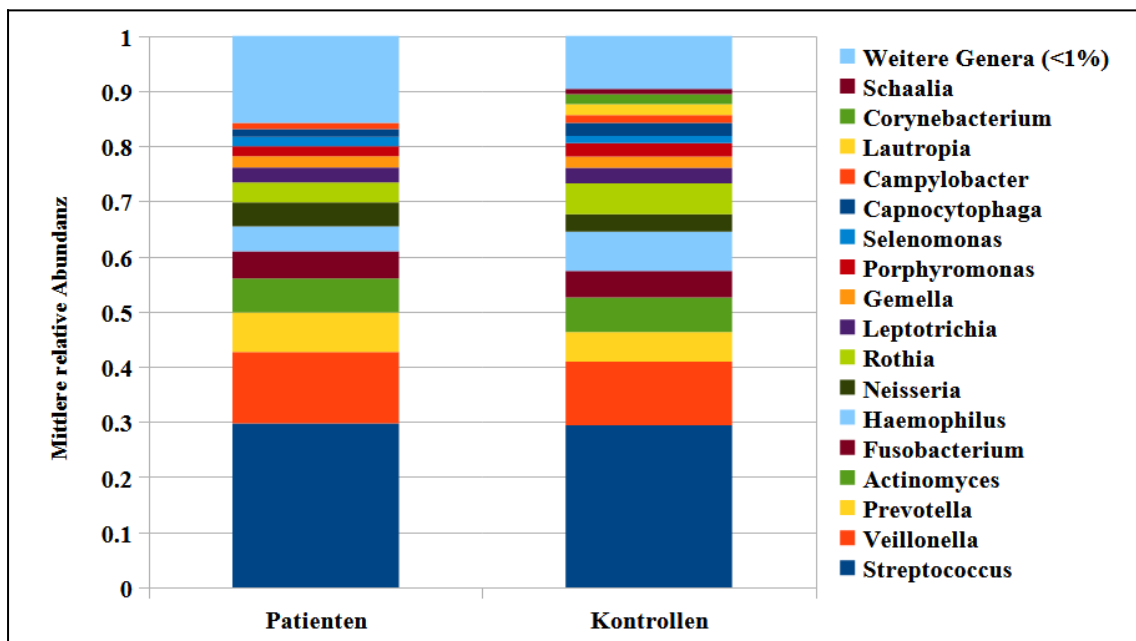
Insgesamt konnten im Rahmen der Short-Read-16S-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben 96823518 Reads mit einer mittleren Länge von 562bp und einer mittleren Readzahl von 1898500 sequenziert werden.

Die Phyla mit der höchsten relativen Abundanz über alle Proben hinweg waren Firmicutes mit 52,21% bei den Patienten und 47,77% bei den Kontrollen, Actinobacteria mit 14,37% bei den Patienten und 15,60% bei den Kontrollen, Bacteroidetes mit 12,25% bei den Patienten und 11,70% bei den Kontrollen, Proteobacteria mit 11,77% bei den Patienten und 15,85% bei den Kontrollen und Fusobacteria mit 7,82% bei den Patienten und 7,79% bei den Kontrollen (siehe Figur 26).



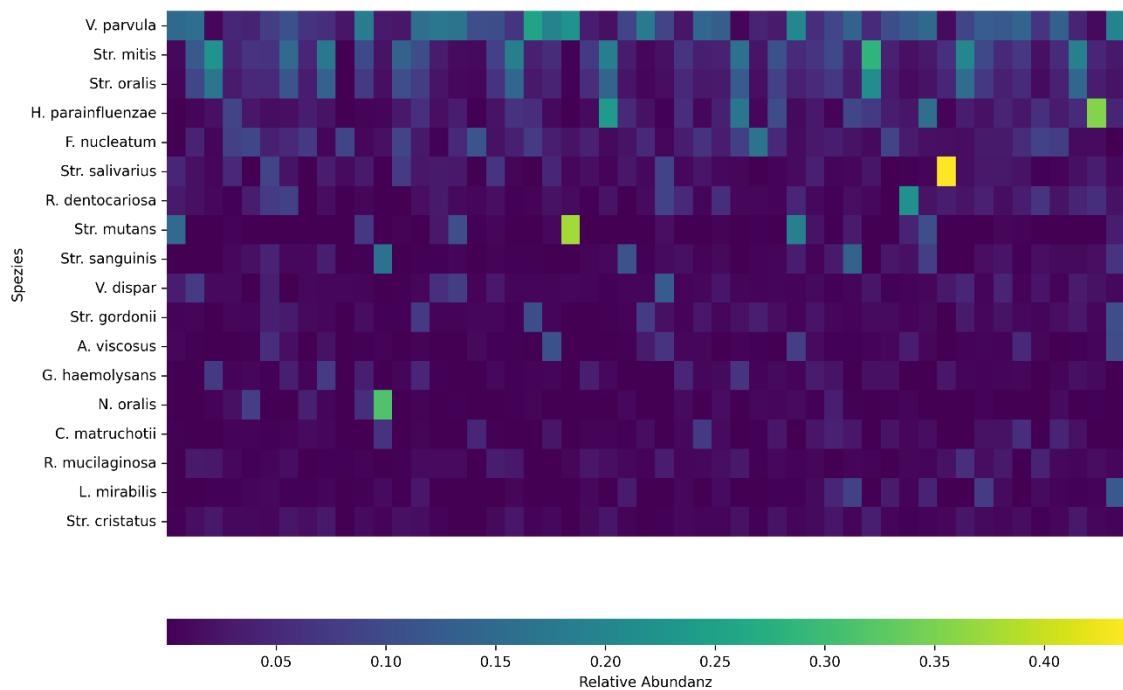
Figur 26 Verteilung der relativen Abundanzen auf Phylum-Ebene der Short-Read-16S-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben aufgeteilt nach Patienten und Kontrollen. Aufgeführt sind alle identifizierten Phyla.

Auf Genus-Ebene konnten Streptococcus (29,74% bei den Patienten, 29,40% bei den Kontrollen), Veillonella (12,92% bei den Patienten, 11,52% bei den Kontrollen), Prevotella (7,21% bei den Patienten, 5,38% bei den Kontrollen), Actinomyces (6,12% bei den Patienten, 6,47% bei den Kontrollen), Fusobacterium (4,93% bei den Patienten, 4,81% bei den Kontrollen), Haemophilus (4,54% bei den Patienten, 7,12% bei den Kontrollen), Neisseria (4,36% bei den Patienten, 3,18% bei den Kontrollen), Rothia (3,63% bei den Patienten, 5,58% bei den Kontrollen), Leptotrichia (2,69% bei den Patienten, 2,87% bei den Kontrollen) und Gemella (2,06% bei den Patienten, 1,98% bei den Kontrollen) als Taxa mit hoher relativer Abundanz identifiziert werden (siehe Figur 27).



Figur 27 Verteilung der relativen Abundanzen auf Genus-Ebene der Short-Read-16S-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben aufgeteilt nach Patienten und Kontrollen. Aufgeführt sind alle identifizierten Genera mit einer relativen Abundanz von mindestens 1%, alle weiteren Genera sind gebündelt dargestellt.

Auf Spezies-Ebene konnten als Taxa mit hoher Abundanz absteigend geordnet unter anderem *Veillonella parvula*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus salivarius*, *Rothia dentocariosa*, *Streptococcus mutans* und *Streptococcus sanguinis* identifiziert werden. Figur 28 zeigt die Verteilung der relativen Abundanzen aller Spezies, deren mittlere Abundanz über alle Proben hinweg mindestens 1% erreicht (siehe Figur 28).



Figur 28 Heatmap zur Darstellung der relativen Abundanzen auf Spezies-Ebene der Short-Read-16S-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben. Von links nach rechts sind zunächst alle Patienten, gefolgt von allen Kontrollen dargestellt. Aufgeführt sind alle identifizierten Spezies mit einer relativen Abundanz von mindestens 1% über alle Proben hinweg, alle weiteren Spezies sind nicht aufgeführt. Von oben nach unten sind die Spezies absteigend geordnet nach ihrer mittleren Abundanz.

3.5.2.2 Alpha-Diversität

Die Alpha-Diversität wurde in Form des Simpson- und Shannon-Index ermittelt. Die absoluten Readzahlen wurden hierfür mit SRS in R auf eine Gesamt-Readzahl von 640906 Reads, entsprechend der Readzahl der Probe mit der geringsten Sequenzierungstiefe normalisiert.

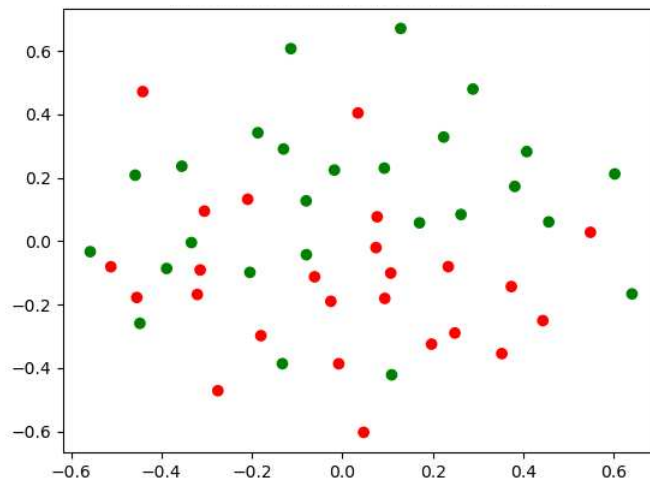
Simpson- und Shannon-Index wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung und mittels Levene's-Test auf Varianzhomogenität getestet, wobei beide Tests Varianzhomogenität, jedoch der Simpson-Index im Gegensatz zum Shannon-Index keine Normalverteilung zeigten. Der Simpson-Index wurde daher mittels Mann-Whitney-U- und der Shannon-Index mittels T-Test für unabhängige Stichproben analysiert. Dabei ergab sich für beide Indizes kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen (siehe 8.5 Weitere Tabellen).

3.5.2.3 Beta-Diversität

Wie in 3.3.3 Beta-Diversität beschrieben wurde die Beta-Diversität mittels Bray-Curtis-Dissimilarität und PCoA, LEfSe und ANCOM-BC2 analysiert. Im Folgenden werden die Ergebnisse auf Spezies-Ebene beschrieben. Für die Ergebnisse der anderen taxonomischen Ebenen siehe 8.5 Weitere Tabellen und 8.6 Weitere Graphen.

Bei der Analyse der Short-Read-16S-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben wurden insgesamt 970 unterschiedliche Spezies identifiziert. Für die Bray-Curtis-Dissimilarität wurden die Proben auf die Anwesenheit und Abundanz dieser Bakterien-Spezies hin untersucht und anschließend die PCoA durchgeführt

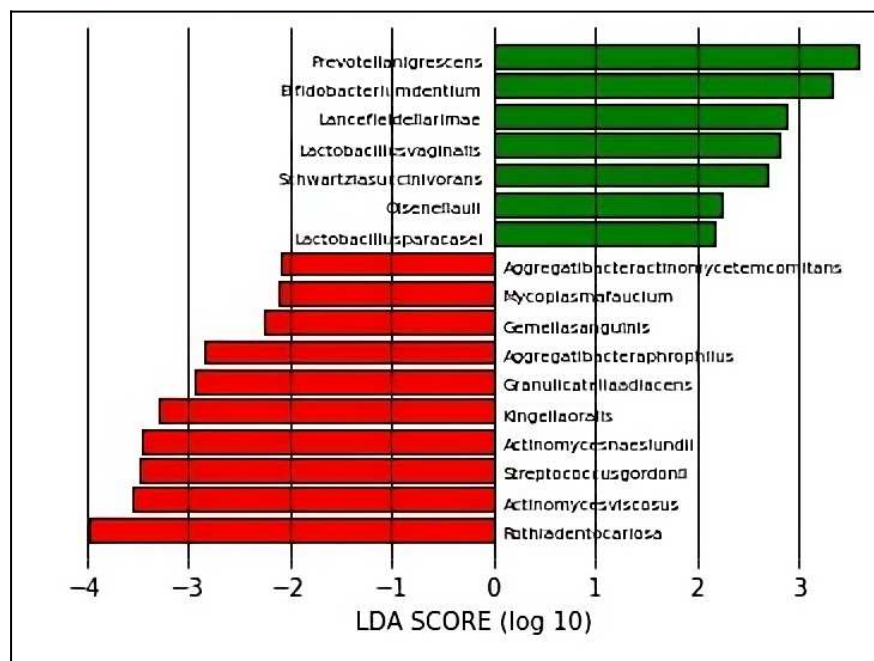
Die PCoA zeigt dabei eine Trennung zwischen Patienten (in grün) und Kontrollen (in rot). Diese Trennung ist stärker ausgeprägt als bei den salivaren und supragingivalen Proben der Full-Length-16S-Sequenzierung, sowie den salivaren Proben der Short-Read-16S-Sequenzierung (siehe 3.4.1.3 Beta-Diversität, 3.4.2.3 Beta-Diversität und 3.5.1.3 Beta-Diversität). Verglichen mit den salivaren Proben der metagenomischen Sequenzierung ist die Streuung der beiden Gruppen vergleichbar, dafür lässt sich eine klarere Trennung erkennen (siehe 3.3.3 Beta-Diversität) (siehe Figur 29).



Figur 29 PCoA basierend auf der Bray-Curtis-Dissimilarität der Short-Read-16S-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben. Patienten sind in grün und Kontrollen in rot dargestellt. Die beiden Gruppen zeigen eine vergleichbare Streuung, sind jedoch distinkt voneinander getrennt.

Im Rahmen der differentiellen Abundanz-Analyse mit LEfSe wurden 19 Bakterien-Spezies identifiziert, deren relative Abundanz sich zwischen Patienten- und Kontrollgruppe statistisch signifikant unterschied und die im Rahmen der linearen Diskriminanz-Analyse mindestens einen LDA-Score von 2, beziehungsweise -2 erreicht haben.

Absteigend geordnet nach LDA-Score wurden *Prevotella nigrescens*, *Bifidobacterium dentium*, *Lancefieldella rimae*, *Lactobacillus vaginalis*, *Schwartzia succinivorans*, *Olsenella uli* und *Lactobacillus paracasei* als Spezies mit höherer Abundanz in der Patientengruppe und *Rothia dentocariosa*, *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces naeslundii*, *Kingella oralis*, *Granulicatella adiacens*, *Aggregatibacter aphrophilus*, *Gemella sanguinis*, *Mycoplasma faucium* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* als Spezies mit höherer Abundanz in der Kontrollgruppe identifiziert (siehe Figur 30 und Tabelle 16).



Figur 30 Bakterien-Spezies, die mittels LEfSe im Rahmen der Analyse der Short-Read-16S-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben als statistisch signifikant identifiziert wurden. Dargestellt sind Taxa, die im Rahmen der linearen Diskriminanz-Analyse einen LDA-Score von mindestens 2, beziehungsweise -2 erreicht haben. Insgesamt konnten 19 Bakterien-Spezies identifiziert werden, die als potentielle Biomarker zur Differenzierung der beiden Gruppen mit höherer Abundanz in der Patienten-Gruppe (in grün), beziehungsweise Kontroll-Gruppe (in rot) dienen können.

Tabelle 16 Mit LEfSe identifizierte Bakterien-Spezies in der Short-Read-16S-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben geordnet nach LDA-Score.

Taxon	Gruppe mit erhöhtem Vorkommen	LDA-Score (log10)
Prevotella nigrescens	Patienten	3,58
Bifidobacterium dentium	Patienten	3,32
Lancefieldella rimae	Patienten	2,88
Lactobacillus vaginalis	Patienten	2,80
Schwartzia succinivorans	Patienten	2,70
Olsenella uli	Patienten	2,25
Lactobacillus paracasei	Patienten	2,17
Aggregatibacter actinomycetemcomitans	Kontrollen	-2,09
Mycoplasma faucium	Kontrollen	-2,10
Gemella sanguinis	Kontrollen	-2,24
Aggregatibacter aphrophilus	Kontrollen	-2,84
Granulicatella adiacens	Kontrollen	-2,93

<i>Kingella oralis</i>	Kontrollen	-3,28
<i>Actinomycetem naeslundii</i>	Kontrollen	-3,45
<i>Streptococcus gordonii</i>	Kontrollen	-3,48
<i>Actinomycetem viscosus</i>	Kontrollen	-3,54
<i>Rothia dentocariosa</i>	Kontrollen	-3,97

Mit ANCOM-BC2 konnten insgesamt 65 Bakterien-Spezies identifiziert werden, deren absolute Readzahl einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollgruppe zeigte. Davon kamen 34 Spezies mit einer höheren Abundanz in der Patienten- und 31 mit einer höheren Abundanz in der Kontrollgruppe vor. Absteigend geordnet nach der Log-fold-change wurden dabei unter anderem *Pyramidobacter piscolens*, *Prevotella multisaccharivorax*, *Lactobacillus oris*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Flavobacterium cheniae*, *Lactobacillus paragasseri*, *Chlostridium ultuense*, *Bifidobacterium animalis*, *Neisseria shayegani*, *Bifidobacterium dentium* und *Actinomyces denticolans* als Taxa mit höherer Abundanz in der Patientengruppe identifiziert. In der Kontrollgruppe konnten unter anderem *Mannheimia granulomatis*, *Desulfovibrio fairfieldensis*, *Pseudopropionibacterium rubrum*, *Scardovia inopinata*, *Capnocytophaga ochracea*, *Lactobacillus kitasatonis*, *Aggregatibacter aphrophilus*, *Kingella oralis* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* als Taxa mit höherer Abundanz identifiziert werden (siehe Figur 31 und Tabelle 17).

Zusätzlich konnten 20 Spezies als hinreichend prävalente strukturelle Nullen identifiziert werden, wovon zwölf in der Patienten- und acht in der Kontrollgruppe identifiziert wurden (siehe Tabelle 18). Sieben der 65 identifizierten Bakterien-Spezies blieben dabei außerdem im Rahmen der Sensitivitäts-Analyse mit aufsteigenden Pseudo-Counts weiterhin statistisch signifikant. Diese Spezies waren *Bifidobacterium dentium*, *Mycoplasma faucium*, *Bergeriella dentrificans*, *Howardella ureilytica*, *Granulicatella adiacens*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Kingella oralis*. Außerdem konnten die Spezies *Bifidobacterium dentium*, *Mycoplasma faucium*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Schwartzia succinivorans*, *Granulicatella adiacens*, *Kingella oralis* und *Aggregatibacter aphrophilus* sowohl mittels LEfSe, als auch ANCOM-BC2 identifiziert werden.

Figur 31 Bakterien-Spezies, die mittels ANCOM-BC2 im Rahmen der Analyse der Short-Read-16S-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben als statistisch signifikant identifiziert wurden. Dargestellt ist die Log-fold-change mit Standardfehler der Patienten- zur Kontroll-Gruppe als Wasserfall-Diagramm. Taxa mit höherer Abundanz in der Patienten-Gruppe sind in grün und für die Kontroll-Gruppe in rot dargestellt. Insgesamt konnten 65 Bakterien-Spezies identifiziert werden, deren Abundanz zwischen den beiden Gruppen einen statistisch signifikanten Unterschied zeigte.

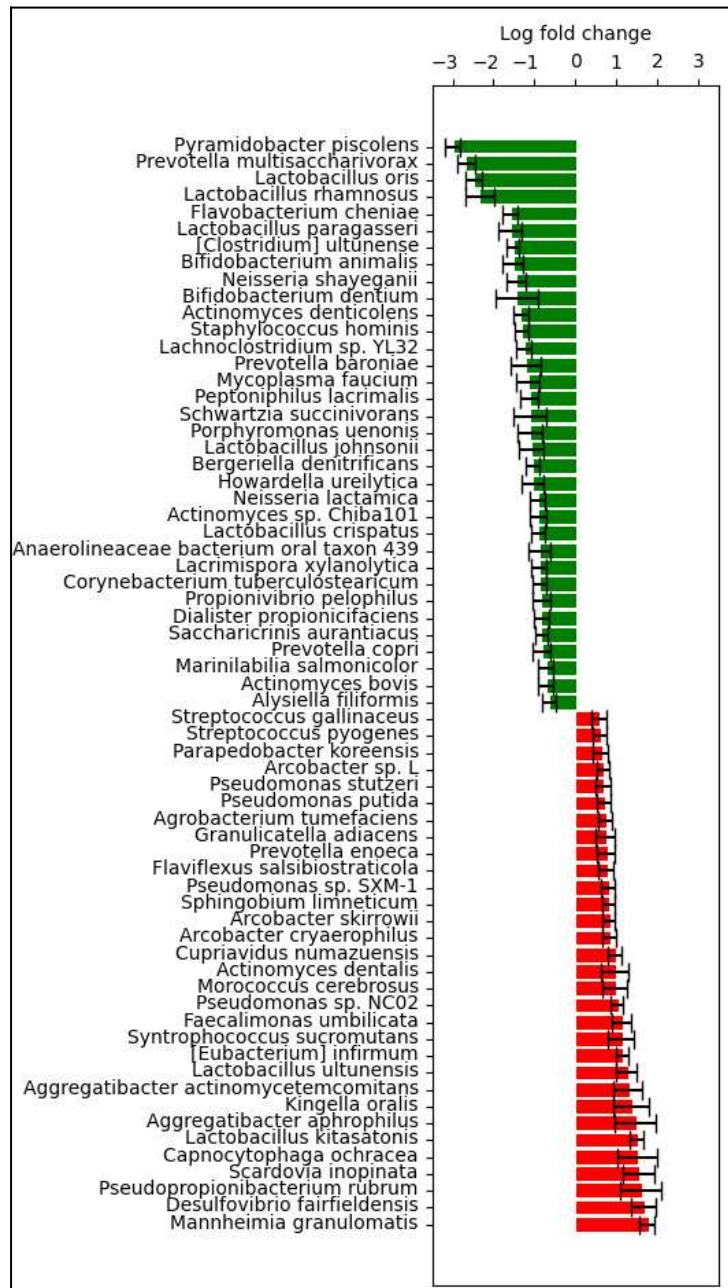


Tabelle 17 Mit ANCOM-BC2 identifizierte Bakterien-Spezies der Short-Read-16S-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben geordnet nach Log-fold-change. Aufgeführt sind außerdem der adjustierte p-Wert und das Ergebnis der Sensitivitätsanalyse mit aufsteigenden Pseudo-Counts.

Taxon	Log-fold-change	Standardfehler	p-Wert	Robust nach Sensitivitätsanalyse
Pyramidobacter piscolens	-3.00	0.19	<0.01	FALSE
Prevotella multisaccharivorax	-2.67	0.21	<0.01	FALSE
Lactobacillus oris	-2.48	0.19	<0.01	FALSE
Lactobacillus rhamnosus	-2.33	0.36	<0.01	FALSE
Flavobacterium cheniae	-1.60	0.18	0.02	FALSE
Lactobacillus paragasseri	-1.59	0.29	0.01	FALSE
[Clostridium] ultunense	-1.53	0.16	0.02	FALSE
Bifidobacterium animalis	-1.52	0.25	<0.01	FALSE
Neisseria shayegani	-1.45	0.24	0.04	FALSE
Bifidobacterium dentium	-1.44	0.51	<0.05 (0,049)	TRUE
Actinomyces denticolens	-1.34	0.17	0.02	FALSE
Staphylococcus hominis	-1.32	0.17	0.02	FALSE
Lachnospirillum sp. YL32	-1.26	0.18	0.02	FALSE
Prevotella baroniae	-1.21	0.37	0.03	FALSE
Mycoplasma faucium	-1.16	0.28	0.02	TRUE
Peptoniphilus lacrimalis	-1.13	0.22	0.04	FALSE
Schwartzia succinivorans	-1.12	0.39	<0.05 (0,049)	FALSE
Porphyromonas uenonis	-1.11	0.31	0.04	FALSE
Lactobacillus johnsonii	-1.09	0.31	0.03	FALSE
Bergeriella denitrificans	-1.05	0.18	0.01	TRUE
Howardella ureilytica	-1.05	0.26	0.02	TRUE
Neisseria lactamica	-0.93	0.18	0.02	FALSE
Actinomyces sp. Chiba101	-0.90	0.20	0.02	FALSE
Lactobacillus crispatus	-0.90	0.17	0.02	FALSE
Anaerolineaceae bacterium oral taxon 439	-0.90	0.27	0.04	FALSE
Lacrimispora xylanolytica	-0.89	0.19	0.02	FALSE
Corynebacterium tuberculostearicum	-0.88	0.16	0.03	FALSE
Propionivibrio pelophilus	-0.84	0.21	0.03	FALSE
Dialister propionificiens	-0.84	0.17	0.04	FALSE
Saccharicrinis aurantiacus	-0.83	0.17	0.04	FALSE
Prevotella copri	-0.83	0.23	0.02	FALSE
Marinilabilia salmonicolor	-0.73	0.18	0.04	FALSE
Actinomyces bovis	-0.73	0.18	0.04	FALSE
Alysiella filiformis	-0.66	0.16	<0.05 (0,049)	FALSE

<i>Streptococcus gallinaceus</i>	0.57	0.17	<0.05 (0,048)	FALSE
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0.58	0.17	<0.05 (0,048)	FALSE
<i>Parapedobacter koreensis</i>	0.61	0.18	0.04	FALSE
<i>Arcobacter</i> sp. L	0.66	0.15	0.04	FALSE
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0.66	0.18	0.02	FALSE
<i>Pseudomonas putida</i>	0.69	0.18	0.02	FALSE
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	0.72	0.16	<0.05 (0,048)	FALSE
<i>Granulicatella adiacens</i>	0.72	0.24	0.04	TRUE
<i>Prevotella enoea</i>	0.74	0.21	0.04	FALSE
<i>Flaviflexus salsibiostraticola</i>	0.75	0.19	0.02	FALSE
<i>Pseudomonas</i> sp. SXM-1	0.79	0.17	0.02	FALSE
<i>Sphingobium limneticum</i>	0.80	0.15	0.03	FALSE
<i>Arcobacter skirrowii</i>	0.81	0.16	0.02	FALSE
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	0.82	0.17	0.02	FALSE
<i>Cupriavidus numazuensis</i>	0.95	0.16	0.01	FALSE
<i>Actinomyces dentalis</i>	0.95	0.32	0.04	FALSE
<i>Morococcus cerebrosus</i>	0.95	0.30	0.04	FALSE
<i>Pseudomonas</i> sp. NC02	1.01	0.16	0.01	FALSE
<i>Faecalimonas umbilicata</i>	1.11	0.23	0.01	FALSE
<i>Syntrophococcus sucromutans</i>	1.12	0.32	0.02	FALSE
[<i>Eubacterium</i>] <i>infirmum</i>	1.13	0.15	0.02	FALSE
<i>Lactobacillus ultunensis</i>	1.25	0.25	0.02	FALSE
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	1.27	0.34	0.02	TRUE
<i>Kingella oralis</i>	1.35	0.42	0.03	TRUE
<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	1.44	0.50	<0.05 (0,048)	FALSE
<i>Lactobacillus kitasatonis</i>	1.49	0.17	0.02	FALSE
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	1.49	0.48	0.04	FALSE
<i>Scardovia inopinata</i>	1.53	0.38	0.02	FALSE
<i>Pseudopropionibacterium rubrum</i>	1.58	0.50	0.04	FALSE
<i>Desulfovibrio fairfieldensis</i>	1.65	0.30	0.01	FALSE
<i>Mannheimia granulomatis</i>	1.74	0.17	<0.01	FALSE

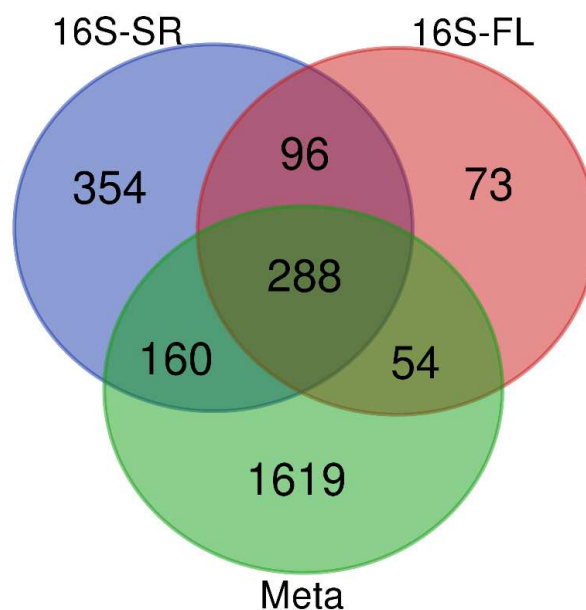
Tabelle 18 Spezies der Short-Read-16S-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben, die mittels ANCOM-BC2 als strukturelle Nullen identifiziert wurden. Dargestellt sind Taxa, die in mindestens drei Proben identifiziert wurden. Aufgeführt sind die Gruppe, in der ein höheres Vorkommen identifiziert wurde, sowie die Anzahl an Probanden bei denen die Spezies identifiziert werden konnte.

Spezies	Gruppe mit erhöhtem Vorkommen	Anzahl Treffer
Chroococcidiopsis thermalis	Patienten	5
Neisseria zalophi	Patienten	5
Salmonella enterica	Kontrollen	4
Streptobacillus felis	Kontrollen	4
Neisseria dentiae	Patienten	4
Lactobacillus taiwanensis	Patienten	4
Eubacterium pyruvatorans	Patienten	4
Corynebacterium aurimucosum	Kontrollen	3
Paraprevotella clara	Patienten	3
Snodgrassella alvi	Patienten	3
Lactobacillus hominis	Patienten	3
Haemophilus haemoglobinophilus	Kontrollen	3
Neisseria dumasiana	Patienten	3
Streptococcus troglodytidis	Kontrollen	3
Prevotella corporis	Kontrollen	3
Pseudomonas oleovorans	Kontrollen	3
Massilia namucuoensis	Patienten	3
Longicatena caecimuris	Patienten	3
Mucilaginibacter yixingensis	Patienten	3
Acinetobacter guillouiae	Kontrollen	3

3.6 Methoden- und Probenvergleich

Die Anzahl der mit den drei Sequenzierungsmethoden identifizierten Spezies schwankt stark mit 2122 Spezies in der metagenomischen, 511 Spezies in der Full-Length-16S- und 897 in der Short-Read-16S-Sequenzierung der salivaren Proben, sowie 321 Spezies in der Full-Length-16S- und 970 in der Short-Read-16S-Sequenzierung der supragingivalen Proben.

Betrachtet man die Schnittmengen der drei Sequenzierungen salivarer Proben, findet man einen Kern von 288 Spezies, die in allen drei Ergebnissätzen vorkommen, sowie 384 Spezies, die in beiden Varianten der 16S-Sequenzierung zu finden sind, 448 Spezies, die in der Short-Read-16S- und metagenomischen Sequenzierung vorkommen und 342 Spezies, die in der Full-Length-16S- und metagenomischen Sequenzierung nachgewiesen wurden. Damit wurden 1619 Spezies nur in der metagenomischen, 354 Spezies nur in der Short-Read-16S- und 73 Spezies nur in der Full-Length-16S-Sequenzierung identifiziert (siehe Figur 32).



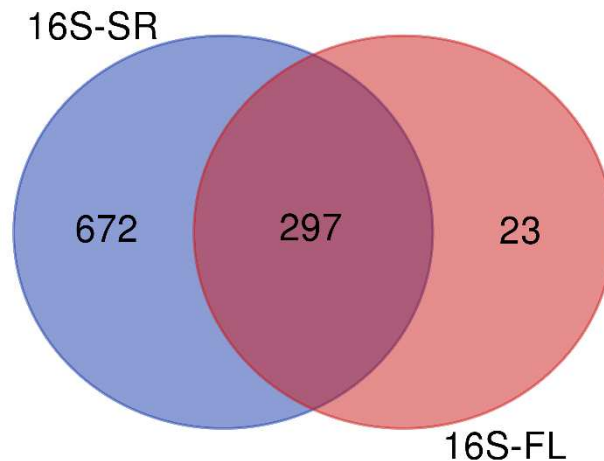
Figur 32 Venn-Diagramm der metagenomischen (Meta, grün), Short-Read-16S- (16S-SR, blau) und Full-Length-16S-Sequenzierung (16S-FL, rot) von 50 salivaren Proben. Dargestellt sind jeweils die Anzahl der Spezies, die in zwei, beziehungsweise drei der Ergebnissätze zu finden sind, oder aber ausschließlich mit einer einzigen Methode identifiziert wurden.

Dieser enorme Kontrast nimmt ab, sobald man die Schnittmengen etwas höher abundanter Spezies betrachtet: Bereits, wenn man nur Spezies betrachtet, die eine durchschnittliche Mindestabundanz von 0,1% erreichen, gleicht sich die Zahl der identifizierten Spezies zwischen den Methoden an mit 111 Spezies in der metagenomischen Sequenzierung, 97 in der Full-Length-16S- und 118 in der Short-Read-16S-Sequenzierung. Trotz dieser Annäherung finden sich nur 58 Spezies in allen drei Ergebnissätzen wieder.

Auch eine noch engere Eingrenzung auf Taxa mit einer Mindestabundanz von 1% ändert an dieser Verteilung wenig: So ist die Anzahl der identifizierten Spezies mit 26 in der metagenomischen, 20 in der Full-Length-16S- und 27 in der Short-Read-16S-Sequenzierung nach wie vor ähnlich. Die Gesamtschnittmenge im Verhältnis zur mit den jeweiligen Methoden identifizierten Spezieszahl bewegt sich mit 12 Spezies immer noch bei um die 50%. Auch das Verhältnis von Schnittmenge zu Gesamtzahl identifizierter Spezies verändert sich mit 17,79% und 16,44% kaum.

Beim Vergleich der Short-Read-16S- und Full-Length-16S-Sequenzierung der supragingivalen Proben lässt sich eine Schnittmenge von 297 Spezies identifizieren. Dabei fällt auf, dass zwar immer noch 672 Taxa nur mit der Short-Read-16S-Sequenzierung identifiziert wurden, dafür aber bereits der Großteil der mittels Full-Length-16S-Sequenzierung identifizierten Spezies zur Schnittmenge gehört (siehe Figur 33).

Grenzt man die Spezies auf eine Mindestabundanz von 0,1% ein, nähert sich die Anzahl der identifizierten Taxa mit 146 Spezies in der Short-Read-16S- und 85 Spezies in der Full-Length-16S-Sequenzierung bereits deutlich an. Noch enger eingegrenzt auf eine Mindestabundanz von 1% sind es nur noch 18, beziehungsweise 21 Spezies in der Short-Read-16S- und Full-Length-16S-Sequenzierung. Die Schnittmengen belaufen sich dabei auf 65 Spezies bei einer Mindestabundanz von 0,1% und 11 bei 1%. Der Kontrast zwischen der Anzahl identifizierter Taxa zwischen den beiden Methoden wird dabei deutlich geringer, gleicht sich jedoch weniger schnell an als bei den salivaren Proben. Wie bei den salivaren Proben bleibt jedoch das Verhältnis von Schnittmenge zur Gesamtzahl identifizierter Spezies konstant bei in diesem Fall 39%.

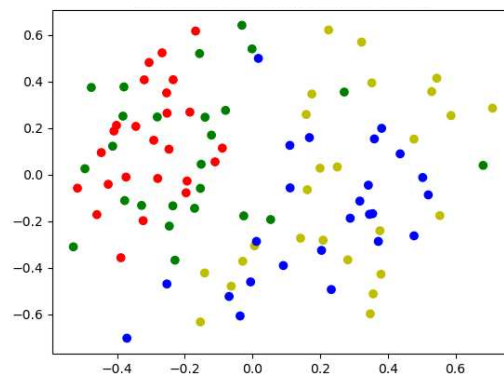


Figur 33 Venn-Diagramm der Short-Read-16S- (16S-SR, blau) und Full-Length-16S-Sequenzierung (16S-FL, rot) von 51 supragingivalen Proben. Dargestellt sind jeweils die Anzahl der Spezies, die in beiden Ergebnissätzen zu finden sind, oder aber ausschließlich mit einer einzigen Methode identifiziert wurden.

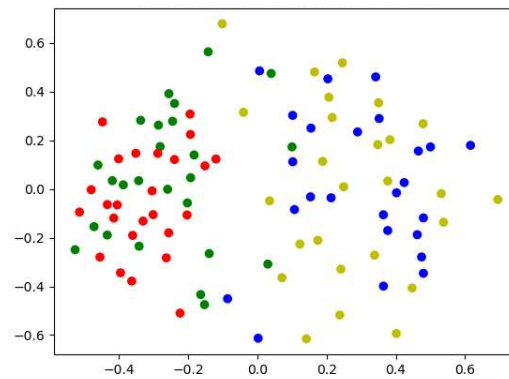
Zusätzlich zum Vergleich der Schnittmengen der verschiedenen Sequenzierungsplattformen wurden außerdem Bray-Curtis-Dissimilarität und PCoA genutzt, um die Methoden orientierend zu vergleichen. Dabei sollten zum einen die beiden unterschiedlichen Arten oraler Proben (salivare und supragingivale Proben) innerhalb einer Sequenzierungsplattform verglichen werden, als auch jeweils salivare, beziehungsweise supragingivale Proben zwischen unterschiedlichen Plattformen. Da Kraken2 und Emu nicht mit den exakt selben Datenbanken arbeiten (Curry et al., 2022, Wood et al., 2019) und daher nicht auszuschließen ist, dass Abweichungen auf diesen Unterschied zurückzuführen sind, wurden ausschließlich Daten der Full-Length- und Short-Read-16S-Sequenzierungen miteinander verglichen, da diese beide mit Emu analysiert wurden.

Der Vergleich von Saliva und supragingivalen Abstrichen zeigt dabei eine deutliche Trennung der beiden Probenarten mit lediglich geringem Überschneidungsgrad. Diese Trennung ist sowohl in den Daten der Full-Length-, als auch der Short-Read-Sequenzierung zu erkennen. Die Trennung zwischen Patienten und Kontrollen bleibt dabei innerhalb der supragingivalen Proben in beiden Fällen stärker vorhanden als bei den salivaren Proben (siehe Figuren 34 und 35).

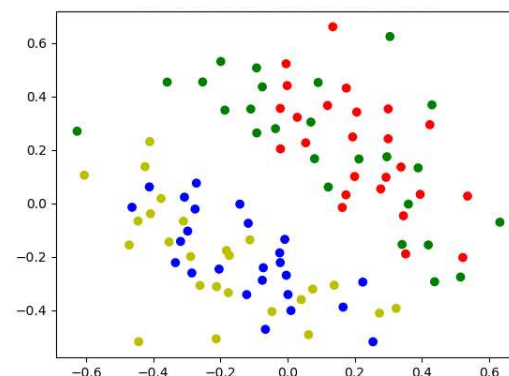
Vergleicht man innerhalb der beiden Probenarten die Ergebnisse der beiden unterschiedlichen Sequenzierplattformen, ergibt sich ebenfalls eine deutliche Trennung zwischen Full-Length- und Short-Read-Sequenzierung. Diese Trennung ist dabei deutlicher bei den salivaren, als den supragingivalen Proben zu erkennen. Eine klare Trennung zwischen Patienten und Kontrollen ist dabei nicht mehr zu erkennen (siehe Figuren 36 und 38). Diese Trennung setzt sich auf den höheren phylogenetischen Ebenen fort, auch wenn sie etwas weniger distinkt ist (siehe Figur 37 und 39).



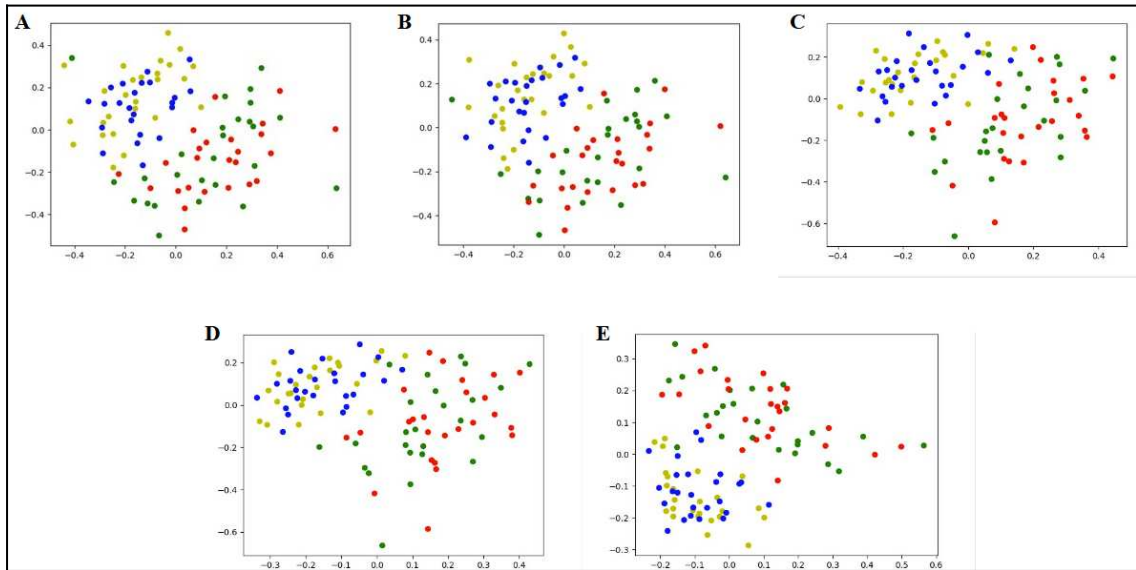
Figur 34 PCoA basierend auf der Bray-Curtis-Dissimilarität der Full-Length-16S-Sequenzierung von 50 salivaren und 51 supragingivalen Proben. Salivare Proben sind in grün (Patienten) und rot (Kontrollen) dargestellt, supragingivale Proben in gelb (Patienten) und blau (Kontrollen). Die beiden Probenarten sind deutlich voneinander getrennt, wobei sich innerhalb der supragingivalen Proben zusätzlich eine Trennung zwischen Patienten und Kontrollen erkennen lässt.



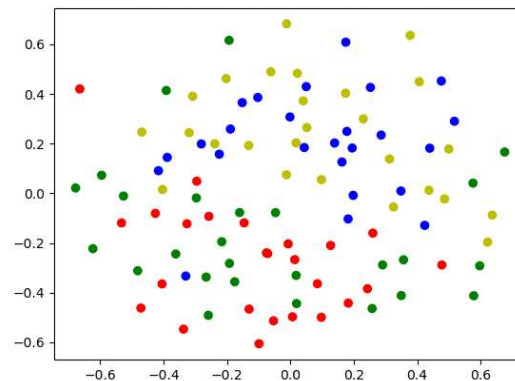
Figur 35 PCoA basierend auf der Bray-Curtis-Dissimilarität der Short-Read-16S-Sequenzierung von 50 salivaren und 51 supragingivalen Proben. Salivare Proben sind in grün (Patienten) und rot (Kontrollen) dargestellt, supragingivale Proben in gelb (Patienten) und blau (Kontrollen). Die beiden Probenarten sind deutlich voneinander getrennt, wobei sich innerhalb der supragingivalen Proben zusätzlich eine Trennung zwischen Patienten und Kontrollen erkennen lässt.



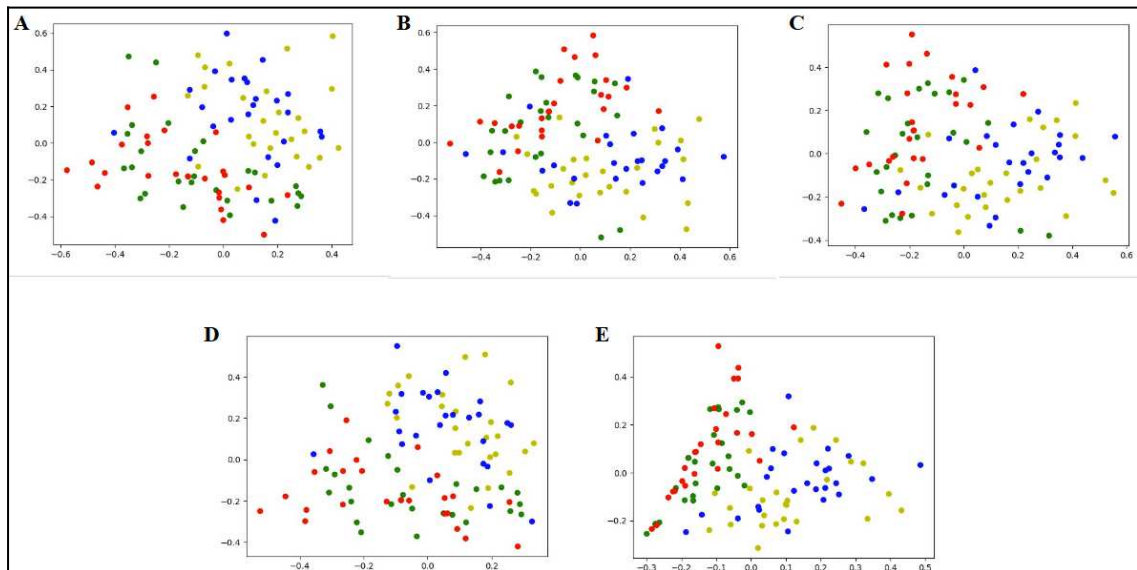
Figur 36 PCoA basierend auf der Bray-Curtis-Dissimilarität von 50 salivaren Proben. Dargestellt sind einmal die Ergebnisse der Full-Length-16S-Sequenzierung in grün (Patienten) und rot (Kontrollen), sowie die Ergebnisse der Short-Read-16S-Sequenzierung in gelb (Patienten) und blau (Kontrollen). Die Ergebnisse der beiden Sequenzierungsplattformen sind deutlich voneinander getrennt, eine klare Trennung zwischen Patienten und Kontrollen lässt sich nicht erkennen.



Figur 37 PCoAs basierend auf der Bray-Curtis-Dissimilarität von 50 salivaren Proben. Die Figuren A-E zeigen die höheren phylogenetischen Ebenen Genus, Familie, Ordnung, Klasse und Phylum. Dargestellt sind einmal die Ergebnisse der Full-Length-16S-Sequenzierung in grün (Patienten) und rot (Kontrollen), sowie die Ergebnisse der Short-Read-16S-Sequenzierung in gelb (Patienten) und blau (Kontrollen). Die Ergebnisse der beiden Sequenzierungsplattformen sind deutlich voneinander getrennt, eine klare Trennung zwischen Patienten und Kontrollen lässt sich nicht erkennen.



Figur 38 PCoA basierend auf der Bray-Curtis-Dissimilarität von 51 supragingivalen Proben. Dargestellt sind einmal die Ergebnisse der Full-Length-16S-Sequenzierung in grün (Patienten) und rot (Kontrollen), sowie die Ergebnisse der Short-Read-16S-Sequenzierung in gelb (Patienten) und blau (Kontrollen). Die Ergebnisse der beiden Sequenzierungsplattformen sind deutlich voneinander getrennt, eine klare Trennung zwischen Patienten und Kontrollen lässt sich nicht erkennen.



Figur 39 PCoAs basierend auf der Bray-Curtis-Dissimilarität von 51 supragingivalen Proben. Die Figuren A-E zeigen die höheren phylogenetischen Ebenen Genus, Familie, Ordnung, Klasse und Phylum. Dargestellt sind einmal die Ergebnisse der Full-Length-16S-Sequenzierung in grün (Patienten) und rot (Kontrollen), sowie die Ergebnisse der Short-Read-16S-Sequenzierung in gelb (Patienten) und blau (Kontrollen). Die Ergebnisse der beiden Sequenzierungsplattformen sind deutlich voneinander getrennt, eine klare Trennung zwischen Patienten und Kontrollen lässt sich nicht erkennen.

Um abseits der Spezies-Ebene ein weiterführendes Verständnis über die Unterschiede zwischen den drei Sequenzierungs-Methoden zu erhalten, wurde nach Korrelationen zwischen den mittleren Abundanzen der Genera gesucht. Dazu wurden zunächst zur Filterung der Ergebnisse die mittleren Abundanzen der Genera über alle Proben und Sequenzierungsmethoden hinweg ermittelt und nur die Taxa weiterbetrachtet, die im Mittel über alle Proben hinweg eine Mindestabundanz von 0,1% erreicht haben. Für diese Taxa wurden anschließend die mittleren Abundanzen für jeweils eine Sequenzierungsmethode berechnet, ohne dabei nach Patienten und Kontrollen zu differenzieren. Die entsprechende Verteilung der Genera ist für die salivaren Proben in Figur 40 und für die supragingivalen Proben in Figur 41 dargestellt. Da die hier verwendeten Daten anhand der Mindestabundanz gefiltert wurden, werden im Gegensatz zu den zuvor berechneten Bray-Curtis-Dissimilaritäten und PCoAs auch metagenomische mit 16S-Daten verglichen, obwohl auch hier die Verwendung

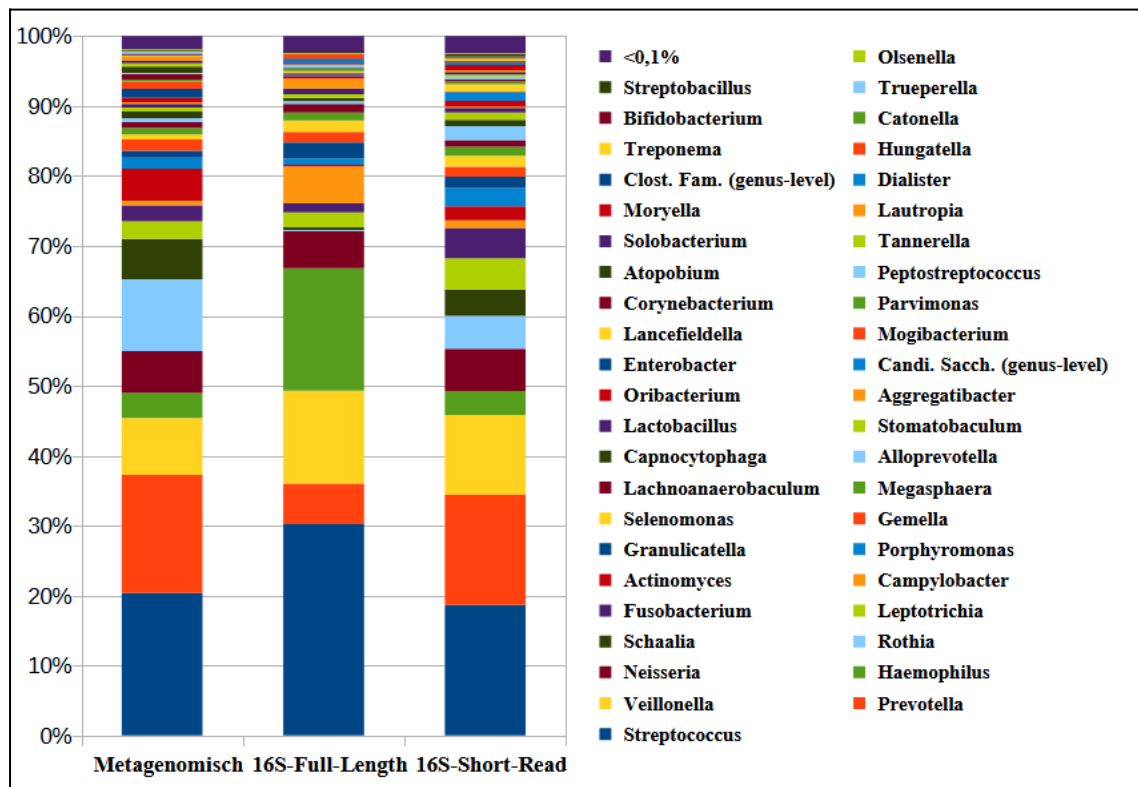
unterschiedlicher Datenbanken als potentielle Erklärung für eventuelle Unterschiede in Betracht gezogen werden sollte.

Anschließend wurden die Korrelationskoeffizienten nach Spearman und Pearson für die ermittelten, mittleren Abundanzen auf Genus-Ebene der drei Sequenzierungsmethoden berechnet. Die mittleren Abundanzen zeigen dabei keine Normalverteilung nach Bestimmung mittels Shapiro-Wilk-Test. Daher ist der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman die Methode der Wahl, um eine Korrelation zu ermitteln. Um aber trotzdem nicht nur die Ränge, sondern auch die Werte miteinander zu korrelieren, soll zusätzlich auch der Korrelationskoeffizient nach Pearson bestimmt werden, wobei dessen Ergebnisse aufgrund der nicht-erfüllten Voraussetzung einer Normalverteilung mit Vorsicht betrachtet werden sollten.

Grundsätzlich konnte zwischen den Ergebnissen von allen drei Sequenzierungsmethoden und mit beiden statistischen Verfahren eine statistisch signifikante, positive Korrelation gezeigt werden. Dabei unterscheiden sich jedoch die Ergebnisse des Korrelationskoeffizienten nach Pearson und Spearman:

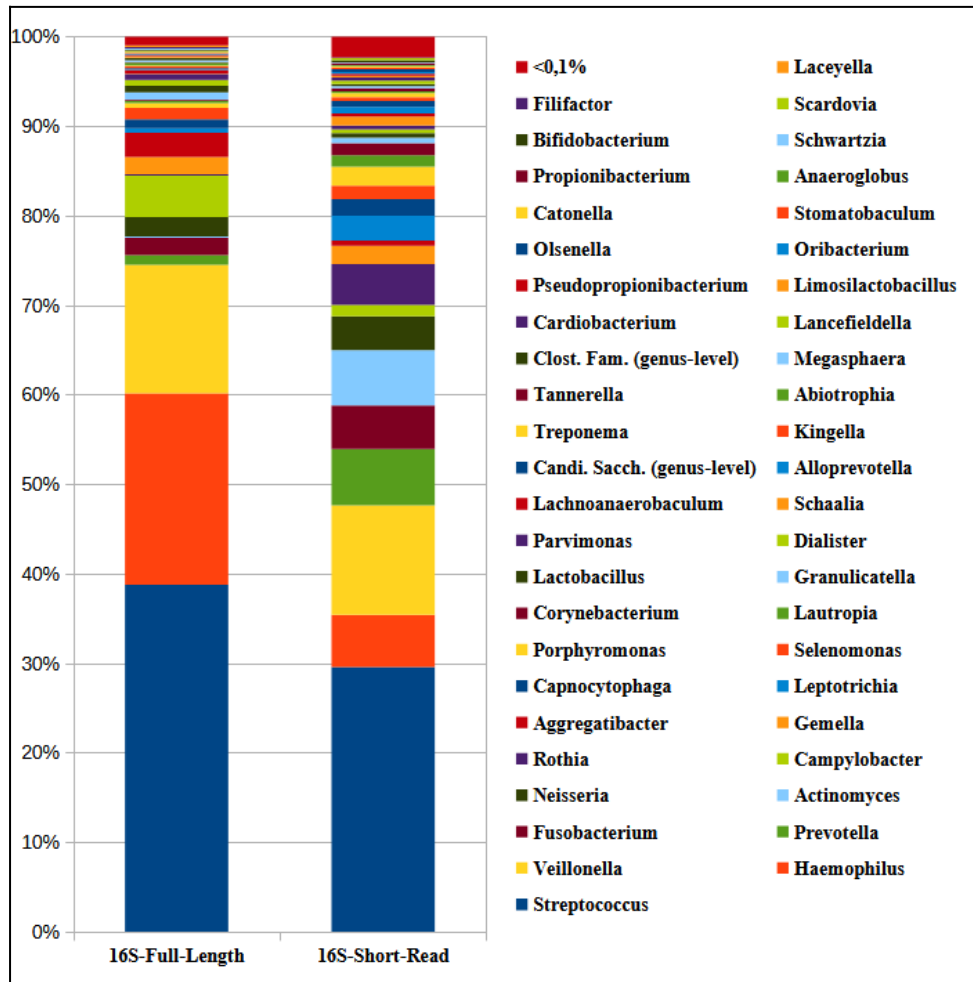
Nach Pearson zeigen die metagenomische und Short-Read-16S-Sequenzierung die stärkste Korrelation ($r = 0,95, p < 0,001$), während zwischen der metagenomischen und Full-Length-16S- ($r = 0,72, p < 0,001$), beziehungsweise der Full-Length-16S- und Short-Read-16S-Sequenzierung ($r = 0,78, p < 0,001$) eine etwas geringere, positive Korrelation gefunden wurde.

Abweichend von dieser Beobachtung korrelieren nach Spearman die Full-Length-16S- und Short-Read-16S-Sequenzierung am stärksten ($\rho = 0,70, p < 0,001$), gefolgt von der metagenomischen und Short-Read-16S-Sequenzierung ($\rho = 0,67, p < 0,001$) und der metagenomischen und Full-Length-Sequenzierung ($\rho = 0,53, p < 0,001$).



Figur 40 Verteilung der relativen Abundanzen auf Genus-Ebene der metagenomischen, Full-Length-16S- und Short-Read-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben ohne Differenzierung von Patienten und Kontrollen. Aufgeführt sind alle identifizierten Genera mit einer relativen Abundanz von mindestens 0,1%, alle weiteren Genera sind gebündelt dargestellt.

Für die supragingivalen Ergebnisse konnte ebenfalls eine statistisch signifikante, positive Korrelation zwischen den Ergebnissen der Full-Length-16S- und Short-Read-16S-Sequenzierung gefunden werden. Dabei ist die Korrelation nach Pearson ($r = 0,90$, $p < 0,001$) stärker ausgeprägt als nach Spearman ($\rho = 0,56$, $p < 0,001$).



Figur 41 Verteilung der relativen Abundanzen auf Genus-Ebene der Full-Length-16S- und Short-Read-16S-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben ohne Differenzierung von Patienten und Kontrollen. Aufgeführt sind alle identifizierten Genera mit einer relativen Abundanz von mindestens 0,1%, alle weiteren Genera sind gebündelt dargestellt.

3.7 Überschneidung der Ergebnisse

Zur engeren Eingrenzung der Ergebnisse und um Bakterien-Spezies zu identifizieren, die sich konsistent zwischen Patienten und Kontrollen unterscheiden, wurde nach Schnittmengen zwischen den unterschiedlichen Probenarten und Sequenzierungsplattformen gesucht. Dabei wurden alle Bakterien-Spezies berücksichtigt, die mittels LEfSe als statistisch signifikant identifiziert wurden und den zuvor festgelegten Grenzwert des LDA-Scores überschritten, oder mittels ANCOM-BC2 als statistisch signifikant identifiziert wurden, oder mittels ANCOM-BC2 als strukturelle Null identifiziert und als hinreichend prävalent eingestuft wurden. Als konsistente Spezies wurden dabei alle Spezies eingestuft, die mindestens dreimal identifiziert wurden.

Mit den auf diese Weise identifizierten Spezies wurden drei Schnittmengen identifiziert: Eine Gesamtschnittmenge aller identifizierten Spezies (siehe Tabelle 19), die Schnittmenge aller in salivaren Proben identifizierten Spezies (metagenomische/Full-Length-/Short-Read-16S-Sequenzierung) (siehe Tabelle 20) und die Schnittmenge aller in supragingivalen Proben identifizierten Spezies (Full-Length-/Short-Read-16S-Sequenzierung) (siehe Tabelle 21).

Tabelle 19 Gesamtschnittmenge aller mittels LEfSe, oder ANCOM-BC2 identifizierten Bakterien-Spezies in salivaren und supragingivalen Proben der metagenomischen, Full-Length- und Short-Read-16S-Sequenzierung. Mit * sind Bakterien-Spezies markiert, die bei mehrfacher Identifikation mit ANCOM-BC2 im Rahmen der Sensitivitäts-Analyse mit aufsteigenden Pseudo-Counts konsistent weiterhin statistisch signifikant blieben. Dargestellt sind die Häufigkeit der Identifikation, die Gruppe mit erhöhtem Vorkommen, die statistischen Methoden, mit denen die Spezies identifiziert wurde, die Log-fold-change $\pm$ Standardfehler bei Identifikation mit ANCOM-BC2, beziehungsweise der LDA-score bei Identifikation mit LEfSe, sowie die Art der Sequenzierung und Probe.

Spezies	Häufigkeit	Gruppe	Statistik	Log-fold-change ($\pm$ Standardfehler)	LDA-score (log10)	Sequenzierung	Probe
Prevotella nigrescens	6	Patienten	ANCOM-BC2	-1,51 ($\pm$ 0,34)	-	Full-Length	Saliva
			ANCOM-BC2	-1,35 ($\pm$ 0,24)	-	Full-Length	Supra
			ANCOM-BC2	-1,23 ($\pm$ 0,39)	-	Short-Read	Saliva
			LEfSe	-	3,48	Full-Length	Saliva
			LEfSe	-	3,48	Short-Read	Saliva
			LEfSe	-	3,58	Short-Read	Supra
Schwartzia succinivorans	6	Patienten	ANCOM-BC2	-1,15 ($\pm$ 0,22)		Full-Length	Saliva
			ANCOM-BC2	-0,76 ($\pm$ 0,27)		Full-Length	Supra
			ANCOM-BC2	-1,12 ($\pm$ 0,39)		Short-Read	Supra
			LEfSe	-	3,18	Full-Length	Supra
			LEfSe	-	2,12	Short-Read	Saliva
			LEfSe	-	2,70	Short-Read	Supra
Lactobacillus rhamnosus	5	Patienten	ANCOM-BC2	-1,87 ($\pm$ 0,30)		Short-Read	Saliva
			ANCOM-BC2	-2,33 ($\pm$ 0,36)		Short-Read	Supra
			LEfSe	-	2,31	Full-Length	Supra
			LEfSe	-	2,11	Short-Read	Saliva
			Struk. Null	-	-	Full-Length	Supra
Olsenella uli	4	Patienten	ANCOM-BC2	-0,97 ($\pm$ 0,17)	-	Metagenomisch	Saliva
			ANCOM-BC2	-1,00 ($\pm$ 0,31)	-	Short-Read	Saliva
			LEfSe	-	2,81	Metagenomisch	Saliva
			LEfSe	-	2,25	Short-Read	Supra

Lactobacillus vaginalis	4	Patienten	ANCOM-BC2	-1,58 ($\pm 0,19$)	-	Metagenomisch	Saliva
			ANCOM-BC2	-2,57 ($\pm 0,24$)	-	Full-Length	Saliva
			ANCOM-BC2	-1,56 ($\pm 0,20$)	-	Full-Length	Supra
			LEfSe	-	2,80	Short-Read	Supra
Lactobacillus oris	4	Patienten	ANCOM-BC2	-1,23 ($\pm 0,32$)	-	Short-Read	Saliva
			ANCOM-BC2	-2,48 ($\pm 0,19$)	-	Short-Read	Supra
			LEfSe	-	2,46	Full-Length	Saliva
			LEfSe	-	2,28	Short-Read	Saliva
Prevotella maculosa*	4	Patienten	ANCOM-BC2	-0,61 ($\pm 0,21$)	-	Full-Length	Saliva
			ANCOM-BC2	-1,15 ($\pm 0,32$)	-	Short-Read	Saliva
			LEfSe	-	2,31	Full-Length	Saliva
			LEfSe	-	2,46	Short-Read	Saliva
Lactobacillus paracasei	4	Patienten	ANCOM-BC2	-1,38 ($\pm 0,18$)	-	Short-Read	Saliva
			LEfSe	-	2,27	Full-Length	Supra
			LEfSe	-	2,17	Short-Read	Supra
			Struk. Null	-	-	Full-Length	Supra
Lancefieldella rimae	4	Patienten	LEfSe	-	2,55	Full-Length	Saliva
			LEfSe	-	2,94	Short-Read	Saliva
			LEfSe	-	2,88	Short-Read	Supra
			Struk. Null	-	-	Full-Length	Supra
Aggregatibacter aphrophilus	4	Kontrollen	ANCOM-BC2	1,01 ($\pm 0,36$)	-	Full-Length	Supra
			ANCOM-BC2	1,44 ($\pm 0,50$)	-	Short-Read	Supra
			LEfSe	-	-3,71	Full-Length	Supra
			LEfSe	-	-2,84	Short-Read	Supra
Lactobacillus gasseri	3	Patienten	ANCOM-BC2	-1,12 ($\pm 0,18$)	-	Metagenomisch	Saliva
			ANCOM-BC2	-2,76 ($\pm 0,23$)	-	Full-Length	Saliva
			ANCOM-BC2	-2,06 ($\pm 0,26$)	-	Full-Length	Supra
Prevotella oralis	3	Patienten	ANCOM-BC2	-0,80 ($\pm 0,19$)	-	Metagenomisch	Saliva
			ANCOM-BC2	-0,81 ($\pm 0,18$)	-	Full-Length	Saliva
			LEfSe	-	2,01	Full-Length	Saliva
Prevotella multisaccharivorax	3	Patienten	ANCOM-BC2	-0,62 ($\pm 0,17$)	-	Full-Length	Saliva
			ANCOM	-1,68 ($\pm 0,19$)	-	Short-	Saliva

			-BC2			Read	
			ANCOM -BC2	-2,67 ($\pm 0,21$)	-	Short- Read	Supra
Lactobacillus crispatus	3	Patienten	ANCOM -BC2	-2,27 ($\pm 0,21$)	-	Short- Read	Saliva
			ANCOM -BC2	-0,90 ($\pm 0,17$)	-	Short- Read	Supra
			Struk. Null	-	-	Full- Length	Supra
Dialister pneumosintes	3	Patienten	ANCOM -BC2	-0,93 ($\pm 0,24$)	-	Full- Length	Saliva
			ANCOM -BC2	-1,18 ($\pm 0,35$)	-	Short- Read	Saliva
			LEfSe	-	2,61	Full- Length	Saliva
Streptococcus anginosus	3	Patienten	ANCOM -BC2	-1,27 ($\pm 0,38$)	-	Short- Read	Saliva
			LEfSe	-	3,13	Full- Length	Saliva
			LEfSe	-	3,16	Short- Read	Saliva
Bifido- bacterium dentium	3	Patienten	ANCOM -BC2	-1,44 ($\pm 0,51$)	-	Short- Read	Supra
			LEfSe	-	2,75	Short- Read	Saliva
			LEfSe	-	3,32	Short- Read	Supra
Selenomonas infelix	3	Patienten	ANCOM -BC2	-0,82 ($\pm 0,24$)	-	Full- Length	Saliva
			LEfSe	-	2,57	Full- Length	Saliva
			LEfSe	-	2,56	Short- Read	Saliva
Dialister invisus	3	Patienten	ANCOM -BC2	-0,94 ($\pm 0,34$)	-	Full- Length	Saliva
			LEfSe	-	3,58	Full- Length	Supra
			LEfSe	-	3,09	Short- Read	Saliva
Anaeroglobus geminatus	3	Patienten	LEfSe	-	2,72	Full- Length	Saliva
			LEfSe	-	3,04	Full- Length	Supra
			LEfSe	-	2,52	Short- Read	Saliva
Mycoplasma salivarum	3	Patienten	LEfSe	-	2,11	Full- Length	Supra
			Struk. Null	-	-	Full- Length	Saliva
			Struk. Null	-	-	Full- Length	Supra
Granulicatella adiacens*	3	Kontrollen	ANCOM -BC2	0,71 ($\pm 0,23$)	-	Metage- nomisch	Saliva
			ANCOM -BC2	0,72 ($\pm 0,24$)	-	Short- Read	Supra
			LEfSe	-	-2,93	Short- Read	Supra
Haemophilus sputorum	3	Kontrollen	ANCOM -BC2	0,55 ($\pm 0,18$)	-	Metage- nomisch	Saliva
			ANCOM -BC2	1,11 ($\pm 0,23$)	-	Full- Length	Saliva
			ANCOM -BC2	1,47 ($\pm 0,22$)	-	Full- Length	Supra
Streptococcus* parasanguinis	3	Kontrollen	ANCOM -BC2	1,06 ($\pm 0,30$)	-	Metage- nomisch	Saliva

			ANCOM-BC2	0,80 ($\pm$,29)	-	Full-Length	Supra
			LEfSe	-	-3,63	Metagenomisch	Saliva
Lachnoaerobaculum saburreum	3	Kontrollen	ANCOM-BC2	0,73 ($\pm$ 0,24)	-	Metagenomisch	Saliva
			ANCOM-BC2	1,15 ($\pm$ 0,26)	-	Full-Length	Supra
			LEfSe	-	-3,01	Full-Length	Supra
Veillonella dispar	3	Kontrollen	ANCOM-BC2	1,06 ($\pm$ 0,27)	-	Metagenomisch	Saliva
			LEfSe	-	-3,73	Metagenomisch	Saliva
			LEfSe	-	-4,15	Full-Length	Saliva
Kingella oralis*	3	Kontrollen	ANCOM-BC2	0,91 ($\pm$ 0,31)	-	Full-Length	Supra
			ANCOM-BC2	1,35 ($\pm$ 0,42)	-	Short-Read	Supra
			LEfSe	-	-3,28	Short-Read	Supra

Tabelle 20 Schnittmenge aller mittels LEfSe, oder ANCOM-BC2 identifizierten Bakterien-Spezies in salivaren Proben der metagenomischen, Full-Length- und Short-Read-16S-Sequenzierung. Mit * sind Bakterien-Spezies markiert, die bei mehrfacher Identifikation mit ANCOM-BC2 im Rahmen der Sensitivitäts-Analyse mit aufsteigenden Pseudo-Counts konsistent weiterhin statistisch signifikant blieben. Dargestellt sind die Häufigkeit der Identifikation, die Gruppe mit erhöhtem Vorkommen, die statistischen Methoden, mit denen die Spezies identifiziert wurde, die Log-fold-change $\pm$ Standardfehler bei Identifikation mit ANCOM-BC2, beziehungsweise der LDA-score bei Identifikation mit LEfSe, sowie die Art der Sequenzierung.

Spezies	Häufigkeit	Gruppe	Statistik	Log-fold-change ($\pm$ Standardfehler)	LDA-score (log10)	Sequenzierung
Prevotella nigrescens	4	Patienten	ANCOM-BC2	-1,51 ($\pm$ 0,34)	-	Full-Length
			ANCOM-BC2	-1,23 ($\pm$ 0,39)	-	Short-Read
			LEfSe	-	3,48	Full-Length
			LEfSe	-	3,48	Short-Read
Prevotella maculosa*	4	Patienten	ANCOM-BC2	-0,61 ($\pm$ 0,21)	-	Full-Length
			ANCOM-BC2	-1,15 ($\pm$ 0,32)	-	Short-Read
			LEfSe	-	2,31	Full-Length
			LEfSe	-	2,46	Short-Read
Prevotella oralis	3	Patienten	ANCOM-BC2	-0,80 ($\pm$ 0,19)	-	Metagenomisch
			ANCOM-BC2	-0,81 ($\pm$ 0,18)	-	Full-Length
			LEfSe	-	2,01	Full-Length
Dialister pneumosintes	3	Patienten	ANCOM-BC2	-0,93 ($\pm$ 0,24)	-	Full-Length
			ANCOM-BC2	-1,18 ($\pm$ 0,35)	-	Short-Read
			LEfSe	-	2,61	Full-Length
Streptococcus anginosus	3	Patienten	ANCOM-BC2	-1,27 ($\pm$ 0,38)	-	Short-Read
			LEfSe	-	3,13	Full-Length
			LEfSe	-	3,16	Short-Read
Selenomonas infelix	3	Patienten	ANCOM-BC2	-0,82 ($\pm$ 0,24)	-	Full-Length
			LEfSe	-	2,57	Full-Length
			LEfSe	-	2,56	Short-Read
Lactobacillus oris	3	Patienten	ANCOM-BC2	-1,23 ($\pm$ 0,32)	-	Short-Read
			LEfSe	-	2,46	Full-Length
			LEfSe	-	2,28	Short-Read
Veillonella dispar	3	Kontrollen	ANCOM-BC2	1,06 ($\pm$ 0,27)	-	Metagenomisch
			LEfSe	-	-3,73	Metagenomisch
			LEfSe	-	-4,15	Full-Length

Tabelle 21 Schnittmenge aller mittels LEfSe, oder ANCOM-BC2 identifizierten Bakterien-Spezies in supragingivalen Proben der Full-Length- und Short-Read-16S-Sequenzierung. Mit * sind Bakterien-Spezies markiert, die bei mehrfacher Identifikation mit ANCOM-BC2 im Rahmen der Sensitivitäts-Analyse mit aufsteigenden Pseudo-Counts konsistent weiterhin statistisch signifikant blieben. Dargestellt sind die Häufigkeit der Identifikation, die Gruppe mit erhöhtem Vorkommen, die statistischen Methoden, mit denen die Spezies identifiziert wurde, die Log-fold-change $\pm$ Standardfehler bei Identifikation mit ANCOM-BC2, beziehungsweise der LDA-score bei Identifikation mit LEfSe, sowie die Art der Sequenzierung.

Spezies	Häufigkeit	Gruppe	Statistik	Log-fold-change ($\pm$ Standardfehler)	LDA-score (log10)	Sequenzierung
Schwartzia succinivorans	4	Patienten	ANCOM-BC2	-0,76 ($\pm$ 0,27)		Full-Length
			ANCOM-BC2	-1,12 ($\pm$ 0,39)		Short-Read
			LEfSe	-	3,18	Full-Length
			LEfSe	-	2,70	Short-Read
Aggregatibacter aphrophilus	4	Kontrollen	ANCOM-BC2	1,01 ($\pm$ 0,36)	-	Full-Length
			ANCOM-BC2	1,44 ($\pm$ 0,50)	-	Short-Read
			LEfSe	-	-3,71	Full-Length
			LEfSe	-	-2,84	Short-Read
Lactobacillus rhamnosus	3	Patienten	ANCOM-BC2	-2,33 ($\pm$ 0,36)		Short-Read
			LEfSe	-	2,31	Full-Length
			Struk. Null	-	-	Full-Length
Lactobacillus paracasei	3	Patienten	LEfSe	-	2,27	Full-Length
			LEfSe	-	2,17	Short-Read
			Struk. Null	-	-	Full-Length
Kingella oralis	3	Kontrollen	ANCOM-BC2	0,91 ($\pm$ 0,31)	-	Full-Length
			ANCOM-BC2	1,35 ($\pm$ 0,42)	-	Short-Read
			LEfSe	-	-3,28	Short-Read

4 Diskussion

4.1 Allgemeine Bewertung der Ergebnisse

Bezugnehmend auf das Hauptziel der vorliegenden Arbeit (siehe 1.4 Ziele der Arbeit) konnte ein Unterschied zwischen dem oralen Mikrobiom von Patienten mit Demenz bei Alzheimer-Krankheit und gesunden Kontroll-Probanden identifiziert werden. Zwar konnte kein konsistenter Unterschied in der Alpha-Diversität zwischen den beiden Gruppen identifiziert werden, jedoch lassen sich auf Ebene der Beta-Diversität Unterschiede festhalten: Zum einen zeigen sich im Rahmen der verschiedenen PCoAs kompositionelle Unterschiede in Form einer wiederholt erkennbaren Trennung der beiden Gruppen. Zum anderen konnten in allen Probenarten und Sequenzierungs-Methoden Taxa identifiziert werden, deren Abundanz sich zwischen den beiden Gruppen signifikant unterschied. Unter diesen Taxa lässt sich eine gewisse Anzahl von konsistent identifizierten Spezies eingrenzen, die als robusteres Unterscheidungsmerkmal der Mikrobiota der beiden Gruppen betrachtet werden können.

4.2 Konsistent identifizierte Taxa

Insgesamt konnten 27 Bakterien-Spezies als konsistent unterschiedlich zwischen den beiden Probandengruppen identifiziert werden und können daher als robusteres Unterscheidungsmerkmal herangezogen werden. Im Folgenden sollen diese Taxa in einen biologischen Kontext gesetzt und im Hinblick auf ihre Pathogenität, beziehungsweise Bedeutung für das orale Mikrobiom eingeordnet werden. Auf diese Weise können die statistisch festgehaltenen Unterschiede näher dahingehend betrachtet werden, ob man sie als orale Dysbiose betrachten darf, oder nicht.

Da der Begriff der Dysbiose schwer zu definieren ist (Lloyd-Price et al., 2016), können verschiedene Ebenen der Evidenz als Beleg für den “dysbiotischen Charakter” eines oralen Taxons herangezogen werden: Zum einen können Taxa mit Bezug zu oralen Pathologien als Indikator einer Dysbiose betrachtet werden, da vor allem Parodontalerkrankungen und Karies als polymikrobielle, dysbiotische Krankheiten charakterisiert werden (Costalonga et al., 2014, DG PARO, DGZMK, AWMF 2020). Hierbei finden Arbeiten Berücksichtigung, die entweder das Taxon im Rahmen der Pathologie identifiziert haben, oder einen Unterschied der Abundanz des Taxons zwischen einer Gruppe von Erkrankten und einer Gruppe von Gesunden identifiziert

haben, oder aber einen wichtigen, mechanistischen Beleg der Pathogenität erbringen. Bei Vertretern hoch-abundanter, oraler Genera, Genera, die in ihrer Gesamtheit im Kontext oraler Gesundheit eingeordnet werden können, sowie Genera ohne bekannten Bezug zu oraler Gesundheit aber mit statistisch signifikantem Unterschied im Einklang mit einer/mehreren Spezies sollen außerdem auch der Genus und weitere, weniger konsistent identifizierte Spezies desselben Genus beleuchtet werden.

Außerdem werden frühere Arbeiten zum oralen Mikrobiom bei Alzheimer-Krankheit, beziehungsweise Demenz (siehe 1.3.3 Orale Dysbiose in Alzheimer-Patienten) dahingehend betrachtet, ob sich die hier diskutierten Taxa dort wiederfinden. Insofern sich einzelne Taxa auch anderweitig sinnvoll in Bezug zu neurodegenerativen Erkrankungen setzen lassen, soll auch dieser Zusammenhang beleuchtet werden.

Zusätzlich zu den konsistent identifizierten Taxa werden einige Taxa diskutiert, deren Identifikation zwar weniger robust ist, die aber dafür im Kontext oraler Pathologien und des oralen Mikrobioms eine gut beschriebene Rolle einnehmen.

Genus Prevotella: Der Genus Prevotella zählt zu den Taxa mit der höchsten Abundanz im oralen Mikrobiom (Könönen et al., 2022) und konnte auch in der vorliegenden Arbeit vor allem im Saliva mit einem Anteil von bis zu 17,21% nachgewiesen werden (siehe 3.3.1 Durchschnittliche relative Abundanzen). Allgemein kommen Spezies dieses Genus hauptsächlich als Kommensale ohne unmittelbare Pathogenität vor. Jedoch gelten die Spezies *P.intermedia*, *P.nigrescens*, *P.aurantiaca* und *P.pallens* (auch zusammen als *P.intermedia*-Gruppe bezeichnet) als wichtige Verursacher von Parodontitis, die zwar auch als Kommensale vorkommen, deren Pathogenität im subgingivalen Biofilm jedoch deutlich zunehmen kann (Könönen et al., 2022). Speziell *P.nigrescens* und *P.intermedia* werden dabei auch zum Orange-Complex gezählt und gelten damit als wichtige, wenn auch nicht die wichtigsten Parodontitis-Erreger (Abdulkareem et al., 2023, Socransky et al., 1998).

Andere Prevotella-Spezies werden als Teil des Kern-Mikrobioms im Mund betrachtet und gelten daher eher als Gesundheits-assoziiert (Könönen et al., 2022). Ein solches Kern-Mikrobiom soll sich dabei unter anderem durch eine größere Stabilität und Resilienz gegenüber Umwelteinflüssen auszeichnen (Lloyd-Price et al., 2016).

Zu diesen Spezies wird vor allem *P.melaninogenica* gezählt, sowie seltener *P.denticola*, *P.multiformis* und *Alloprevotella tanneriae* des nah verwandten Genus *Alloprevotella* (Könönen et al., 2022).

Für den Genus *Prevotella* als Ganzes konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen identifiziert werden. Nichtsdestotrotz zeigen diverse *Prevotella*-Spezies statistisch signifikante Unterschiede, wobei vier Vertreter zu den konsistent identifizierten Taxa gezählt werden können (siehe Tabelle 19). Der Nachweis dieser Taxa erfolgte hauptsächlich im Saliva (siehe Tabelle 20). Über diese Taxa hinaus lassen sich außerdem *P.aurantiaca*, *P.loescheii*, *P.oulorum*, *P.denticola*, *P.multiformis*, *A.tanneriae*, *P.dentasini* und *P.baroniae* als Spezies mit Bezug zur oralen Gesundheit und höherer Abundanz in Patienten und *P.scopos*, *P.saccharolytica*, *P.dentalis*, *P.enoecca*, *P.fusca*, *P.melaninogenica* und *P.salivae* als Spezies mit höherer Abundanz in Kontrollen identifizieren.

P.aurantiaca, *P.loescheii*, *P.oulorum* und *P.baroniae* in Patienten wurden alle mit Parodontitis, Karies und/oder endodontalen Infektionen in Verbindung gebracht, wobei *P.aurantiaca* auch zur pathogenen *P.intermedia*-Gruppe gezählt wird (Könönen et al., 2022). Die anderen in Patienten identifizierten Spezies *P.denticola*, *P.multiformis* und *A.tanneriae* werden hingegen eher zum Gesundheits-assoziierten Kern-Mikrobiom gezählt (Könönen et al., 2022), wobei dieser Zusammenhang nicht eindeutig ist und zum Beispiel *P.denticola* auch im Kontext von Parodontitis diskutiert wird (Diaz et al., 2016). *P.dentasini* ist eine selten beschriebene Spezies, die phylogenetisch eng mit *P.multiformis* verwandt ist (Takada et al., 2010). Beim Vergleich der Abundanz im Saliva von Patienten mit nur Parodontitis, Parodontitis mit Morbus Crohn und gesunden Kontrollen, konnten höhere Abundanzen von *P.dentasini* in den beiden Patientengruppen verglichen mit den Kontrollen nachgewiesen werden (Sun et al., 2021).

In Kontrollen konnten *P.salivae*, *P.fusca*, *P.enoecca*, *P.dentalis*, *P.scopos* und *P.saccharolytica* vereinzelt mit Parodontitis, Karies, endodontalen Infektionen und Implantat-Mukositis in Verbindung gebracht werden. Im Gegensatz dazu kann *P.melaninogenica* als wichtigster Vertreter des Genus *Prevotella* im oralen Kern-Mikrobiom betrachtet werden (Könönen et al., 2022), der aber ähnlich wie *P.denticola* trotzdem auch bei Parodontitis beobachtet wird (Diaz et al., 2016).

Außerdem konnten sowohl der Genus *Prevotella*, als auch mehrere der genannten Spezies im Kontext des oralen Mikrobioms bei Alzheimer identifiziert werden: So konnten im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sowohl höhere (Chen et al., 2024), als auch niedrigere Abundanzen (Issilbayeva et al., 2024, Yang, Tao et al., 2021) von *Prevotella* in Patienten mit Demenz bei Alzheimer-Krankheit identifiziert werden.

Übereinstimmend mit den hier vorliegenden Ergebnissen konnten zuvor *P.multiformis* (Na et al., 2024), *P.denticola* (Guo, Li et al., 2023) und *P.oulorum* (Holmer et al., 2021, Na et al., 2024) als höher abundante Spezies in Patienten und *P.melaninogenica* als Spezies mit niedrigerer Abundanz in Patienten (Issilbayeva et al., 2024), aber in einer weiteren Arbeit negativer Korrelation mit der kognitiven Leistung (Qiu et al., 2024) identifiziert werden. Im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit wurden außerdem *A.tanneriae* als höher abundant in kognitiv Gesunden (Bathini et al., 2020) und *P.salivae* als höher abundant in Alzheimer-Patienten mit Parodontitis verglichen mit Kontrollen mit nur Parodontitis beschrieben (Na et al., 2024).

Prevotella nigrescens: *P.nigrescens* konnte sechsmal mit einer signifikant höheren Abundanz in der Patientengruppe identifiziert werden. Als Teil des Orange-Complex und der *P.intermedia*-Gruppe wird es als ein wichtiger Mitverursacher von Parodontitis betrachtet (Abdulkareem et al., 2023, Könönen et al., 2022, Socransky et al., 1998). Im Einklang mit dieser Einschätzung ließ sich *P.nigrescens* signifikant häufiger im subgingivalen Plaque von Parodontitis-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen nachweisen und zeigte dabei eine Assoziation mit klinischen Parodontitis-Indizes (Stingu et al., 2012, Stingu et al., 2013). Das Transkriptions-Profil unterschied sich dabei zwischen Parodontitis-Patienten und Kontrollen dahingehend, dass sich *P.nigrescens* vom Kommensalen hin zu mehr Pathogenität mit vermehrter Expression von Metalloproteinasen und Häm-Transportern entwickelt (Szafrński et al., 2015). Auf der anderen Seite konnte diese Spezies in einzelnen Fällen vermehrt im Gesunden identifiziert werden (Kotrashetti et al., 2023), was mit dem Charakter des Genus *Prevotella* als oraler Kommensale erklärt werden kann.

Im Kontext von Alzheimer konnten Na et al. eine höhere Abundanz von *P.nigrescens* im subgingivalen Plaque von Patienten verglichen mit Kontrollen mit lediglich Parodontitis nachweisen (Na et al., 2024). Außerdem konnte bereits zuvor eine erhöhte

Mortalität von Alzheimer-Patienten mit höheren Konzentrationen von Antikörpern gegen *P.nigrescens* beobachtet werden (Beydoun et al., 2020).

Prevotella maculosa: *P.maculosa* konnte viermal mit einer signifikant höheren Abundanz in der Patientengruppe identifiziert werden. Dabei handelt es sich um eine von nur zwei Spezies, die bei mehrfacher Identifikation mit ANCOM-BC2 im Rahmen der Sensitivitäts-Analyse mit aufsteigenden Pseudo-Counts konsistent weiterhin statistisch signifikant blieben. Obwohl nur wenig Literatur zu diesem Taxon existiert, wurde es als saccharolytisch und Säure-produzierend beschrieben (Downes et al., 2007). Im Einklang damit konnten höhere Abundanzen von *P.maculosa* im Wurzelkanal von Zähnen mit endodontalen Infektionen vor Therapie verglichen mit dem Zustand danach beobachtet werden (Abraham et al., 2024). Auch bei oraler Gabe des probiotischen *Lactobacillus reuteri* mit vorbeschriebener, inhibierender Wirkung auf orale Pathogene, konnte eine Abnahme der Abundanz von *P.maculosa* im supragingivalen Plaque zusammen mit mehreren, besser charakterisierten oralen Pathogenen gezeigt werden (Romani Vestman et al., 2015). Und nicht zuletzt konnten Na et al. eine höhere Abundanz von *P.maculosa* im subgingivalen Plaque von Alzheimer-Patienten verglichen mit Kontrollen mit lediglich Parodontitis nachweisen (Na et al., 2024).

Prevotella oralis: *P.oralis* konnte dreimal mit einer signifikant höheren Abundanz in der Patientengruppe identifiziert werden. Diese Spezies gilt als Parodontitis-assoziiert (Diaz et al., 2016) und konnte im subgingivalen Plaque von Parodontitis-Patienten nachgewiesen werden (Nadkarni et al., 2012). Beim Vergleich der Abundanz im subgingivalen Plaque an gesunden und entzündeten Lokalisationen zeigte sich eine höhere Abundanz in entzündeten Bereichen (Nadkarni et al., 2015). Und auch im Saliva von Patienten mit chronischer Parodontitis konnte eine höhere Abundanz von *P.oralis* verglichen mit dem Saliva von gesunden Kontrollen dokumentiert werden (Lu et al., 2022).

Prevotella multisaccharivorax: *P.multisaccharivorax* konnte dreimal mit einer signifikant höheren Abundanz in der Patientengruppe identifiziert werden. Diese *Prevotella*-Spezies wurde in endodontalen Infektionen nachgewiesen (George et al., 2016, Rôças und Siqueira, 2009) und findet sich in höheren Abundanzen im supragingivalen Plaque von Kindern und Erwachsenen mit Karies wieder, verglichen mit gesunden Kontrollen (Chen et al., 2015, Könönen et al., 2022, Preza et al., 2008, Skelly et al., 2020).

Prevotella intermedia: *P. intermedia* konnte nur einmal mit einer signifikant höheren Abundanz in Patienten identifiziert werden und zählt damit nicht zu den konsistent identifizierten Taxa. Da diese Spezies jedoch Teil des Orange-Complex (Abdulkareem et al., 2023, Socransky et al., 1998) und einer der beiden wichtigsten Vertreter der Parodontitis-assoziierten *P. intermedia*-Gruppe ist (Könönen et al., 2022), ist sie eng mit der Entstehung von Parodontitis verbunden und ließ sich entsprechend auch deutlich häufiger im subgingivalen Plaque von Parodontitis-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen nachweisen (Diaz et al., 2016, Stingu et al., 2012). Auch beim Vergleich symptomatischer und asymptomatischer endodontaler Läsionen ließ sich *P. intermedia* ausschließlicher in symptomatischen Läsionen nachweisen (Sakamoto et al., 2006).

Höhere *P. intermedia*-Antikörper-Konzentrationen im Blut waren darüber hinaus assoziiert mit höherer Mortalität bei Alzheimer (Beydoun et al., 2020) und einer höheren Alzheimer-Inzidenz (Sparks et al., 2012). Und bei Vergleich der oralen Abundanz zwischen Patienten mit Alzheimer und gesunden Kontrollen konnte außerdem ein höheres Aufkommen von *P. intermedia* in Patienten gezeigt werden (Taati Moghadam et al., 2022).

Zusammenfassend lässt sich ein Trend für die Verteilung der unterschiedlichen *Prevotella*-Spezies festhalten: Die konsistent identifizierten Taxa finden sich alle mit höherer Abundanz in der Patientengruppe wieder und können eher als Pathologie-assoziiert betrachtet werden. Daneben finden sich weitere *Prevotella*-Spezies, die sich auf den ersten Blick relativ gleichmäßig über Patienten- und Kontrollgruppe verteilen. Bei genauerer Betrachtung kann man jedoch festhalten, dass *P. intermedia* und *P. aurantiaca* in der Patientengruppe als Teil des Orange-Complex (Abdulkareem et al., 2023, Socransky et al., 1998) und der *P. intermedia*-Gruppe (Könönen et al., 2022) enger als die anderen genannten Spezies mit oralen Pathologien in Verbindung stehen. Auf der anderen Seite findet sich eine signifikant höhere Abundanz von *P. melaninogenica* in der Kontrollgruppe wieder. Diese Spezies wird am ehesten als Teil des Gesundheits-assoziierten, oralen Kern-Mikrobioms beschrieben (Könönen et al., 2022). *P. nigrescens* und *P. intermedia* wurden darüber hinaus als potentiell wichtige Prädiktoren von dysbiotischen Verschiebungen im subgingivalen Ökosystem beschrieben (Zhang et al., 2017).

Mit der nötigen Vorsicht im Hinblick auf die geringere Robustheit der weniger konsistent identifizierten Taxa und der komplexen Natur von *Prevotella*-Spezies als

orale Kommensale mit teils pathogenem Potential (Könönen et al., 2022), lässt sich damit ein Trend hin zu einer eher pathologischen, dysbiotischen Verteilung dieses Genus zwischen Alzheimer-Patienten und Kontrollen festhalten. Ein ähnlicher Zusammenhang konnte auch in der Mehrzahl früherer Arbeiten zum oralen Mikrobiom bei Alzheimer gezeigt werden, insofern in diesen Prevotella-Spezies als differentiell abundant identifiziert wurden (Guo, Li et al., 2023, Holmer et al., 2021, Issilbayeva et al., 2024, Taati Moghadam et al., 2022, Na et al., 2024, Qiu et al., 2024).

Schwartzia succinivorans: S.succinivorans konnte sechsmal mit einer signifikant höheren Abundanz in der Patientengruppe identifiziert werden (siehe Tabelle 19). Der Nachweis erfolgte dabei hauptsächlich supragingival (siehe Tabelle 21). Auch für den Genus Schwartzia konnte eine signifikant höhere Abundanz in Patienten gezeigt werden, auch wenn sich keine weiteren Spezies dieses Genus identifizieren ließen (siehe 8.5 Weitere Tabellen).

S.succinivorans ist dabei ein wenig beschriebenes Taxon, das im Wesentlichen als Kommensale im Rumen von Kühen identifiziert wurde (van Gylswyk et al., 1997). Nichtsdestotrotz wurde der Genus Schwartzia in einer Multiomics-Arbeit als Parodontitis-assoziiert beschrieben (Sisk-Hackworth et al., 2021) und kommt vermehrt supragingival bei Karies (Celik et al., 2021) und subgingival bei Parodontitis vor (Camelo-Castillo, Mira et al., 2015).

Genus Lactobacillus: Der Genus Lactobacillus macht nur einen kleinen Anteil des oralen Mikrobioms aus und konnte auch in der vorliegenden Arbeit lediglich mit einem Anteil von maximal 1,56% im Saliva identifiziert werden (3.4.1.1 Durchschnittliche relative Abundanzen).

Spezies dieses Genus spielen jedoch trotzdem als Säure-Bildner eine Rolle bei der Entstehung von Karies. Es wurde beschrieben, dass dieser Genus theoretisch bei Karies-Freiheit nicht auffindbar sein sollte. Da die Prävalenz für Karies jedoch extrem hoch ist, ist ein komplettes Fehlen dieses Genus selten (Caufield et al., 2015). Die Bedeutung für die orale Gesundheit ist außerdem deswegen komplex, weil auch inhibitorische Effekte beschrieben sind und viele Lactobacillus-Spezies erfolgreich als Probiotikum mit antikariogenem Effekt eingesetzt wurden (Wen et al., 2022).

Trotzdem lassen sich L.paracasei, L.casei, L.rhamnosus, L.fermentum, L.gasseri und L.salivarius häufig in Kariesläsionen nachweisen und zumindest L.casei, L.paracasei,

L.rhamnosus und *L.gasseri* zeigen eine gesteigerte Biofilm-Bildung in Co-Kultur mit dem zentralen Karieserreger *Streptococcus mutans*. Andere Spezies finden sich zwar ebenfalls in Kariesläsionen, jedoch insgesamt weniger häufig (Wen et al., 2022).

Sechs *Lactobacillus*-Spezies konnten als konsistente Taxa identifiziert werden (siehe Tabelle 19). Diese sechs Spezies zeigten dabei alle eine signifikant höhere Abundanz in der Patienten-Gruppe, was sich auch in einer signifikant höheren Abundanz des Genus als Ganzes zeigt (siehe 8.5 Weitere Tabellen). Über diese Taxa hinaus ließen sich außerdem *L.salivarius*, *L.fermentum*, *L.casei*, *L.paragasseri* und *L.helveticus* als Spezies mit Bezug zur oralen Gesundheit und höherer Abundanz in Patienten und *L.ultunensis* und *L.delbrueckii* als Spezies mit höherer Abundanz in Kontrollen identifizieren.

L.salivarius, *L.fermentum* und *L.casei* wurden relativ konsistent mit Karies in Verbindung gebracht und im Saliva und Plaque von Patienten nachgewiesen (Caufield et al., 2015, Smith et al., 2001, Wen et al., 2022). *L.casei* ist dabei außerdem eng verwandt mit *L.paracasei* (Wen et al., 2022), der als konsistentes Taxon identifiziert wurde. *L.paragasseri* findet nur selten Erwähnung im Kontext oraler Pathologien, ist jedoch wiederum mit dem ebenfalls konsistent identifizierten *L.gasseri* phylogenetisch eng verwandt (Tanizawa et al., 2018). Dabei sind sich diese Spezies genetisch so ähnlich, dass sie sich mittels Short-Read-Sequencing nicht sicher differenzieren lassen (Ene et al., 2022). *L.helveticus* wird im Kontext von Karies seltener erwähnt, ließ sich jedoch ebenfalls in kindlichen Kariesläsionen nachweisen (Ahirwar et al., 2021).

Die eher in Kontrollen identifizierten Spezies *L.ultunensis* und *L.delbrueckii* konnten ebenfalls in Saliva und Plaque von Kariespatienten identifiziert werden (Ahirwar et al., 2021, Byun et al., 2004, Smith et al., 2001).

Darüber hinaus konnte der Genus *Lactobacillus* zweimal mit einer höheren (Issilbayeva et al., 2024, Wu et al., 2021) und einmal mit einer geringeren Abundanz im Mund von Alzheimer-Patienten identifiziert werden (Chen et al., 2024). Außerdem konnte *L.salivarius* mit einer höheren Abundanz im Saliva von Alzheimer-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen nachgewiesen werden (Guo, Li et al., 2023).

***Lactobacillus rhamnosus*:** *L.rhamnosus* konnte fünfmal mit einer signifikant höheren Abundanz in der Patientengruppe identifiziert werden. Diese Spezies zeigt eine kariogene Wirkung in-vitro (Schwendicke et al., 2014) und ließ sich in aktiven Läsionen von kindlichem (Reis et al., 2021, Ahirwar et al., 2021) und adultem Karies (Byun et al.,

2004), sowie der Frühphase von Pulpitis (Nadkarni et al., 2010) nachweisen. Außerdem kann man in-vitro eine gesteigerte Biofilm-Bildung in Co-Kultur mit *Streptococcus mutans* beobachten (Wen et al., 2022).

Paradoxerweise hat *L.rhamnosus* aber auch antikariogene Wirkung und führte zu einer Verbesserung von Parodontitis-Indizes bei Gabe als Probiotikum (D'Agostino et al., 2024).

Lactobacillus vaginalis: *L.vaginalis* konnte viermal mit einer signifikant höheren Abundanz in der Patientengruppe identifiziert werden. Wie der Name suggeriert, wurde diese Spezies ursprünglich in der Vagina isoliert (Embley et al., 1989). *L.vaginalis* konnte jedoch auch im Saliva von Karies-Patienten (Caufield et al., 2007), sowie in Kariesläsionen und Wurzelkanälen nachgewiesen werden (Kazemtabrizi et al., 2020). Verglichen mit gesunden Kontrollen ließen sich außerdem höhere Abundanzen von *L.vaginalis* im supragingivalen Plaque von Kindern (Kanasi et al., 2010) und Hämodialyse-Patienten mit Karies nachweisen (Yue et al., 2018).

Lactobacillus oris: *L.oris* konnte viermal mit einer signifikant höheren Abundanz in der Patientengruppe identifiziert werden. Dieser Vertreter des Genus *Lactobacillus* wurde ebenfalls in Karies nachgewiesen, jedoch weniger häufig als andere Spezies (Caufield et al., 2015). Darüber hinaus gilt er auch nur als ein moderater Säure-Bildner (Piwat et al., 2012). Dafür zeigt er ebenfalls in-vitro eine moderat-protektive Wirkung gegen orale Pathogene (Köll et al., 2008, Teanpaisan et al., 2011).

Lactobacillus paracasei: *L.paracasei* konnte viermal mit einer signifikant höheren Abundanz in der Patientengruppe identifiziert werden. Diese *Lactobacillus*-Spezies ist eng mit kindlichem Karies assoziiert (Wen et al., 2022) und konnte in aktiven Kariesläsionen nachgewiesen werden (Reis et al., 2021). *L.paracasei* zeigt außerdem eine gesteigerte Biofilm-Bildung in Co-Kultur mit *Streptococcus mutans* (Wen et al., 2022), wobei für die Gabe als Probiotikum auch der genau gegenteilige Effekt beobachtet wurde (Guo, Wu et al., 2023).

Lactobacillus gasseri: *L.gasseri* konnte dreimal mit einer signifikant höheren Abundanz in der Patientengruppe identifiziert werden. Hinzu kommt eine Identifikation des nah verwandten *L.paragasseri*, ebenfalls mit höherer Abundanz in der Patientengruppe. Diese beiden Spezies sind sich phylogenetisch so nahe, dass eine

sichere Differenzierung im Rahmen von Short-Read-Sequenzierung bereits in Frage gestellt wurde (Ene et al., 2022, Tanizawa et al., 2018) (siehe Genus *Lactobacillus*).

L. gasseri konnte zum Teil als eine der häufigsten Spezies in Kariesläsionen (Byun et al., 2004, Kneist et al., 2010, Munson et al., 2004, Schulze-Schweifing et al., 2014) und dem Saliva von Patienten mit Karies (Smith et al., 2001) nachgewiesen werden. Beim Vergleich von gesunden Kontrollen mit Karies-Patienten wiesen Patienten höhere Abundanzen auf (Kanasi et al., 2010, Skelly et al., 2020, Wolff et al., 2019), wobei in Saliva und subgingivalem Plaque von Parodontitis-Patienten auch das Gegenteil beobachtet wurde (Köll-Klais et al., 2005). Außerdem wurde bei Kindern mit Karies ein Anstieg der Abundanz im zeitlichen Verlauf verglichen zur konstanten Abundanz bei gesunden Kindern dokumentiert (Wang et al., 2022).

***Lactobacillus crispatus*:** *L. crispatus* konnte dreimal mit einer signifikant höheren Abundanz in der Patientengruppe identifiziert werden. Ähnlich wie die anderen *Lactobacillus*-Spezies konnte *L. crispatus* in Kariesläsionen nachgewiesen werden (Byun et al., 2004), speziell, wenn in diesen ein niedriger pH gemessen wurde (Kianoush et al., 2014). Passend dazu ließ sich auch eine höhere Abundanz im supragingivalen Plaque von Patienten mit Karies verglichen mit gesunden Kontrollen beobachten (Chen et al., 2015).

Insgesamt lässt sich für den Genus *Lactobacillus* und die zugehörigen Spezies ein ähnlicher Trend beobachten wie für die *Prevotella*-Spezies: Die konsistent identifizierten Taxa, sowie der Genus als Ganzes finden sich alle mit einer signifikant höheren Abundanz in der Patientengruppe wieder. Von den weiteren, weniger konsistent identifizierten Spezies finden sich die meisten ebenfalls in der Patientengruppe. Außerdem lassen sich die in Patienten identifizierten Spezies insgesamt klarer mit oralen Pathologien und vor allem Karies in Verbindung bringen. Die einzigen beiden *Lactobacillus*-Spezies, die mit signifikant höherer Abundanz in Kontrollen identifiziert wurden, zählen weder zu den konsistent identifizierten Taxa, noch finden sie häufige Erwähnung in der Literatur rund um den pathogenen Charakter dieses Genus im Mund.

Hinzu kommt, dass die identifizierten *Lactobacillus*-Spezies trotz ihres insgesamt deutlich geringeren Anteils am Gesamt-Mikrobiom einen deutlich schärferen Kontrast zwischen Patienten und Kontrollen zeigen: Vergleicht man die mittels ANCOM-BC2

ermittelte Log-fold-change der konsistent identifizierten Prevotella- und Lactobacillus-Spezies, fällt auf, dass diese für die Lactobacillus-Spezies deutlich höher ausfällt (siehe Tabelle 19). Ein solcher Trend hin zu einer geringen, aber konsistent nachweisbaren Abundanz in einer Gruppe, die als “dysbiotisch” vermutet wird und einer gewissen Absenz in der “gesunden” Gruppe wäre im Einklang mit der Vorstellung von Lactobacillus als Genus, der nur im pathologischen Kontext nachweisbar ist (Caufield et al., 2015).

Olsenella uli: O.uli konnte viermal mit einer signifikant höheren Abundanz in der Patientengruppe identifiziert werden (siehe Tabelle 19). Auch für den Genus Olsenella konnte eine signifikant höhere Abundanz in Patienten gezeigt werden (siehe 8.5 Weitere Tabellen). O.uli ließ sich in endodontalen Läsionen (Rôças und Siqueira, 2005, Pinheiro et al., 2024, Siqueira und Rôças 2005, Siqueira et al., 2024) und in apikaler Parodontitis (Nardello et al., 2020) nachweisen. Außerdem konnte in endodontalen Läsionen eine höhere Abundanz in persistierenden, verglichen mit primären Infektionen beobachtet werden (Kesim et al., 2023).

Beim Vergleich mit gesunden Kontrollen zeigte sich eine höhere Abundanz in subgingivalem Plaque von Parodontitis-Patienten (Vieira Colombo et al., 2016), bei Peri-Implantitis (Kim et al., 2023) und im Saliva von Kindern mit Karies (Wang et al., 2019). Zusätzlich konnte eine höhere Abundanz im Saliva von gesunden Kontrollen verglichen mit Patienten mit MCI beobachtet werden (Da et al., 2023).

Von dem Genus Olsenella konnte außerdem O.profusa mit einer signifikant höheren Abundanz in Patienten identifiziert werden, wenn auch nicht als konsistentes Taxon. O.profusa konnte in Kariesläsionen (Munson et al., 2004) und endodontalen Läsionen gefunden werden (Ordinola-Zapata et al., 2024, Rôças und Siqueira, 2005). Beim Vergleich mit gesunden Kontrollen fanden sich höhere Abundanzen dieses Taxon im supragingivalen Plaque von Patienten mit Karies (Chen et al., 2015, Wolff et al., 2019), ähnlich wie im Plaque von Patienten mit Karies und reversibler Pulpitis verglichen mit Kontrollen mit nur Karies und intakter Pulpa (Selvakumar et al., 2021). Außerdem ist O.profusa das einzige Bakterium, dass sich bei Untersuchung von Proben aus fünf infizierten Wurzelkanälen in allen Proben wiederfand (Jacinto et al., 2007).

Aggregatibacter aphrophilus: A.aphrophilus konnte viermal mit einer signifikant höheren Abundanz in der Kontrollgruppe identifiziert werden (siehe Tabelle 19). Der

Nachweis erfolgte dabei hauptsächlich supragingival (siehe Tabelle 21). Auch für den Genus *Aggregatibacter* konnte eine signifikant höhere Abundanz in Kontrollen gezeigt werden (siehe 8.5 Weitere Tabellen). Als weitere Spezies dieses Genus, jedoch nicht als konsistentes Taxon, wurde *A.actinomycetemcomitans* ebenfalls mit einer höheren Abundanz in Kontrollen identifiziert. Da es sich bei dieser Spezies jedoch um einen bekannten Parodontitis-Erreger handelt (Visentin et al., 2023), wird sie separat beleuchtet (siehe *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*).

A.aphrophilus konnte in supragingivalem Plaque (Giacomini et al., 2024) und dem Wurzelkanal bei endodontalen Infektionen nachgewiesen werden (Tavares et al., 2011). Diese Spezies kann an dentalen Infektionen beteiligt sein, ist aber vor allem bekannt für periphere Infektionen, speziell Endokarditis (Zacarias Mendoza et al., 2023). Auch ein Fall von Hirnabszess nach Zahn-Extraktion ist beschrieben (Maraki et al., 2016).

Passend zu dem in dieser Arbeit erfolgten Nachweis in Kontrollen konnten auch Guo, Li et al. in Saliva und Gingivalflüssigkeit von gesunden Kontrollen signifikant höhere Abundanzen von *A.aphrophilus* verglichen mit Alzheimer-Patienten nachweisen (Guo, Li et al., 2023).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans: *A.actinomycetemcomitans* wurde zweimal mit einer signifikant höheren Abundanz in Kontrollen identifiziert. Damit zählt es zwar nicht zu den konsistent identifizierten Taxa. Jedoch wurde *A.actinomycetemcomitans* neben dem Red-Complex als eines der zentralen Pathogene bei Parodontitis beschrieben (Visentin et al., 2023) und zeigt eine enge phylogenetische Verwandtschaft mit *A.aphrophilus* (Nørskov-Lauritsen und Kilian, 2006). Paradoxerweise wurde diese Spezies ursprünglich als Teil des Green-Complex vereinbar mit parodontaler Gesundheit eingestuft (Carrouel et al., 2016, Socransky et al., 1998). Mittlerweile wird *A.actinomycetemcomitans* jedoch als einer von mehreren Vertretern aus Green-/Yellow-/Purple-Complex betrachtet, die auch in endodontalen Läsionen und bei Parodontitis identifiziert werden (Gambin et al., 2024), was die Einschätzung der pathologischen Natur des Nachweises schwierig macht.

A.actinomycetemcomitans dringt in gingivale Epithel-Zellen ein (Abdulkareem et al., 2023) und kann mit Hilfe sogenannter Leukotoxine die Immunantwort hemmen und erlaubt dadurch die Progression von Parodontitis (Visentin et al., 2023). Außerdem ist

diese Spezies dazu in der Lage, protektive Mechanismen Gesundheits-assoziiierter Kommensale zu hemmen (Duan et al., 2016) (siehe *Streptococcus parasanguinis*).

Darüber hinaus konnte man im Blut von Alzheimer-Patienten höhere Konzentrationen von Antikörpern gegen *A.actinomycetemcomitans* verglichen mit gesunden Kontrollen nachweisen (Kamer et al., 2009).

Der Genus *Aggregatibacter* und die ihm angehörenden Spezies *A.aphrophilus* und *A.actinomycetemcomitans* zeigen damit einen klaren Trend hin zu einem erhöhten Aufkommen in Kontrollen. Allerdings lässt sich dieses Aufkommen nur bedingt in einen eindeutigen, biologischen Kontext einordnen: Auf der einen Seite haben die beiden eng verwandten Spezies eindeutig ein pathologisches Potential, jedoch zeigt sich dieses im Fall von *A.aphrophilus* eher in Form von peripheren Infektionen (Zacarias Mendoza et al., 2023), während *A.actinomycetemcomitans* auch Teil des Gesundheits-assoziierten Green-Complex sein kann (Carrouel et al., 2016, Socransky et al., 1998).

Lancefieldella rimae: *L.rimae* konnte viermal mit einer signifikant höheren Abundanz in der Patientengruppe identifiziert werden (siehe Tabelle 19). Auch für den Genus *Lancefieldella* konnte eine signifikant höhere Abundanz in Patienten gezeigt werden (siehe 8.5 Weitere Tabellen). *L.rimae* findet nur relativ wenig Erwähnung in der Literatur rund um orale Pathologien. Trotzdem konnten Veras et al. eine signifikant höhere Abundanz in Patienten mit Parodontitis verglichen mit gesunden Kontrollen und eine Abnahme der Abundanz nach Therapie zeigen. Von den Autoren wurde diese Spezies daher als potentiell, neues parodontales Pathogen mit guter Evidenz eingestuft (Veras et al., 2023).

Außerdem konnte *L.parvula* als weiterer Vertreter dieses Genus mit höherer Abundanz in Patienten identifiziert werden. Diese Spezies konnte mit höherer Abundanz in persistierenden endodontalen Läsionen verglichen mit primären Infektionen nachgewiesen werden (Park et al., 2024).

Granulicatella adiacens: *G.adiacens* konnte dreimal mit einer signifikant höheren Abundanz in der Kontrollgruppe identifiziert werden (siehe Tabelle 19). Weder für den Genus *Granulicatella*, noch für weitere Spezies dieses Genus konnten Unterschiede beobachtet werden. *G.adiacens* wurde mit oraler Gesundheit in Verbindung gebracht (Diaz et al., 2016) und entsprechend mit höherer Abundanz im subgingivalen Plaque von gesunden Kontrollen verglichen mit Parodontitis-Patienten identifiziert (Lourenço

et al., 2014). Allerdings konnte diese Spezies auch in endodontalen Läsionen (Rôças und Siqueira, 2005) und dem subgingivalen Plaque von Patienten mit Parodontitis nachgewiesen werden (Colombo et al., 2009). Auch konnte man eine Abnahme der Abundanz in supragingivalem Plaque nach Einnahme des probiotischen *Lactobacillus reuteri* beobachten, aber ohne Eruierung klinischer Parameter (Romani Vestman et al., 2015).

Genus *Haemophilus*: Der Genus *Haemophilus* zählt zu den Taxa mit einer relativ hohen Abundanz im oralen Mikrobiom. Er wurde dabei als eines der prävalentesten Taxa im gesunden gingivalen Sulcus beschrieben (Sureda et al., 2020) und konnte auch in der vorliegenden Arbeit vor allem supragingival mit einem Anteil von bis zu 24,34% nachgewiesen werden (siehe 3.4.2.1 Durchschnittliche relative Abundanzen).

Im Einklang mit der Beschreibung als eher Gesundheits-assoziiert (Sureda et al., 2020) konnte der Genus *Haemophilus* signifikant häufiger in Kontrollen identifiziert werden (siehe 8.5 Weitere Tabellen). Dabei konnte eine Spezies als konsistentes Taxon ebenfalls in Kontrollen nachgewiesen werden. Weitere Spezies des Genus *Haemophilus* wurden ebenfalls hauptsächlich in Kontrollen identifiziert, jedoch nicht als konsistente Taxa und weitestgehend ohne Bezug zu oralen Pathologien, was wiederum zur Einschätzung als nicht-pathogene Kommensale passt. So konnten auch frühere Arbeiten höhere Abundanzen von *Haemophilus* in supragingivalem Plaque und Saliva von gesunden Kontrollen verglichen mit Karies-Patienten dokumentieren (Belstrøm, Holmstrup et al., 2017, Chen, Jiang et al., 2020). Allerdings wurde auch Gegenteiliges mit höheren Abundanzen in Karies-Patienten beschrieben (Schoilew et al., 2019).

***Haemophilus sputorum*:** *H.sputorum* konnte dreimal mit einer signifikant höheren Abundanz in der Kontrollgruppe identifiziert werden (siehe Tabelle 19). Wie für den Genus als Ganzes, der eher mit oraler Gesundheit assoziiert ist (Sureda et al., 2020), wird auch diese Spezies nur selten im Kontext von oralen Pathologien erwähnt: So erfolgte die Identifikation dem Namen entsprechend erstmals in Sputum und Rachenabstrich (Nørskov-Lauritsen et al., 2012) und es ist lediglich ein Fall von Endokarditis beschrieben (Costello et al., 2022).

Genus *Streptococcus*: Der Genus *Streptococcus* zählt zu den Taxa mit der höchsten Abundanz im oralen Mikrobiom (Abranches et al., 2018) und konnte auch in der

vorliegenden Arbeit mit einem Anteil von bis zu 38,33% nachgewiesen werden (siehe 3.4.2.1 Durchschnittliche relative Abundanzen).

Vertreter dieses Genus kommen allgemein im Mund als Kommensale vor. Ein erhöhtes Aufkommen einiger Säure-toleranter Vertreter, vor allem *S.mutans* und *S.sobrinus* steht jedoch mit Karies in Verbindung. Auf der anderen Seite ist ein erhöhtes Vorkommen von *S.parasanguinis*, *S.gordonii* und *S.sanguinis* mit einem niedrigeren Level der pathogenen Vertreter und oraler Gesundheit assoziiert (Abranches et al., 2018). Spezies dieses Genus bilden daher auch den Yellow-Complex im Kontext von Parodontitis, der mit parodontaler Gesundheit vereinbar ist (Carrouel et al., 2016, Socransky et al., 1998).

Für den Genus *Streptococcus* als Ganzes konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen identifiziert werden. Nichtsdestotrotz zeigten diverse Spezies statistisch signifikante Unterschiede, wobei zwei Vertreter zu den konsistent identifizierten Taxa gezählt werden konnten (siehe Tabelle 19). Über diese Taxa hinaus ließen sich außerdem *S.mutans*, *S.agalacticae*, *S.gwangiense* und *S.periodonticum* als Spezies mit Bezug zur oralen Gesundheit und höherer Abundanz in Patienten und *S.australis*, *S.salivarius*, *S.gordonii* und *S.sp. A12* als Spezies mit höherer Abundanz in Kontrollen identifizieren.

Obwohl die *Streptococcus*-Spezies damit sehr gleichmäßig zwischen Patienten und Kontrollen verteilt zu sein scheinen, lässt sich doch bereits anhand der nicht-konsistenten Taxa ein Trend erkennen: So ist *S.mutans* in der Patientengruppe Säure-tolerant und im höchsten Maße mit Karies assoziiert (Abranches et al., 2018), während *S.gwangiense* und *S.periodonticum* zwar weniger häufig, dafür aber in Pericoronitis (Park et al., 2019), beziehungsweise dem subgingivalen Plaque bei Parodontitis beschrieben wurden (Lim et al., 2019). *S.agalacticae* ist hauptsächlich assoziiert mit Schwangerschaftskomplikationen, hat jedoch das Potential zur Co-Adhärenz mit *S.mutans* (Liu, Liu et al., 2020).

In der Kontrollgruppe findet sich wiederum *S.gordonii*, der mit niedrigerem Aufkommen pathogener Streptococci und oraler Gesundheit assoziiert ist (Abranches et al., 2018), in-vitro das Wachstum von *S.mutans* hemmt (Huang et al., 2018) und entsprechend beim Vergleich von Karies-Patienten und gesunden Kontrollen eine höhere Abundanz in Gesunden zeigte (Agnello et al., 2017). Umgekehrt war diese

Spezies jedoch in einer Meta-Analyse assoziiert mit Parodontitis (Antezack et al., 2023).

S. australis und *S. sp. A12* wurden ebenfalls in der Kontrollgruppe identifiziert und sind phylogenetisch nah mit dem Gesundheits-assoziierten *S. parasanguinis* verwandt (Huang et al., 2016, Willcox et al., 2001). Außerdem sind beide Spezies dazu in der Lage, in-vitro das Wachstum von *S. mutans* zu hemmen (Huang et al., 2016, Huang et al., 2018), während *S. australis* mit besserem Therapieansprechen bei antibiotischer Therapie von Parodontitis in Verbindung gebracht wurde (Colombo et al., 2012).

S. salivarius, identifiziert in der Kontrollgruppe, konnte mit einer höheren Abundanz in gesunden Kontrollen verglichen mit Parodontitis-Patienten (Ko et al., 2020) und Halitosis-Patienten (Bernardi et al., 2020, Kazor et al., 2003) identifiziert werden. Für diese Spezies ist keine unmittelbar inhibierende Wirkung auf orale Pathogene beschrieben, jedoch hat sie ein spezielles Urease-System, mit dem *S. salivarius* die Umgebung alkalisiert, was wahrscheinlich dem Wachstum Säure-toleranter Spezies entgegenwirkt (Abranches et al., 2018).

Im Kontext von Alzheimer konnten zuvor höhere Abundanzen vom Genus *Streptococcus* im Plaque von Patienten mit Alzheimer verglichen mit gesunden Kontrollen nachgewiesen werden (Chen, Xu et al., 2022, Wu et al., 2021). Außerdem konnte eine abnehmende Abundanz mit geringerem MMST gezeigt werden (Fogelholm et al., 2023).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte darüber hinaus eine höhere Abundanz von *S. gordonii* und *S. salivarius* im Saliva von gesunden Kontrollen verglichen mit Patienten mit MCI gefunden werden (Da et al., 2023). Jedoch wurde auch nicht übereinstimmend eine höhere Abundanz von *S. mutans* in gesunden Kontrollen beschrieben (Fu et al., 2022).

Streptococcus parasanguinis: *S. parasanguinis* konnte dreimal mit einer signifikant höheren Abundanz in der Kontrollgruppe identifiziert werden (siehe Tabelle 19). Dieses Taxon wird meist als oraler Kommensale beschrieben, der Pathogene antagonisiert (Abranches et al., 2018, Baty et al., 2022) und hilft, einen Gesundheits-assoziierten Biofilm aufzubauen (Nobbs und Kreth, 2019). In-vitro hemmt *S. parasanguinis* das Wachstum von *S. mutans* (Huang et al., 2018), stört das Zusammenspiel von *S. mutans* und *C. albicans*, oft beobachtet in kindlichem Karies (Huffines et al., 2020) und hemmt

das Wachstum von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* und *Prevotella intermedia*, hauptsächlich durch Produktion von Wasserstoffperoxid (Herrero et al., 2016).

Passend zur vorbeschriebenen, protektiven Wirkung fanden sich höhere Abundanzen von *S.parasanguinis* in gesunden Kontrollen verglichen mit Karies-Patienten (Corby et al., 2005) und Patienten mit Halitosis (Bernardi et al., 2020). Außerdem konnte man höhere Abundanzen in der Mundspülung gesunder Männer mit parallel hoher, ebenfalls Gesundheits-assoziiertes n-Butyrat-Konzentration nachweisen, verglichen mit Männern mit geringer Konzentration dieser kurzkettigen Fettsäure (Chen et al., 2023).

Umgekehrt wird *S.parasanguinis* zum Teil auch mit Parodontitis in Verbindung gebracht (Diaz et al., 2016). Außerdem fand sich diese Spezies mit höherer Abundanz im Saliva von Karies-Patienten (Belstrøm et al., 2014) und dem Saliva von Kindern nach Kariesbehandlung und mit Rückfall nach sechs Monaten verglichen mit gesunden Kontrollen und Kindern ohne Rückfall (Garcia et al., 2021). *S.parasanguinis* konnte darüber hinaus im subgingivalen Plaque von Kindern von Eltern mit Parodontitis in der Krankengeschichte verglichen mit den Kindern von gesunden Kontrollen gefunden werden, unabhängig von der Parodontitis-Klinik und zusammen mit höherer Abundanz bekannter parodontaler Pathogene (Monteiro et al., 2021).

In einer longitudinalen Arbeit sollte darüber hinaus der parallele Nachweis von *S.parasanguinis* mit *Filifactor alocis* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in subgingivalem Plaque bei aggressiver, lokalisierter Parodontitis prädiktiv für zukünftigen Knochenabbau sein (Fine et al., 2013). Diese paradoxe Assoziation mit oralen Pathologien kann zumindest teilweise durch den Einfluss zentraler Pathogene erklärt werden: So wurde für *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, der oft zusammen mit *S.parasanguinis* in Biofilmen gefunden wird, beschrieben, dass es in-vitro die Wasserstoffperoxid-Produktion von *S.parasanguinis* herunterreguliert (Duan et al., 2016), die einen wichtigen, inhibitorischen Mechanismus darstellt (Herrero et al., 2016).

Streptococcus anginosus: *S.anginosus* konnte dreimal mit einer signifikant höheren Abundanz in der Patientengruppe identifiziert werden (siehe Tabelle 19). Der Nachweis erfolgte dabei ausschließlich salivar (siehe Tabelle 20). Dieses Taxon wird häufig mit Parodontitis in Verbindung gebracht (Diaz et al., 2016) und ließ sich im subgingivalen

Plaque bei Parodontitis (Brito et al., 2013) und Karies (Svensäter et al., 2003) mit einer Abnahme der Abundanz nach Therapie (Jentsch et al., 2021), sowie in endodontalen Läsionen (Chávez de Paz et al., 2005, Fisher und Russell, 1993, Fouad et al., 2003, Ordinola-Zapata et al., 2024, Siqueira, Rôças, Moraes et al., 2002, Siqueira, Rôças, Souto et al., 2002), in Eiter bei odontogenen Infektionen (Bancescu et al., 2006) und in wegen Karies extrahierten Zähnen nachweisen (Chen, Daliri et al., 2020). Passend zu diesen Beobachtungen zeigten Kinder mit Karies höhere Abundanzen von *S.anginosus* im supragingivalen Plaque als gesunde Kontrollen (Bansal et al., 2020).

Im Kontext von Alzheimer konnte man übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit höhere Abundanzen in der Gingivalflüssigkeit von Alzheimer-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen nachweisen (Guo, Li et al., 2023) und zeigen, dass die Abundanz von *S.anginosus* im subgingivalen Plaque negativ mit der kognitiven Leistung korreliert (Qiu et al., 2024). Yay et al. konnten darüber hinaus eine höhere Abundanz im subgingivalen Plaque von Patienten mit Parkinson und Parodontitis verglichen mit gesunden Kontrollen und Patienten nur mit Parodontitis beobachten (Yay et al., 2023).

Lachnoanaerobaculum saburreum: *L.saburreum* konnte dreimal mit einer signifikant höheren Abundanz in der Kontrollgruppe identifiziert werden (siehe Tabelle 19). Auch für den Genus *Lachnoanaerobaculum* konnte eine signifikant höhere Abundanz in Kontrollen gezeigt werden (siehe 8.5 Weitere Tabellen). Weder der Genus, noch seine Spezies finden häufige Erwähnung in der Literatur. Trotzdem kann man einige Beobachtungen rund um das Thema oraler Gesundheit anstellen:

So ist der Genus *Lachnoanaerobaculum* im pathologischen Kontext assoziiert mit demineralisierten Zahnschmelz-Bereichen bei kieferorthopädischer Behandlung mit Zahnspangen (Song et al., 2023), sowie mit Rauchen und Knochenabbau an Zahnimplantaten (Duan et al., 2017). Umgekehrt konnte man wiederholt eine geringere Abundanz dieses Genus bei höherem Konsum zuckerhaltiger und damit Zahnschädlicher Getränke nachweisen (Chen, Hu et al., 2022, Fan et al., 2024).

Für *L.saburreum* konnte man einen Anstieg der Abundanz im zeitlichen Verlauf in Saliva und supragingivalem Plaque nach Einbau von Prothesen zusammen mit Abnahme klinischer Parameter für orale Gesundheit beobachten (Babikow et al., 2024). In-vitro konnte man eine Co-Aggregation dieser Spezies mit dem Red-Complex-

Vertreter *Treponema denticola* zeigen, stimuliert durch Vesikel von *Porphyromonas gingivalis* (Grenier, 2013). Und schließlich konnte man eine höhere Abundanz von *L.saburreum* im subgingivalen Plaque von Patienten mit Parkinson und Parodontitis verglichen mit gesunden Kontrollen und Patienten nur mit Parodontitis nachweisen (Yay et al., 2023).

Zusätzlich konnte *L.umeaense* als weitere Spezies dieses Genus ebenfalls mit höherer Abundanz in Kontrollen identifiziert werden. Zu diesem Bakterium existiert zwar noch weniger Literatur, jedoch weist es große phylogenetische Ähnlichkeit zu *L.saburreum* auf (Hedberg et al., 2012).

Genus Veillonella: Der Genus *Veillonella* zählt zu den Taxa mit der höchsten Abundanz im oralen Mikrobiom (Giacomini et al., 2023, Mashima et al., 2021) und konnte auch in der vorliegenden Arbeit mit einem Anteil von bis zu 13,89% nachgewiesen werden (siehe 3.4.1.1 Durchschnittliche relative Abundanzen).

Die Bedeutung dieses Genus im Kontext oraler Gesundheit ist dabei komplex. *Veillonella*-Spezies verstoffwechseln organische Säuren wie Laktat, welches bei der Entstehung von Karies eine Rolle spielt. Daher lassen sich häufig höhere Abundanzen in Kariesläsionen nachweisen, was in diesem Fall aber auch Ausdruck einer antikariogenen Wirkung sein könnte (Giacomini et al., 2023, Mashima et al., 2021). Außerdem kann man teils sehr unterschiedliche Einflüsse von *Veillonella*-Spezies auf die Biofilm-Bildung beobachten (Mashima et al., 2014).

Für den Genus als Ganzes konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Auf Spezies-Ebene konnten jedoch drei Taxa identifiziert werden, die einen statistisch signifikanten Unterschied zeigten, davon zwei als konsistente Spezies. Dabei lässt sich für die Spezies dieses Genus jedoch ebenfalls kein einheitlicher Trend der Verteilung beobachten.

Im Kontext von Alzheimer konnten höhere Abundanzen in sub- und supragingivalem Plaque, beziehungsweise Wangenabstrichen von Alzheimer-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen dokumentiert werden (Chen, Xu et al., 2022, Troci et al., 2024, Wu et al., 2021).

***Veillonella dispar*:** *V.dispar* konnte dreimal mit einer signifikant höheren Abundanz in der Kontrollgruppe identifiziert werden (siehe Tabelle 19). Der Nachweis erfolgte dabei

ausschließlich salivar (siehe Tabelle 20). Diese Spezies lässt sich sowohl mit oraler Gesundheit, als auch verschiedenen Pathologien in Verbindung bringen: So fand man höhere Abundanzen bei gesunden Kontrollen verglichen mit Patienten mit Peri-Implantitis (Al-Ahmad et al., 2018), im subgingivalem Plaque von gesunden Kontrollen verglichen mit älteren Patienten mit Parodontitis (Papapanou et al., 2020), sowie in gingivalem Gewebe von nicht-entzündeten Stellen verglichen mit entzündeten Stellen bei Patienten mit chronischer Parodontitis (Bao et al., 2020). Außerdem konnte *V. dispar* beim Vergleich symptomatischer und asymptomatischer endodontaler Läsionen ausschließlich in asymptomatischen Läsionen nachgewiesen werden (Sakamoto et al., 2006).

Umgekehrt wurden aber auch höhere Abundanzen in supragingivalem Plaque von Kindern mit Karies verglichen mit gesunden Kontrollen (de Jesus et al., 2020, Qudeimat et al., 2021, Yang, He et al., 2021), bei Kindern mit schlechter oraler Hygiene (Mashima et al., 2017) und in Karies-Läsionen verglichen mit gesunden Zähnen gefunden (Bhaumik et al., 2024).

Veillonella parvula: *V. parvula* wurde zweimal mit einer signifikant höheren Abundanz in Patienten identifiziert. Damit zählt es zwar nicht zu den konsistent identifizierten Taxa. Jedoch ist diese Spezies im Kontext oraler Gesundheit recht gut beschrieben (Carrouel et al., 2016, Gambin et al., 2024, Socransky et al., 1998) und phylogenetisch sehr eng verwandt mit *V. dentocariosi* (Giacomini et al., 2023, Mashima et al., 2021), das übereinstimmend mit *V. parvula* mit höherer Abundanz in Patienten identifiziert wurde.

V. parvula ist mit oraler Gesundheit assoziiert (Diaz et al., 2016) und ein Vertreter des Purple-Complex, ebenfalls vereinbar mit oraler Gesundheit (Carrouel et al., 2016, Socransky et al., 1998). Jedoch wurde *V. parvula* ähnlich wie *A. actinomycetemcomitans* auch als einer der häufigsten Vertreter der Gesundheits-assoziierten Komplexe beschrieben, der auch in endodontalen Läsionen und parodontal bei Parodontitis identifiziert wird (Gambin et al., 2024). Dementsprechend widersprüchlich sind die Ergebnisse zu dieser Spezies:

Auf der einen Seite konnte *V. parvula* häufiger in subgingivalem Plaque von gesunden Kontrollen verglichen mit Parodontitis-Patienten nachgewiesen werden (Stingu et al., 2012) und konnte mit höherer Abundanz in gesunden Kontrollen verglichen mit

Parodontitis- (Papapanou et al., 2000, Papapanou et al., 2020) und Karies-Patienten gefunden werden (Belstrøm et al., 2014). Beim Vergleich symptomatischer und asymptomatischer endodontaler Läsionen erfolgte ausschließlich ein Nachweis in asymptomatischen Läsionen (Sakamoto et al., 2006), während *V.parvula* beim Vergleich gingivaler Epithelzellen (isoliert aus subgingivalem Plaque von Parodontitis-Patienten) aus gesunden und erkrankten Bereichen, ebenfalls häufiger in gesunden Arealen gefunden wurde (Colombo et al., 2006).

Auf der anderen Seite wurde *V.parvula* in endodontalen Läsionen (Pourhajibagher et al., 2017, Sassone et al., 2007, Vianna et al., 2005), Kariesläsionen (Sulyanto et al., 2024), subgingivalem Plaque bei Patienten mit Parodontitis (Heller et al., 2012) und Kindern mit allgemein schlechterer oraler Hygiene (Mashima et al., 2017) nachgewiesen. Beim Vergleich mit gesunden Kontrollen ließen sich höhere Abundanzen bei Kindern mit Karies finden (Tanner et al., 2011), während in einer longitudinalen Arbeit *V.parvula* im Saliva als Risikomarker für die Entwicklung von Karies bei Kindern beschrieben wurde (Grier et al., 2021). Und beim Vergleich nekrotischer Pulpa von symptomatischen, verglichen mit asymptomatischen Zähnen konnte ebenfalls eine höhere Abundanz in symptomatischen Zähnen nachgewiesen werden (Sassone et al., 2008).

In einer transkriptomischen Arbeit war *V.parvula* im subgingivalen Plaque von Patienten mit Parodontitis beteiligt an der Transkription von Virulenzfaktoren (Yost et al., 2015), während diese Spezies in Co-Kultur das Wachstum von *Treponema denticola* (ter Steeg und Hoeven, 1990), sowie Wachstum und Biofilmbildung von *S.mutans* fördert (Abram et al., 2022, Liu, Chen et al., 2020). Außerdem wurde *V.parvula* als ein ätiologischer Erreger von Gingivitis in experimentell induzierter Gingivitis in vier gesunden Probanden, die keine oralen Hygienemaßnahmen durchführen durften, beschrieben (Moore et al., 1982). Übereinstimmend mit dieser Einschätzung wurde ein Anstieg der Abundanz von *V.parvula* im Zungenbelag (Faveri et al., 2006) und im supragingivalen Plaque von Patienten mit Parodontitis und gesunden Kontrollen bei Abstinenz von oraler Hygiene beobachtet (Uzel et al., 2011).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte auch in Saliva und Gingivalflüssigkeit von Alzheimer-Patienten eine höhere Abundanz als in Kontrollen beobachtet werden (Guo, Li et al., 2023) und es konnte eine negative Korrelation der Abundanz mit der kognitiven Leistung gezeigt werden (Qiu et al., 2024).

Dialister pneumosintes: *D.pneumosintes* konnte dreimal mit einer signifikant höheren Abundanz in der Patientengruppe identifiziert werden (siehe Tabelle 19). Der Nachweis erfolgte dabei ausschließlich salivar (siehe Tabelle 20). Auch für den Genus *Dialister* konnte eine signifikant höhere Abundanz in Patienten gefunden werden (siehe 8.5 Weitere Tabellen). Zur Bedeutung des Genus als Ganzes im oralen Mikrobiom existiert dabei nur wenig Literatur, jedoch zeigten mehrere Spezies dieses Genus eine einheitlich signifikant höhere Abundanz in der Patientengruppe, wobei neben *D.pneumosintes* noch *D.invisus* unter die konsistent identifizierten Taxa fällt, während die ebenfalls identifizierten *D.propionifaciens* und *D.microaerophilus* phylogenetisch relativ nah verwandt mit *D.pneumosintes* sind (Jumas-Bilak et al., 2005).

D.pneumosintes wurde als neues parodontales Pathogen beschrieben (Hiranmayi et al., 2017). Dieses Taxon wurde in Kariesläsionen (Siqueira und Rôças, 2002), endodontalen Läsionen (Henriques et al., 2016, Jacinto et al., 2007, Murad et al., 2014, Pereira et al., 2017, Rôças und Siqueira, 2006, Rôças et al., 2006), endodontalen Abszessen (Ferreira et al., 2011) und dem subgingivalen Plaque von Parodontitis-Patienten nachgewiesen (Colombo et al., 2009, Doan et al., 2000, Ferraro et al., 2007). Dabei war das Vorkommen von *D.pneumosintes* häufig assoziiert mit dem Nachweis bekannter Pathogene (Araújo et al., 2023, Ghayoumi et al., 2002, Siqueira und Rôças, 2003c, Siqueira und Rôças, 2004a) und dem klinischen Schweregrad von Parodontitis (Araújo et al., 2023, Contreras et al., 2000, Ferraro et al., 2007).

Beim Vergleich mit gesunden Kontrollen hatten Parodontitis-Patienten höhere Abundanzen von *D.pneumosintes* (Gonçalves et al., 2016, Nonnenmacher et al., 2005, Shaikh et al., 2024). Eine Meta-Analyse entsprechender Arbeiten bestätigte dabei die Assoziation dieser Spezies zu Parodontitis (Antezack et al., 2023). Und auch beim Vergleich symptomatischer und asymptomatischer endodontaler Läsionen konnte *D.pneumosintes* ausschließlich in symptomatischen Läsionen nachgewiesen werden (Sakamoto et al., 2006).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte auch in Alzheimer-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen eine höhere Abundanz von *D.pneumosintes* (Na et al., 2024) und eine negative Korrelation der Abundanz mit der kognitiven Leistung identifiziert werden (Qiu et al., 2024).

Dialister invisus: *D.invisus* konnte dreimal mit einer signifikant höheren Abundanz in der Patientengruppe identifiziert werden (siehe Tabelle 19). Wie *D.pneumosintes* wird *D.invisus* häufig mit Parodontitis in Verbindung gebracht und war in einer Meta-Analyse mit diesem Krankheitsbild assoziiert (Antezack et al., 2023, Diaz et al., 2016). Diese Spezies wurde in endodontalen Läsionen (Jacinto et al., 2007, Ribeiro et al., 2011, Rôças und Siqueira, 2005, Siqueira und Rôças, 2005, Schirrmeister et al., 2009, Zargar et al., 2020) bei apikaler Parodontitis (Lee, Lee, Hsiao et al., 2017, Rôças und Siqueira, 2006, Rôças et al., 2006, Rôças et al., 2011) und in Parodontaltaschen bei Parodontitis (Colombo et al., 2009, Djais et al., 2006) nachgewiesen und in einem systematischen Review sogar als einer der am häufigsten identifizierten Erreger in endodontalen Läsionen bezeichnet (Pinto et al., 2023). Speziell in endodontalen Abszessen (Ferreira et al., 2011, Nóbrega et al., 2016a, Nóbrega et al., 2016b, Siqueira und Rôças, 2009, Tennert et al., 2014) und persistierenden, endodontalen Infektionen wurde *D.invisus* dabei wiederholt identifiziert (Rôças et al., 2008, Zhang et al., 2012).

Die Abundanz im subgingivalen Plaque war außerdem mit Peri-Implantitis assoziiert (Yu et al., 2024), während die salivare Abundanz und die Abundanz im Plaque bei irreversibler Pulpitis mit klinischen Parodontitis-Parametern und Schmerzsymptomatik assoziiert war (Rôças et al., 2015, Wang et al., 2024). Darüber hinaus ließen sich höhere Abundanzen von *D.invisus* in symptomatischer Pericoronitis (Mansfield et al., 2012) und Kariesläsionen (Usuga-Vacca et al., 2024) beim Vergleich mit entsprechenden, weniger symptomatischen Läsionen beobachten.

Kingella oralis: *K.oralis* konnte dreimal mit einer signifikant höheren Abundanz in der Kontrollgruppe identifiziert werden (siehe Tabelle 19). Der Nachweis erfolgte dabei ausschließlich supragingival (siehe Tabelle 21). Dabei handelt es sich um eine von nur zwei Spezies, die bei mehrfacher Identifikation mit ANCOM-BC2 im Rahmen der Sensitivitäts-Analyse mit aufsteigenden Pseudo-Counts konsistent weiterhin statistisch signifikant blieben. Auch für den Genus *Kingella* konnte eine signifikant höhere Abundanz in Kontrollen gefunden werden (siehe 8.5 Weitere Tabellen). Jedoch wurden keine weiteren Spezies dieses Genus identifiziert.

Für die Bedeutung des Genus als Ganzes im Kontext oraler Gesundheit existiert nur wenig Literatur, lediglich *K.kingae* gilt als wichtiger Erreger von Endokarditis (Zacarias Mendoza et al., 2023). Jedoch konnte bereits zuvor eine höhere Abundanz dieses Genus

in gesunden Kontrollen verglichen mit Alzheimer-Patienten gefunden werden (Issilbayeva et al., 2024).

K.oralis wird allgemein mit oraler Gesundheit in Verbindung gebracht (Diaz et al., 2016) und ließ sich entsprechend in höherer Abundanz in gesunden Kontrollen verglichen mit Patienten mit Karies nachweisen (Preza et al., 2008). Auch beim Vergleich des subgingivalen Plaque aus gesunden und erkrankten Arealen bei Kindern mit Parodontitis fanden sich höhere Abundanzen in gesunden Bereichen (Shaddox et al., 2012). Darüber hinaus war K.oralis assoziiert mit einem besseren Therapieansprechen bei Anwendung von Chlorhexidin bei Gingivitis (Al-Kamel et al., 2019) und antibiotischer Therapie von Parodontitis (Colombo et al., 2012).

Nichtsdestotrotz konnte dieses Taxon auch bei verschiedenen Formen von Parodontitis identifiziert werden (Chen et al., 1996). Außerdem wurde K.oralis mit höherer Abundanz in Patienten mit Parkinson gefunden, verglichen mit gesunden Kontrollen bei gleicher oraler Gesundheit (Fleury et al., 2021).

Bifidobacterium dentium: B.dentium konnte dreimal mit einer signifikant höheren Abundanz in der Patientengruppe identifiziert werden (siehe Tabelle 19). Auch für den Genus Bifidobacterium konnte eine signifikant höhere Abundanz in Patienten gefunden werden (siehe 8.5 Weitere Tabellen). Vertreter dieses Genus gelten als Säureproduzierend und Karies-assoziiert (Spatafora et al., 2024). B.dentium konnte dementsprechend in Plaque von Karies-Patienten nachgewiesen werden (Crociani et al., 1996, Mantzourani et al., 2009, Toh et al., 2015) und ist darüber hinaus mit Parodontitis assoziiert (Diaz et al., 2016). Beim Vergleich mit gesunden Kontrollen konnten höhere Abundanzen von B.dentium in Plaque und Saliva von Karies-Patienten gefunden werden (Henne et al., 2015, Zhai et al., 2009). Außerdem konnten höhere Abundanzen in Plaque von Patienten mit Karies und Pulpitis verglichen mit Kontrollen mit nur Karies und intakter Pulpa (Selvakumar et al., 2021), sowie in persistierenden endodontalen Läsionen verglichen mit primären Infektionen (Park et al., 2024) nachgewiesen werden. Im Kontext von Alzheimer konnte darüber hinaus eine höhere Abundanz von B.dentium in Gingivalflüssigkeit von Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen dokumentiert werden (Guo, Li et al., 2023).

Neben B.dentium konnte B.animalis als weitere, nicht-konsistente Spezies mit höherer Abundanz in Patienten identifiziert werden, die in-vitro ebenfalls kariogenes Potential

zeigt, indem sie Säure produziert und zusammen mit *S.mutans* und *S.sobrinus* die Biofilmbildung fördert (Valdez et al., 2016).

Genus Selenomonas: Der Genus *Selenomonas* wird häufig mit Parodontitis in Verbindung gebracht, wobei vor allem *S.sputigena* mittlerweile als wichtiger Erreger gilt (Hiranmayi et al., 2017). Die salivare Abundanz dieses Genus korrelierte entsprechend mit klinischen Parametern für Parodontitis (Wang et al., 2024). Außerdem konnten höhere Abundanzen in Saliva und supragingivalem Plaque von Karies-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen nachgewiesen werden (Chen et al., 2021, He et al., 2018, Johansson et al., 2016, Lin, Wang et al., 2023).

In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Genus mit maximal 1,90% supragingival nachgewiesen (siehe 3.4.2.1 Durchschnittliche relative Abundanzen), wobei für den Genus als Ganzes kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden konnte. Dafür wurden fünf Spezies mit einer einheitlich höheren Abundanz in Patienten identifiziert, davon eine als konsistentes Taxon.

Als nicht-konsistente Taxa konnten *S.sputigena*, *S.noxia*, *S.flueggei* und *S.artemidis* mit einer höheren Abundanz in Patienten identifiziert werden. *S.sputigena* wurde als Pathobiont bei kindlichem Karies beschrieben, der unter anderem die Pathogenität von *S.mutans* fördert (Cho et al., 2023). Diese Spezies findet am häufigsten als parodontaler Erreger Erwähnung (Hiranmayi et al., 2017) und wurde mit höherer Abundanz in subgingivalem Plaque von Patienten mit Parodontitis verglichen mit gesunden Kontrollen gefunden (Nagpal et al., 2016).

S.noxia wurde ebenfalls in subgingivalem Plaque bei Parodontitis nachgewiesen (Faveri et al., 2008, Tanner et al., 1998). Genau wie *S.flueggei* kann es mit *Fusobacterium nucleatum* co-aggregieren (Kolenbrander et al., 1989), wobei *S.flueggei* wiederum im Zungenbelag von Patienten mit Mundgeruch gefunden wurde (Tyrrell et al., 2003).

S.artemidis wird kaum im Kontext oraler Gesundheit erwähnt, konnte jedoch übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit mit einer höheren Abundanz im Saliva von Patienten mit Alzheimer verglichen mit gesunden Kontrollen identifiziert werden (Fu et al., 2022).

Selenomonas infelix: *S.infelix* konnte dreimal mit einer signifikant höheren Abundanz in der Patientengruppe identifiziert werden (siehe Tabelle 19). Der Nachweis erfolgte

dabei ausschließlich salivar (siehe Tabelle 20). Diese Spezies wurde zusammen mit *S.sputigena* und *S.noxia* als Gingivitis-assoziiert beschrieben (Diaz et al., 2016) und kann genau wie andere Spezies dieses Genus mit *Fusobacterium nucleatum* co-aggregieren (Kolenbrander et al., 1989).

Darüber hinaus zeigte dieses Taxon im Plaque bei Parodontitis analog zu parallel identifizierten, parodontalen Pathogenen eine mit diesen vergleichbare, immunstimulatorische Wirkung auf Toll-like-Rezeptor-4 (TLR) (Marchesan et al., 2016).

Anaeroglobus geminatus: *A.geminatus* konnte dreimal mit einer signifikant höheren Abundanz in der Patientengruppe identifiziert werden (siehe Tabelle 19). Auch für den Genus *Anaeroglobus* konnte eine signifikant höhere Abundanz in Patienten gezeigt werden (siehe 8.5 Weitere Tabellen), allerdings ohne weitere Spezies dieses Genus zu identifizieren.

Der Genus konnte zuvor im subgingivalen Plaque von Parodontitis-Patienten nachgewiesen werden (Camelo-Castillo, Mira et al., 2015) und kam mit höherer Abundanz in tiefen, verglichen mit weniger tiefen Parodontaltaschen (Polymeri et al., 2021), sowie in supragingivalem Plaque von Karies-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen vor (Celik et al., 2021).

A.geminatus ist mit Parodontitis assoziiert (Antezack et al., 2023, Diaz et al., 2016). Seine Abundanz im subgingivalen Plaque von Patienten mit Parodontitis vor und nach Therapie korrelierte mit mehreren Lipid-Mediatoren proinflammatorischer, Parodontitis-assoziiierter Signalwege, weswegen die Autoren diese Spezies mit parodontaler Entzündung in Verbindung brachten (Lee et al., 2021). Außerdem ließ sich *A.geminatus* in nekrotischer Pulpa und endodontalen Läsionen von extrahierten Zähnen nachweisen (Chugal et al., 2011) und fand sich mit höherer Abundanz im Saliva von Kindern mit Karies verglichen mit gesunden Kontrollen (Wang et al., 2019).

Darüber hinaus führte das Einbringen von *A.geminatus* in ein in-vitro-Modell eines polymikrobiellen, subgingivalen Biofilmes zu einer Verschiebung des Proteoms mit veränderter Abundanz von 187 Proteinen der zehn Biofilm-Bakterien mit potentieller Zunahme der Virulenz-Eigenschaften (Bao et al., 2017).

Im Kontext von Alzheimer konnten Qiu et al. außerdem zeigen, dass die Abundanz von *A.geminatus* im subgingivalen Plaque negativ mit kognitiver Leistung bei Vergleich von Patienten mit Alzheimer, MCI oder gesunden Kontrollen korreliert (Qiu et al., 2024).

Mycoplasma salivarium: *M.salivarium* konnte dreimal mit einer signifikant höheren Abundanz in der Patientengruppe identifiziert werden (siehe Tabelle 19). Weder für den Genus, noch für weitere Spezies konnte ein signifikanter Unterschied gefunden werden.

Dieses Taxon wurde sowohl im Plaque von gesunden Zähnen (Uchida et al., 1981), als auch im Plaque von Regionen mit Karies, oder Gingivits nachgewiesen (Uchida, 1981). Außerdem konnte man *M.salivarium* im subgingivalen Plaque von Patienten mit refraktärer Parodontitis (Colombo et al., 2009), Gingivitis (Forest, 1979) und Peri-Implantitis finden (Groß et al., 2022).

Darüber hinaus wurde diese Spezies wiederholt im Mund von Patienten mit Acquired immune deficiency syndrome (AIDS) (Zhang et al., 2015), beziehungsweise Human Immunodeficiency Virus (HIV) (Moore et al., 1993) und Gingivitis/Parodontitis nachgewiesen. Umgekehrt wurde aber auch ein seltenerer Nachweis in HIV-positiven Patienten ohne Parodontitis verglichen mit HIV-negativen Patienten mit Parodontitis beobachtet (Chattin et al., 1999).

Fusobacterium nucleatum: *F.nucleatum* wurde lediglich zweimal mit einer höheren Abundanz in Patienten identifiziert. Es zählt dadurch zwar nicht zu den konsistent identifizierten Taxa, gilt jedoch als Teil des Orange-Complex (Abdulkareem et al., 2023, Socransky et al., 1998) und wurde als eines der zentralen Pathogene bei Parodontitis neben dem Red-Complex beschrieben (Visentin et al., 2023). Entsprechend fand es sich signifikant häufiger im subgingivalen Plaque von Parodontitis-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen (Stingu et al., 2012) und wurde beim Vergleich symptomatischer und asymptomatischer endodontaler Läsionen ausschließlich in symptomatischen Läsionen nachgewiesen (Sakamoto et al., 2006).

F.nucleatum spielt darüber hinaus eine zentrale Rolle in der Plaquebildung durch seine Fähigkeit zum Co-Aggregieren mit anderen Bakterien und induziert eine ausgeprägte proinflammatorische und prooxidative Reaktion. Außerdem wurde es mit systemischen Entzündungsreaktionen, verschiedenen systemischen Erkrankungen und im gastrointestinalen Mikrobiom vor allem mit kolorektalem Karzinom in Verbindung

gebracht (Visentin et al., 2023). Dazu wurde vorklinisch auch beschrieben, dass *F.nucleatum* nach Phagozytose in Neutrophilen überlebt und von diesen in andere Gewebe transportiert wird (Ellett et al., 2023).

Darüber hinaus waren höhere Antikörper-Titer gegen *F.nucleatum* im Blut assoziiert mit höherer Alzheimer-Mortalität (Beydoun et al., 2020) und -Inzidenz (Sparks et al., 2012). Beim Vergleich von Alzheimer-Patienten und gesunden Kontrollen konnten außerdem wiederholt höhere Abundanzen von *F.nucleatum* in Patienten gefunden werden (Taati Moghadam et al., 2022, Panzarella et al., 2022).

Filifactor alocis: *F.alocis* wurde lediglich zweimal mit einer höheren Abundanz in Kontrollen identifiziert, wobei der Nachweis mittels ANCOM-BC2 im Rahmen der Sensitivitäts-Analyse mit aufsteigenden Pseudo-Counts konsistent weiterhin statistisch signifikant blieb (siehe 3.3.3 Beta-Diversität, Figur 7 und Tabelle 6 und 3.5.1.3 Beta-Diversität, Figur 24). Auch der Genus *Filifactor* konnte mit höherer Abundanz in Kontrollen nachgewiesen werden (siehe 8.5 Weitere Tabellen). Es zählt dadurch zwar nicht zu den konsistent identifizierten Taxa. Allerdings wurde dieses Taxon als neues parodontales Pathogen beschrieben (Hiranmayi et al., 2017), dessen Nachweis in subgingivalem Plaque mit der Parodontitis-Diagnose korreliert (Yuan et al., 2016).

F.alocis gilt vor allem als ein wichtiger Synergist mit parodontalen Pathogenen wie *P.gingivalis*, *F.nucleatum* und *A.actinomycetemcomitans* (Aja et al., 2021, Balmasova et al., 2020), mit denen es entsprechend oft parallel nachgewiesen wurde (Razooqi et al., 2022). In einer longitudinalen Arbeit war der parallele Nachweis von *S.parasanguinis* mit *F.alocis* und *A.actinomycetemcomitans* in subgingivalem Plaque bei aggressiver, lokalisierter Parodontitis außerdem prädiktiv für zukünftigen Knochenabbau (Fine et al., 2013). Diese Assoziation zu Parodontitis wird auch durch eine Meta-Analyse gestützt (Antezack et al., 2023, Diaz et al., 2016).

F.alocis ließ sich mit höherer Abundanz im subgingivalen Plaque von Patienten mit Parodontitis verglichen mit gesunden Kontrollen nachweisen (Álvarez et al., 2023, Cui et al., 2019, Ikeda et al., 2020, Lafaurie et al., 2022, Lafaurie et al., 2023, Lu et al., 2021, Neelakandan et al., 2021, Oliveira et al., 2016, Papapanou et al., 2020, Pérez-Chaparro et al., 2018, Schulz et al., 2019), wobei die Abundanz nach Therapie abnimmt (Veras et al., 2023). Umgekehrt wurde der Nachweis bei Parodontitis wiederholt mit

schlechterem Therapieansprechen in Verbindung gebracht (Colombo et al., 2009, Colombo et al., 2012).

Auch im Saliva von Parodontitis-Patienten konnten höhere Abundanzen nachgewiesen werden (Belstrøm et al., 2014, Lundmark et al., 2019), die mit dem Schweregrad der Parodontitis korrelieren (Ji et al., 2023) und mit einer Zunahme der Transkriptionsaktivität einhergehen (Belstrøm, Constancias et al., 2017). Beim Vergleich von subgingivalen Arealen mit hoher und geringer Entzündungsaktivität fanden sich ebenfalls höhere Abundanzen in entzündeten Bereichen (Camelo-Castillo, Novoa et al., 2015). Außerdem konnte *F.alocis* in endodontalen Läsionen (Gomes et al., 2020, Zhang et al., 2012) und endodontalen Abszessen (Nóbrega et al., 2016a, Nóbrega et al., 2016b) nachgewiesen werden.

Vieira Colombo et al. konnten zeigen, dass *F.alocis* mit parodontaler Entzündung und Gewebedestruktion assoziiert ist, aber ohne eine höhere Abundanz in Patienten mit Parodontitis verglichen mit gesunden Kontrollen nachzuweisen (Vieira Colombo et al., 2016). In einer multivariablen Analyse nach Adjustierung für Mundgesundheit und Zahnanzahl war höheres Alter außerdem assoziiert mit niedrigerer Abundanz von *F.alocis* (Schwartz et al., 2021).

Mehrere Arbeiten kamen darüber hinaus zu dem Schluss, dass die salivare (Belstrøm, Sembler-Møller et al., 2017, Belstrøm et al., 2018), beziehungsweise supragingivale und buccale Abundanz (Na et al., 2020) von *F.alocis* die subgingivale Abundanz widerspiegelt.

Bathini et al. konnten *F.alocis* außerdem mit höherer Abundanz im Saliva von kognitiv Gesunden verglichen mit Patienten mit MCI und Alzheimer finden (Bathini et al., 2020), was sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit deckt.

Treponema denticola: *T.denticola* konnte lediglich einmal mit einer höheren Abundanz in Kontrollen identifiziert werden (siehe 3.3.3 Beta-Diversität, Figur 7). Dieses Taxon ist jedoch Teil des Red-Complex im subgingivalen Biofilm (Abdulkareem et al., 2023, Socransky et al., 1998) und dadurch eines der zentralen Pathogene bei Parodontitis (Visentin et al., 2023).

Obwohl für den Genus *Treponema* kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen identifiziert wurde, konnten drei weitere Spezies dieses Genus gefunden

werden: *T.socranskii* (siehe 3.4.1.3 Beta-Diversität, Figur 12 und Tabelle 7) und *T.amylovorum* (siehe 3.4.1.3 Beta-Diversität, Figur 13 und Tabelle 8 und 3.4.2.3 Beta-Diversität, Tabelle 12) konnten mit höherer Abundanz in Patienten und *T.vincentii* mit höherer Abundanz in Kontrollen identifiziert werden (siehe 3.3.3 Beta-Diversität, Figur 7 und Tabelle 6). Dabei wurde *T.amylovorum* als einziger Vertreter dieses Genus zweimal identifiziert.

Berücksichtigt man, dass alle genannten Vertreter parallel in subgingivalem Plaque bei Parodontitis nachgewiesen wurden (Willis et al., 1999) und dass eine Meta-Analyse *T.socranskii* und *T.amylovorum*, nicht aber *T.vincentii* als Parodontitis-Erreger identifiziert hat (Antezack et al., 2023), gestaltet sich die Verteilung oraler Treponema-Spezies deutlich differenzierter als bei der reinen Betrachtung des “Markerkeims” *T.denticola*: Demnach hätte man dreimal Treponema-Spezies mit deutlichem Bezug zu oralen Pathologien in Patienten identifiziert und zweimal in Kontrollen, wobei hier eine Spezies einen sehr klaren und die andere einen eher schwachen Bezug zur oralen Gesundheit zeigt.

So konnte *T.vincentii* zwar in endodontalen Läsionen (Baumgartner et al., 2003, Nóbrega et al., 2013, Rosa et al., 2015) und subgingivalem Plaque bei Parodontitis gefunden werden (Asai et al., 2002). In letzterem Fall ließ sich dieses Taxon jedoch beispielsweise eher in weniger tiefen Parodontaltaschen nachweisen, da in den tiefen *T.denticola* dominierte (Asai et al., 2002). Beim Vergleich gesunder Kontrollen und Parodontitis-Patienten wurde *T.vincentii* ebenfalls häufiger in Kontrollen als in Patienten gefunden (You et al., 2017), wobei auch der umgekehrte Zusammenhang beobachtet wurde. Hierbei war der Kontrast zwischen Patienten und Kontrollen für *T.vincentii* jedoch deutlich schwächer ausgeprägt als für *T.denticola* und *T.socranskii* (Dabu et al., 2012). Ebenso konnten höhere Antikörper-Konzentrationen gegen dieses Taxon in Parodontitis-Patienten gemessen wurden (Lai et al., 1986).

T.denticola wiederum wurde signifikant häufiger in subgingivalem Plaque von Parodontitis-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen gefunden (Stingu et al., 2012), entsprechend seiner Einstufung als Teil des Red-Complex (Abdulkareem et al., 2023, Socransky et al., 1998). Diese Spezies ist bekannt dafür, im Rahmen von Parodontitis eine ausgeprägte proinflammatorische Immunreaktion zu induzieren und wirkt darüber hinaus proteolytisch auf das gingivale Gewebe (Visentin et al., 2023).

T.socranskii konnte ebenfalls in subgingivalem Plaque (Hutter et al., 2003, Riviere et al., 1995, Sakamoto et al., 1999) und Saliva bei Parodontitis (Sakamoto et al., 1999, Sakamoto et al., 2000) nachgewiesen werden. Außerdem fand man diese Spezies in Peri-Implantitis (Persson und Renvert, 2014) und endodontalen Infektionen (Murad et al., 2014, Sassone et al., 2007, Siqueira und Rôças, 2003a, Siqueira und Rôças, 2004b) und zwar oft sogar etwas häufiger als *T.denticola* (Baumgartner et al., 2003, Gomes et al., 2012, Jung et al., 2001, Montagner et al., 2010, Rosa et al., 2015). Bei experimentell induzierter Gingivitis korrelierte die Abundanz von *T.socranskii* außerdem mit der Zunahme der klinischen Symptomatik (Moore et al., 1984).

T.socranskii konnte häufig zusammen mit *T.denticola* und *P.gingivalis* in subgingivalem Plaque bei Parodontitis nachgewiesen werden (Takeuchi et al., 2001). Beim Vergleich mit gesunden Kontrollen ließ sich dieses Taxon häufiger in Parodontitis-Patienten nachweisen (Dabu et al., 2012), weswegen die Präsenz von *T.socranskii* als signifikanter Prädiktor für die Diagnose beschrieben wurde (Ledder et al., 2007). Moter et al. konnten *T.socranskii* sogar in Abwesenheit eines signifikanten Unterschiedes für *T.denticola* mit höherer Frequenz in Patienten verglichen mit Kontrollen nachweisen (Moter et al., 2006). Allerdings existieren auch hier gegenteilige Beobachtungen mit höheren Abundanzen von *T.socranskii* in Kontrollen (Alvarez et al., 2023).

Auch beim Vergleich nekrotischer Pulpa von symptomatischen mit asymptomatischen Zähnen ließen sich höhere Abundanzen in symptomatischen Zähnen finden (Sassone et al., 2008), während man nach Therapie eine Abnahme der Abundanz (Máximo et al., 2009, Sakamoto et al., 2004) und Protein-Expression (Silbereisen et al., 2024) von *T.socranskii* beobachten konnte.

T.amylovorum wurde von allen *Treponema*-Spezies am konsistentesten identifiziert. Diese Spezies wurde erstmals im subgingivalen Plaque von Parodontitis-Patienten beschrieben (Wyss et al., 1997) und in einer Meta-Analyse als Parodontitis-assoziiert eingestuft (Antezack et al., 2023). Darüber hinaus ließ sich diese Spezies in endodontalen Läsionen (Rosa et al., 2015), Infektionen (Montagner et al., 2010, Siqueira und Rôças, 2003b) und Abszessen (Siqueira und Rôças, 2004b) nachweisen.

Insgesamt fällt es schwer, die Verteilung der *Treponema*-Spezies in dieser Arbeit abschließend zu bewerten. Bei oberflächlicher Betrachtung findet man den zentralen

parodontalen Erreger *T.denticola* mit höherer Abundanz in Kontrollen. Betrachtet man die verschiedenen Spezies dieses Genus jedoch genauer, wird deutlich, dass in beiden Gruppen pathogene Vertreter zu finden sind.

Hinzu kommt, dass sich der Genus *Treponema* allgemein, aber auch einzelne Spezies aus beiden Probandengruppen mit Alzheimer in Verbindung bringen lassen: So fanden Panzarella et al. eine höhere subgingivale Abundanz von *T.denticola* bei Patienten mit MCI verglichen mit Patienten mit Alzheimer (Panzarella et al., 2022). Außerdem konnten post-mortem verschiedene *Treponema*-Spezies mit höherer Frequenz im ZNS von Alzheimer-Patienten verglichen mit Kontrollen identifiziert werden (Riviere et al., 2002). Spirochaeten wurden seit den frühen 1990er Jahren wiederholt mit Alzheimer in Verbindung gebracht. Diese Bakterien stehen mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Neuro-Lues und Neuro-Borreliose in Verbindung und Spirochaeten-DNA konnte in senilen Plaques identifiziert werden. Außerdem konnte man eine ausgeprägte Ähnlichkeit zwischen Amyloid- β und von Spirochaeten produzierten Proteinen zur Biofilmbildung feststellen (Miklossy 1993, Miklossy 2011, Milossy 2015, Miklossy 2016). Unter den im ZNS identifizierten *Treponema*-Spezies war dabei unter anderem *T.socranskii* (Riviere et al., 2002), das auch in dieser Arbeit mit höherer Abundanz in Patienten gefunden werden konnte.

Tannerella forsythia: *T.forsythia* konnte lediglich einmal mit einer höheren Abundanz in Kontrollen identifiziert werden (siehe 3.4.2.3 Beta-Diversität, Figur 19). Dieses Taxon ist jedoch Teil des Red-Complex im subgingivalen Biofilm (Abdulkareem et al., 2023, Socransky et al., 1998) und dadurch eines der zentralen Pathogene in Parodontitis (Visentin et al., 2023). Auch für den Genus konnte eine signifikant höhere Abundanz in Kontrollen identifiziert werden (siehe 8.5 Weitere Tabellen).

T.forsythia nutzt Proteine zur Energiegewinnung und ist entsprechend besonders proteolytisch aktiv, was eine Rolle in der Destruktion gingivaler Epithelzellen spielt (Visentin et al., 2023). Im Kontext von Alzheimer wurden höhere Konzentrationen von Antikörpern gegen *T.forsythia* im Blut von Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen gefunden (Kamer et al., 2009). Außerdem konnten Troci et al. zeigen, dass die Abundanz von *T.forsythia* in Wangenabstrichen von Patienten mit Alzheimer, MCI und gesunden Kontrollen positiv mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert (Troci et al., 2024).

Genus Rothia: Der Genus Rothia kommt mit relativ hoher Abundanz im Mund vor (Sureda et al., 2020) und wurde auch in der vorliegenden Arbeit mit einer Abundanz von bis zu 11,04% im Saliva nachgewiesen (siehe 3.3.1 Durchschnittliche relative Abundanzen). Für den Genus als Ganzes konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen gefunden werden. Jedoch wurden die beiden Spezies *R.dentocariosa* und *R.mucilaginosa* identifiziert, wobei die Identifikation mit einer gewissen Widersprüchlichkeit einhergeht:

So wurde *R.dentocariosa* zwar dreimal identifiziert, jedoch einmal in einer salivaren Probe mit höherer Abundanz in Patienten im Kontrast zu zwei supragingivalen Identifikationen in Kontrollen. *R.mucilaginosa* wurde nur einmal identifiziert und zwar ebenfalls mit einer höheren Abundanz in Kontrollen. Dieser Nachweis war dafür bei mehrfacher Identifikation mit ANCOM-BC2 im Rahmen der Sensitivitäts-Analyse mit aufsteigenden Pseudo-Counts konsistent weiterhin statistisch signifikant. Hinzu kommt, dass die durchschnittlichen Abundanzen des Genus Rothia zwischen den Sequenzierungen ungewöhnlich stark schwanken mit 9,55% und 11,04% für Patienten und Kontrollen in der metagenomischen Sequenzierung, jeweils 4,37% und 5,06%, beziehungsweise 3,63% und 5,58% in der Short-Read-16S-Sequenzierung von salivaren und supragingivalen Proben und weniger als 1% in den Full-Length-16S-Sequenzierungen.

Die Charakterisierung und Identifikation des Genus Rothia bis auf Spezies-Ebene unterliegt dabei einigen Schwierigkeiten und ist weitestgehend auf molekulare Methoden angewiesen (Fatahi-Bafghi, 2021). Unter Berücksichtigung der Tatsachen, dass 1. der Genus Rothia potentiell eine wichtige Rolle im oralen Mikrobiom spielt (West et al., 2024), 2. die Mehrzahl der Identifikationen von Spezies dieses Genus in dieselbe Richtung hin zu einer höheren Abundanz in Kontrollen zeigen, 3. die Diskrepanz in den Sequenzierungs-Ergebnissen Fragen im Hinblick auf die exakte Identifikation aufwirft und 4. die robusteste Identifikation in der metagenomischen Sequenzierung, mit potentiell genauester Spezies-Differenzierung, stattfand, soll der Genus Rothia mit den beiden Spezies *R.dentocariosa* und *R.mucilaginosa* an dieser Stelle trotzdem näher beleuchtet werden.

Spezies dieses Genus werden eher als orale Kommensale betrachtet, die die Abundanz von Pathogenen niedrig halten, jedoch auch periphere Infektionen auslösen (West et al., 2024). Dementsprechend fand man höhere Abundanzen in supragingivalem Plaque von

gesunden Kontrollen verglichen mit Patienten mit Karies (Baker et al., 2021, Havsed et al., 2021). Für den Genus *Rothia* wurde außerdem eine geringere Abundanz in Wangenabstrichen von Patienten mit Alzheimer verglichen mit gesunden Kontrollen nachgewiesen (Troci et al., 2024).

R.dentocariosa wird oft mit oraler Gesundheit und einem erhöhten Aufkommen in gesundem Parodontalgewebe in Verbindung gebracht (Del Pilar Angarita-Díaz et al., 2024, Diaz et al., 2016). Diese Spezies konnte häufiger und mit höherer Abundanz in subgingivalem Plaque, beziehungsweise Zungenbelag von gesunden Kontrollen verglichen mit Parodontitis- (Colombo et al., 2009, Papapanou et al., 2020), beziehungsweise Halitosis-Patienten gefunden werden (Seerangaiyan et al., 2017). Auch beim Vergleich gesunder und erkrankter subgingivaler Areale bei Frauen mit Parodontitis fanden sich höhere Abundanzen in gesunden Arealen (Velsko et al., 2020). *R.dentocariosa* war außerdem assoziiert mit dem Therapieansprechen bei antibiotischer Therapie von Parodontitis (Colombo et al., 2012) und zeigte eine negative Assoziation mit klinischen Parodontitis-Parametern und der gezielten, experimentellen Entwicklung von Gingivitis durch Abstinenz von oraler Hygiene (Kistler et al., 2013).

Umgekehrt konnte *R.dentocariosa* jedoch auch in subgingivalem Plaque von Patienten mit Parodontitis (Aguilar-Luis et al., 2021) und im Plaque von Kariesläsionen (Bizhang et al., 2011, Munson et al., 2004 Thomas et al., 2012) nachgewiesen werden. Außerdem konnte eine höhere Abundanz in Saliva von Kindern mit Karies verglichen mit gesunden Kontrollen (Jiang et al., 2016) und in Patienten mit ausgeprägter, verglichen mit Patienten mit geringer Karies-Klinik (AlEraky et al., 2021) beobachtet werden.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnten Fu et al. eine höhere Abundanz von *R.dentocariosa* im Saliva von gesunden Kontrollen verglichen mit Patienten mit Alzheimer nachweisen (Fu et al., 2022).

R.mucilaginosa wurde in einer longitudinalen Arbeit im Saliva als Risikomarker für die Entwicklung von Karies bei Kindern identifiziert (Grier et al., 2021) und in höherer Abundanz in Kindern mit Karies verglichen mit gesunden Kontrollen gefunden (Vieira et al., 2019). Dieses Taxon wurde jedoch ebenfalls in höherer Abundanz im Zungenbelag von gesunden Kontrollen verglichen mit Patienten mit Halitosis (Bernardi et al., 2020, Kazor et al., 2003), sowie in Patienten mit geringer, verglichen mit Patienten mit ausgeprägter Karies-Klinik (AlEraky et al., 2021) gefunden. Außerdem

wiesen Veganer verglichen mit Omnivoren eine höhere salivare Abundanz von *R.mucilaginosa* auf (Hansen et al., 2018). In-vitro kam es zu einer Zunahme der Abundanz dieses Taxons nach Fluorid-Gabe (López-López und Mira, 2020) und man konnte zeigen, dass es ein Metall-chelatierendes Enterobactin produziert und in Co-Kultur das Wachstum von *S.mutans* hemmt (Uranga et al., 2020).

4.3 Globale Betrachtung konsistent identifizierter Taxa

Bei umfassender Betrachtung der zuvor diskutierten Spezies lässt sich ein gewisser Trend innerhalb der Verteilung ausmachen: So kann man für die konsistent identifizierten Taxa festhalten, dass unter den in Patienten identifizierten Taxa diverse *Prevotella*- und *Lactobacillus*-Spezies zu finden sind, die einen klaren Bezug zu oralen Pathologien aufweisen. Hinzu kommen Spezies wie *Olsenella uli*, *Lancefieldella rimae*, *Anaeroglobus geminatus*, *Dialister pneumosintes* und *invisus* und *Bifidobacterium dentium*, die weniger prominent, aber doch relativ klar mit einer schlechteren, oralen Gesundheit in Verbindung stehen.

Umgekehrt lassen sich einige der in Kontrollen identifizierten Spezies wie *Kingella oralis* und *Streptococcus parasanguinis* mit oraler Gesundheit in Verbindung bringen, während *Haemophilus sputorum* und *Granulicatella adiacens* zumindest als orale Kommensale im Gesunden eingestuft werden können.

Dehnt man die Betrachtung weiter auf die Genera und weitere Spezies aus, erhärtet sich der Eindruck eines eher pathologischen Mikrobioms in Patienten: So bestärkt die genauere Betrachtung der zahlreichen *Prevotella*-, *Lactobacillus*- und *Streptococcus*-Spezies den zuvor ausgemachten Trend, zusätzlich untermauert durch unter Anderem *Selemonas*-Spezies in Patienten und *Rothia*-Spezies in Kontrollen. Auch das erhöhte Aufkommen von *Fusobacterium nucleatum* in Patienten passt in dieses Bild.

In einem gewissen Widerspruch zu diesem Trend steht dann jedoch die Identifikation zentraler Pathogene wie *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Filifactor alocis* und *Tannerella forsythia* in Kontrollen. Bei genauerer Betrachtung darf dieser Trend jedoch kritisch betrachtet werden: Über die Tatsache hinaus, dass diese Taxa alle weniger robust identifiziert wurden, als die zuvor genannten, wurden *T.denticola* und *T.forsythia* jedes sogar nur ein einziges mal identifiziert, was die Bedeutung dieses Nachweises in Frage stellt. Im Fall von *T.denticola* lässt sich durch Mitberücksichtigung anderer Vertreter dieses Genus

außerdem eine deutlich gleichmäßigere Verteilung pathogener Spezies erkennen.

A. actinomycetemcomitans wiederum ist ein Vertreter des Green-Complex (Carrouel et al., 2016, Socransky et al., 1998), der aber auch häufig im Rahmen von Parodontitis nachgewiesen wird (Gambin et al., 2024), weswegen sein Nachweis sowohl mit oraler Gesundheit, als auch Krankheit vereinbar ist. Ähnlich uneindeutig gestaltet sich die Situation auch für *Veillonella dispar* und *Veillonella parvula*, deren Nachweis keine eindeutigen Rückschlüsse erlaubt.

Der Nachweis von *Filifactor alocis* stimmt interessanterweise mit den Beobachtungen von Bathini et al. zur Abundanz in Alzheimer-Patienten überein (Bathini et al., 2020). Auch die von Schwartz et al. beobachtete Abnahme der Abundanz im Alter (Schwartz et al., 2021) würde in diesen Kontext passen, auch wenn das Alter der Probanden in der vorliegenden Arbeit vergleichbar war (siehe 3.1 Probandencharakteristiken).

Nichtsdestotrotz lässt sich die in dieser Arbeit beobachtete, höhere Abundanz in Kontrollprobanden nur schwer in das Bild einer oralen Dysbiose einfügen.

In gewissem Sinne überraschend ist außerdem die Beobachtung, dass PG kein einziges Mal als differentiell abundant identifiziert werden konnte. Zwar konnte das Taxon in allen Probenarten und mit allen Sequenzierungsmethoden identifiziert werden, allerdings nur in geringen Abundanzen. Betrachtet man jedoch die sehr uneinheitlichen Ergebnisse früherer Arbeiten im Hinblick auf den Nachweis von PG in Alzheimer-Patienten, erscheint diese Beobachtung durchaus plausibel (siehe 1.3.3 Orale Dysbiose in Alzheimer-Patienten).

Ein geringes Aufkommen innerhalb der oralen Gemeinschaft bei zugleich potentiell hoher Pathogenität wäre dabei immer noch im Einklang mit der Keystone-, oder Pathobionten-Hypothese (Hajishengallis et al., 2012, Meghil und Cutler, 2020). Insofern dieses Phänomen jedoch in einem extrem niedrig abundanten Rahmen stattfindet, müsste zukünftig kritisch hinterfragt werden, inwieweit groß angelegte Sequenzierungsarbeiten gegenüber zielgerichteteren Ansätzen die Methode der Wahl zum Nachweis dieses Prozesses sind. In diesem Fall könnte ein kombinierter Ansatz helfen, Veränderungen niedrig-abundanter Schlüsselerreger zusammen mit den, potentiell durch diese induzierten, Verschiebungen der ökologischen Gemeinschaft zu dokumentieren.

4.4 Exkurs: Nitrat-reduzierende Bakterien

Ein weiterer Aspekt, anhand dessen man ein pathologisches Mikrobiom im Mund definieren könnte, ist das Potential zur Nitrat-Reduktion. Bakterien der Mundhöhle können anorganisches Nitrat aus der Nahrung zu Nitrit reduzieren, das weiter zur endogenen Synthese von Stickstoffmonoxid (NO), einem zentralen Vasodilatator verstoffwechselt wird. Auf diese Weise könnte das orale Mikrobiom Einfluss auf die Entstehung von endothelialer Dysfunktion, Bluthochdruck und letztlich kardiovaskulärer Endpunkte nehmen (Chai et al., 2024, Feng et al., 2023).

Berücksichtigt man die Tatsachen, dass kardiovaskuläre Vorerkrankungen und Risikofaktoren ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Alzheimer spielen (Gaugler et al., 2016, Zhang et al., 2021) und dass das Potential zur Nitrat-Reduktion wiederum auch auf orale Pathologien Einfluss nehmen könnte (Feng et al., 2023), lohnt es sich, diesen Aspekt des oralen Mikrobioms ebenfalls zu beleuchten.

Feng et al. beschreiben in einem aktuellen Review, dass für eine größere Anzahl von oralen Bakterien das Vorhandensein der genetischen Grundlage zur Nitratreduktion gezeigt werden konnte, dass aber zugleich nur für eine kleinere Anzahl dieser Bakterien tatsächlich auch unter physiologischen Bedingungen nachgewiesen wurde, dass sie Nitrat reduzieren (Feng et al., 2023). Eine Bewertung der Verteilung der Spezies zwischen Patienten und Kontrollen sollte also mehrstufig erfolgen:

Unter den konsistent identifizierten Taxa finden sich tatsächlich nur drei Spezies, die Nitrat reduzieren: *Streptococcus parasanguinis*, *Veillonella dispar* und *Granulicatella adiacens* (Chai et al., 2024, Feng et al., 2023). Diese drei Taxa kommen alle mit höherer Abundanz in Kontrollen vor, wobei nur *V. dispar* zu den bestätigt Nitrat-reduzierenden Spezies gehört (Feng et al., 2023).

Dehnt man die Betrachtung weiter aus auf Taxa, die weniger konsistent identifiziert wurden, gestaltet sich das Bild differenzierter: So finden sich in Kontrollen die folgenden Spezies mit Potential zur Nitratreduktion: *Veillonella dispar*, *Streptococcus parasanguinis*, *Granulicatella adiacens*, *Rothia dentocariosa*, *Rothia mucilaginosa*, *Streptococcus salivarius*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus*, *Neisseria flavescens*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Schaalia odontolytica* und *Streptococcus australis* (Chai et al., 2024, Feng et al., 2023).

Umgekehrt finden sich in Patienten *Veillonella parvula*, *Actinomyces graevenitzi*, *Neisseria macacae*, *Neisseria sicca*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mutans*, *Selenomonas noxia*, *Selenomonas flueggei* und *Selenomonas artemidis* mit Potential zur Nitratreduktion (Chai et al., 2024, Feng et al., 2023).

Auf die Genus-Ebene gehoben lassen sich außerdem *Kingella*, *Aggregatibacter* und *Haemophilus* als Nitrat-reduzierende Genera in Kontrollen und *Eikenella* und *Selenomonas* in Patienten identifizieren (Chai et al., 2024, Feng et al., 2023).

Als bestätigt Nitrat-reduzierend gelten dabei jedoch nur neben der bereits erwähnten Spezies *Veillonella dispar*, *Rothia dentocariosa*, *Rothia mucilaginosa*, *Actinomyces viscosus* und *Schaalia odontolytica* (Feng et al., 2023). Diese Taxa finden sich alle mit höherer Abundanz in Kontrollen wieder, sodass sich insgesamt ein Trend hin zum gesteigerten Potential zu Nitrat-Reduktion in der Kontrollgruppe ableiten lässt.

4.5 Fazit zu konsistent identifizierten Taxa

Es lassen sich abschließend einige Beobachtungen zur Verteilung von Taxa mit statistischer Signifikanz zwischen Patienten mit Alzheimer und gesunden Kontrollprobanden festhalten:

1. Fokussiert man sich ausschließlich auf Taxa, die mit einer gewissen Konsistenz wiederholt identifiziert wurden, lassen sich in Patienten diverse orale Pathogene identifizieren, während sich in Kontrollen hauptsächlich Taxa finden lassen, die nur sporadisch mit Erkrankungen des Mundraums in Verbindung stehen, oder sogar explizit als Gesundheits-assoziiert beschrieben wurden. Allerdings werden auf dieser Betrachtungsebene auch keine der zentralen Parodontitis-Erreger identifiziert, wobei man *Prevotella nigrescens* als Vertreter des Orange-Complex (Abdulkareem et al., 2023, Socransky et al., 1998) hierbei gegebenenfalls als solchen betrachten könnte.
2. Dehnt man die Betrachtung weiter auf die Genera der konsistent identifizierten Spezies, sowie weitere Spezies aus diesen Genera aus, werden die zuvor genannten Beobachtungen unterstützt. Vor allem die Spezies-Verteilung der Genera *Prevotella*, *Streptococcus* und *Lactobacillus* erweckt den Eindruck eines höheren Aufkommens von Pathogenen in Patienten.

3. Der Fokus auf parodontale Leitkeime ist nur bedingt aufschlussreich. So lassen sich mit *Treponema denticola* und *Tannerella forsythia* zwar zwei Vertreter des Red-Complex (Abdulkareem et al., 2023, Socransky et al., 1998) in Kontrollen identifizieren. Die Identifikation von beiden erscheint jedoch wenig robust, da sie zum einen nur einmal erfolgte, die Identifikation sich nicht auf die Genus-Ebene fortsetzt und im Falle von *T.denticola* die Verteilung oraler, potentiell pathogener *Treponema*-Spezies weit weniger eindeutig erscheint. *Porphyromonas gingivalis* als dritter Vertreter des Red-Complex wurde wiederum überhaupt nicht identifiziert. Weitere parodontale Pathogene wie *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Filifactor alocis* lassen ebenfalls keinen eindeutigen Schluss zu, da sie nicht einheitlich in Patienten oder Kontrollen vorkommen und speziell *A.actinomycetemcomitans* potentiell auch im Gesunden vorkommen kann (Abdulkareem et al., 2023, Socransky et al., 1998).
4. Die Betrachtung der identifizierten Taxa im Hinblick auf ihr Potential zur Nitrat-Reduktion ist wiederum durchaus aufschlussreich, da sich ein recht klarer Trend des erhöhten Aufkommens sicher Nitrat-reduzierender Taxa in Kontrollen erkennen lässt (Feng et al., 2023).

4.6 Gegenüberstellung der Methoden

Insgesamt kamen in dieser Arbeit drei verschiedene Sequenzierungsmethoden zum Einsatz: Eine Short-Read-Sequenzierung der variablen Regionen V3 und V4 des 16S-rRNA-Gens auf einer Illumina-NextSeq2000-Plattform, eine Full-Length-Sequenzierung des gesamten 16S-rRNA-Gens auf einer Oxford-Nanopore-Plattform und eine metagenomische Sequenzierung des gesamten genetischen Materials in der Probe, ebenfalls auf einer Oxford-Nanopore-Plattform.

Diese Sequenzierungsarten und Technologien unterscheiden sich dabei bereits von vorne herein in einigen Aspekten, die Unterschiede in den Ergebnissen erklären: So werden mittels Illumina-Technologie aufgrund des Sequencing-by-Synthesis-Verfahrens große Mengen an Reads generiert, was jedoch mit dem Risiko von Amplifikationsfehlern einhergeht. Im Rahmen der metagenomischen Sequenzierung entfällt ein Großteil des sequenzierten genetischen Materials wiederum auf

eukaryotische und in kleinen Teilen virale DNA, wodurch die absolute Ausbeute an bakteriellen Reads vergleichsweise klein ausfällt (Hu et al., 2021).

Vergleicht man nun die Ergebnisse dieser Sequenzierungsmethoden, lassen sich deutliche Unterschiede ausmachen: So konnten mit den drei Methoden unterschiedlich viele Spezies identifiziert werden mit bis zu 2122 Spezies in der metagenomischen und lediglich 511 in der Full-Length-16S-Sequenzierung. Diese Diskrepanz lässt sich dadurch erklären, dass im Rahmen einer metagenomischen Sequenzierung deutlich mehr niedrig-abundante Spezies identifiziert werden, während 16S-Sequenzierungen eher höher abundante Taxa reflektieren (Bars-Cortina et al., 2024, Durazzi et al., 2021, Rubiola et al., 2022).

Filtert man die Ergebnisse nach der relativen Abundanz, gleicht sich die Anzahl identifizierter Spezies an, was bestätigt, dass mit der metagenomischen Sequenzierung vor allem eine hohe Anzahl extrem niedrig abundanter Taxa nachgewiesen wurde. Allerdings bleibt auch bei Filterung der Taxa nach ihrer relativen Abundanz eine deutliche Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der drei Sequenzierungsmethoden bestehen: So kann zwar eine konsistente Schnittmenge der identifizierten Spezies dokumentiert werden. Diese macht jedoch nur einen Anteil von circa 50% der Gesamtzahl identifizierter Taxa aus, wobei das Verhältnis zwischen Schnittmenge und Anzahl der mit allen drei, beziehungsweise jeder einzelnen Methode identifizierten Taxa erstaunlich konstant bleibt (siehe 3.6 Methoden- und Probenvergleich).

Yeo et al. konnten bei einem ähnlichen Vergleich einer Full-Length-Sequenzierung mit Oxford Nanopore Technologie und einer Sequenzierung der variablen Regionen V3 und V4 mit Illumina-Technologie oraler Tumorproben eine Schnittmenge von 32,9% der insgesamt identifizierten und vorgefilterten Spezies festhalten (Yeo et al., 2024). Diese Schnittmenge ist vergleichbar mit der Schnittmenge identifizierter Spezies zwischen Full-Length-16S- und Short-Read-16S-Sequenzierung der supragingivalen Proben von etwa 39% und etwas geringer als die entsprechende Schnittmenge der salivaren Proben von 52%.

Auch bei Vergleich der Full-Length-16S- und Short-Read-16S-Sequenzierung mittels Bray-Curtis-Dissimilarität und PCoA lässt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Ergebnissätzen erkennen. Diese distinkte Trennung ist auf Spezies-Ebene am deutlichsten, bleibt jedoch auch auf höheren phylogenetischen Ebenen erhalten (siehe

3.6 Methoden- und Probenvergleich, Figur 36, 37, 38, 39). Yeo et al. Kamen ebenfalls zu dem Schluss, dass die Unterschiede zwischen den beiden Sequenzierungssätzen auf höheren phylogenetischen Ebenen weniger stark ausgeprägt waren (Yeo et al., 2024).

Ein solcher Annäherungstrend kann zumindest für die beiden 16S-Sequenzierungen auch in der Anzahl identifizierter Taxa höherer phylogenetischer Ebenen beobachtet werden: So finden sich in den salivaren Proben ab der Familien-Ebene mindestens 90% der mittels Full-Length-16S-Sequenzierung identifizierten Taxa in der Schnittmenge wieder, in den supragingivalen Proben sogar bereits ab der Genus-Ebene.

Nichtsdestotrotz bleiben immer noch Taxa, die nur mittels Short-Read-16S-Sequenzierung identifiziert wurden. Betrachtet man außerdem die Schnittmengen zwischen metagenomischer und Short-Read-16S-Sequenzierung, mit denen die meisten Taxa identifiziert wurden, ergibt sich selbst auf Phylum-Ebene lediglich eine Schnittmenge von 55% der insgesamt identifizierten Phyla.

Die eindeutige Identifikation von Bakterien auf Spezies-Ebene mittels 16S-Sequenzierung wird dabei mittlerweile in Frage gestellt und stattdessen zur Verwendung metagenomischer Daten geraten (Kim et al., 2024). Daher ist es nicht überraschend, dass zum einen Unterschiede zwischen den Ergebnissen dieser Methoden gefunden werden können und dass diese zum anderen auf der Spezies-Ebene am ausgeprägtesten sind.

Um dieser Problematik der Beurteilung von Ergebnissen auf Spezies-Ebene entgegenzuwirken, wurde für diese Arbeit die Korrelation der mittleren, relativen Abundanzen auf Genus-Ebene ermittelt, um den Vergleich der Methoden auf Basis potentiell robusterer Daten fortzusetzen. Dabei zeigte sich zunächst einmal eine grundlegende, positive Korrelation der Ergebnisse der drei, beziehungsweise bei den supragingivalen Proben zwei Sequenzierungsmethoden. Diese Beobachtung ist insofern zunächst einmal nicht überraschend, da dasselbe Probenmaterial untersucht wurde.

Da die durchschnittlichen Abundanzen keine Normalverteilung zeigen, ist die statistische Methode der Wahl in diesem Fall der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman. Weil mit dieser Methode jedoch lediglich die Rangfolge der Werte, aber nicht die Ausprägung des Merkmals (in diesem Fall also die relative Abundanz des betreffenden Genus) berücksichtigt wird, lohnt es sich, beide statistische Größen zu betrachten:

Für die Saliva-Proben zeigen demnach nach Spearman die Ergebnisse der beiden 16S-Sequenzierungen die stärkste Korrelation ($\rho = 0,70, p < 0,001$), relativ dicht gefolgt von der metagenomischen mit der Short-Read-16S-Sequenzierung ($\rho = 0,67, p < 0,001$). Den geringsten Grad an Korrelation weisen hingegen die metagenomische und Full-Length-16S-Sequenzierung auf ($\rho = 0,53, p < 0,001$).

Betrachtet man hingegen den Korrelationskoeffizient nach Pearson und damit auch die relativen Abundanzen an sich, gestaltet sich die Situation etwas anders: Hier weisen die metagenomische und Short-Read-16S-Sequenzierung eine sehr hohe Korrelation auf ($r = 0,95, p < 0,001$), gefolgt von der Full-Length-16S- und Short-Read-16S-Sequenzierung mit einem ähnliche Korrelationsgrad wie nach Spearman ($r = 0,78, p < 0,001$) und zuletzt der metagenomischen zur Full-Length-Sequenzierung ($r = 0,72, p < 0,001$).

Für die supragingivalen Proben, mit denen erneut Full-Length-16S- und Short-Read-16S-Sequenzierung verglichen werden, ergeben sich ebenfalls deutlich unterschiedliche Korrelationen nach Pearson ($r = 0,90, p < 0,001$) und nach Spearman ($\rho = 0,56, p < 0,001$).

Anhand der Korrelationen lässt sich also erneut festhalten, dass es zwar eindeutige Zusammenhänge zwischen den Datensätzen gibt, jedoch auch Unterschiede, die gemessen an der Tatsache, dass dasselbe Probenmaterial untersucht wurde, vergleichsweise hoch ausfallen. Betrachtet man die relativen Abundanzen auf Genus-Ebene im Detail, fällt dabei auf, dass im Rahmen der Full-Length-16S-Sequenzierung einige Genera in beiden Probenarten deutlich gegenüber den beiden anderen Methoden abweichen: So weist die Full-Length-16S-Sequenzierung einen durchweg deutlich höheren Anteil an *Haemophilus* und *Campylobacter* auf, während die relativen Abundanzen von *Rothia* und *Schaalia* verschwindend gering ausfallen. Auch der Anteil von *Prevotella* fällt geringer aus, während *Veillonella* und *Streptococcus* höhere relative Abundanzen aufweisen. Die relative Natur dieser Daten macht es schwierig, diese Unterschiede zu beurteilen, da beispielsweise die geringere Gesamtzahl identifizierter Taxa in der Full-Length-16S-Sequenzierung den relativen Anteil einzelner Taxa höher erscheinen lassen kann. Gerade deswegen sind jedoch vor allem der extrem geringe Anteil von *Rothia* und *Schaalia* potentiell umso relevantere Beobachtungen. Wäre dieser Vergleich lediglich mit zwei Varianten der 16S-Sequenzierung durchgeführt worden, wäre es schwierig zu beurteilen, ob es sich bei diesen Unterschieden um Über-

oder Unterrepräsentationen handelt. Durch die zusätzliche metagenomische Sequenzierung der salivaren Proben, die relative Abundanzen erbracht hat, die denen der Short-Read-16S-Sequenzierung deutlich stärker ähneln, erscheint es jedoch wahrscheinlicher, dass die Full-Length-16S-Sequenzierung hier abweicht (siehe 3.6 Methoden- und Probenvergleich, Figur 40, 41).

Neben dem methodischen Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Sequenzierungs-Plattformen wurden in dieser Arbeit zusätzlich Arten von oralem Probenmaterial verglichen. Initial wurden eine salivare Probe entnommen und Abstriche supragingival und buccal durchgeführt. Nach Bestimmung des DNA-Gehaltes der Wangenabstriche wurde anschließend entschieden, diese nicht weiter zu verwenden, sodass lediglich ein Vergleich zwischen salivaren und supragingivalen Proben erfolgen konnte.

Die Wahl dieses Probenmaterialien basierte dabei zunächst auf praktischen, klinischen Erwägungen: So ist die Probenentnahme aus dem subgingivalen Raum potentiell komplexer für eine nicht zahnmedizinisch geschulte Person, verglichen mit der Entnahme eines Abstrichs, oder dem Sammeln von Saliva. Vor allem die salivare Probenentnahme kann selbst mit minimalen Instruktionen ohne weitere Hilfe vom Patienten selber durchgeführt werden.

Hinzu kommen außerdem Abwägungen im Hinblick auf die Bedeutung der spezifischen anatomischen Nischen der Mundhöhle: So werden sub- und supragingivale Proben in der Regel als Probenmaterial zur Charakterisierung des Mikrobioms bei Parodontitis und Karies genutzt, da sie sich in unmittelbarer, räumlicher Nähe zum betreffenden Krankheitsprozess befinden (Belstrøm, 2020). Speziell im Falle des subgingivalen Mikrobioms scheint diese strengere Differenzierung auch sinnvoll zu sein, da diese anatomische Nische durch den Schutz vor Scherkräften und den geringen Sauerstoffkontakt sehr distinkte Umweltbedingungen bietet (Curtis et al., 2020).

Saliva kann umgekehrt mit keiner oralen Pathologie im speziellen in Verbindung gebracht werden, soll jedoch die Veränderungen in sub- und supragingivalem Plaque reflektieren (Belstrøm, 2020). Inwieweit diese Beobachtungen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden können, ist fraglich: So unterscheiden sich die beiden Probenmaterialien deutlich beim Vergleich mittels Bray-Curtis-Dissimilarität und PCoA (siehe 3.6 Methoden- und Probenvergleich, Figur 34, 35), es existieren

jedoch zugleich auch Schnittmengen zwischen den als differentiell abundant identifizierten Taxa.

Hinzu kommt, dass der Begriff der oralen Dysbiose schwer zu definieren ist (Lloyd-Price et al., 2016): Zwar wurden orale Pathologien wie Parodontitis und Karies mit dysbiotischen Veränderungen an den verschiedenen Lokalisationen im Mund in Verbindung gebracht (Costalonga et al., 2014, DG PARO, DGZMK, AWMF 2020). Das bedeutet jedoch nicht zwangsweise, dass eine Dysbiose des Mundraums, die vielleicht mit systemischen Erkrankungen in Verbindung steht, sich nicht auch abseits dieser klar lokalisierbaren, pathologischen Veränderungen zeigt.

Diese Unsicherheit äußert sich auch in der Vielzahl unterschiedlicher Probenmaterialien, die alleine im Kontext von Studien zum oralen Mikrobiom bei Patienten mit Demenz, beziehungsweise Alzheimer-Krankheit zum Einsatz kamen (siehe 1.3.3 Orale Dysbiose in Alzheimer-Patienten). Selbst zwischen Arbeiten, die dasselbe Probenmaterial verwendet haben, ergeben sich technische Unterschiede, die die Vergleichbarkeit erschweren: So wurden in den Arbeiten von Chen et al. und Na et al. in beiden Fällen subgingivale Proben untersucht. Jedoch wurden bei Chen et al. mehrere Proben von verschiedenen, explizit klinisch auffälligen Stellen gepoolt (Chen et al., 2024), während bei Na et al. mit Hilfe einer Kürette eine einzelne, subgingivale Probe aus der tiefsten, identifizierten Parodontaltasche entnommen wurde (Na et al., 2024).

Die genannten Unabwägbarkeiten lassen den kombinierten Einsatz von supragingivalem Abstrich und Saliva als sinnvolle Methode zur Charakterisierung des oralen Mikrobioms in seiner Gesamtheit erscheinen, da 1. die technische Einfachheit die Probengewinnung erleichtert und die Vergleichbarkeit zwischen Arbeiten steigert, 2. Veränderungen im Saliva das Potential haben, pathologische Veränderungen im Mundraum widerzuspiegeln, die sich nicht zwangsweise in einer anatomischen Nische lokalisieren lassen und 3. mit einem supragingivalen Abstrich eine Probe eines lokalisierten Biofilms als Kontrast zur räumlich ungebundenen salivaren Probe hinzugenommen wird.

4.7 Stärken der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Arbeit weist einige Stärken auf, die die Qualität der Ergebnisse unterstreichen. Beginnend mit den klinischen Aspekten ist es ein Vorteil, dass die Kontrollprobanden die Lebenspartner der Patienten waren und daher im selben Haushalt leben. Ehepartner haben oft einen ähnlichen Grad an kardiometabolischen Risikofaktoren, unter anderem bedingt durch ein ähnliches Gesundheitsverhalten und ähnliche Umweltbedingungen (Di Castelnuovo et al., 2009, Lin, Pan et al., 2023, Nakaya et al., 2021, Retnakaran et al., 2021). Veränderungen des Mikrobioms können daher weniger leicht durch unterschiedliche Umweltbedingungen, oder ein anderes Gesundheitsverhalten erklärt werden und dürfen eher mit dem Krankheitszustand in Verbindung gebracht werden.

Darüber hinaus ist es von Vorteil, dass die Patienten nicht nur klinisch, sondern auch biochemisch mittels Liquor-Diagnostik diagnostiziert wurden. Da Demenz zunächst einmal ein rein klinisches Syndrom ohne klare ätiologische Zuordnung ist, wäre eine rein kognitive Testung unzureichend, um Rückschlüsse auf einen Zusammenhang mit der Alzheimer-Krankheit ziehen zu können, da das Risiko bestünde, Patienten mit Demenzen unterschiedlicher Ätiologie gebündelt zu betrachten (DGPPN, DGN, AWMF, 2023).

Ebenfalls von Vorteil ist die Tatsache, dass Patienten im Frühstadium der Erkrankung untersucht wurden. Zum einen wäre die Wahrscheinlichkeit bei Patienten im fortgeschrittenen Stadium höher, dass diese im Zustand der Pflegebedürftigkeit nicht mehr im selben Haushalt wie ihre Lebenspartner wohnen (Gaugler et al., 2016), wodurch die Vergleichbarkeit der Umweltbedingungen nicht mehr gegeben wäre. Zum anderen entwickeln Alzheimer-Patienten im Krankheitsverlauf zunehmend Schwierigkeiten beim Bewältigen von Alltagstätigkeiten (Gaugler et al., 2016), wodurch unter anderem auch Mundhygiene und Mundstatus schlechter werden (Delwel et al., 2018). Im Frühstadium der Erkrankung darf hingegen aufgrund des ähnlichen Gesundheitsverhaltens (Di Castelnuovo et al., 2009, Lin, Pan et al., 2023, Nakaya et al., 2021, Retnakaran et al., 2021) eher von einer vergleichbaren Mundhygiene ausgegangen werden, wodurch ein großer, potentieller Einflussfaktor auf das orale Mikrobiom angeglichen wird.

Wie bereits unter 4.6 Gegenüberstellung der Methoden diskutiert kann man durch die Kombination verschiedener oraler Probenmaterialien dem Problem entgegenwirken, dass es keine Klarheit darüber gibt, wo genau im Mund eine orale Dysbiose lokalisiert ist. Speziell Saliva bietet darüber hinaus den Vorteil, dass er als Probenmaterial eine bessere Reproduzierbarkeit als zum Beispiel subgingivale Proben bietet (Chen et al., 2024, Na et al., 2024) und zugleich potentiell repräsentativ für pathologische Veränderungen im sub- und supragingivalen Biofilm ist (Belstrøm et al., 2020).

Die Kombination verschiedener Sequenzierungsmethoden hilft ebenfalls dabei, einige Unsicherheiten zu minimieren. So ergänzen sich metagenomische und 16S-Sequenzierungen in vielerlei Hinsicht komplementär: Während die 16S-Sequenzierung durch den Amplifikationsschritt mit wenig genetischem Material auskommt und eine große Ausbeute bakterieller Reads generiert, liegt in diesem Prozess zugleich das Risiko von Verzerrungen, da die exponentielle Natur der Amplifikation zu einer Überrepräsentation hoch-abundanter Taxa führt. Demgegenüber kann die absolute Ausbeute an bakterieller DNA durch einen hohen Anteil eukaryotischer und viraler DNA in einer metagenomischen Sequenzierung sehr gering sein, wobei dafür das ursprüngliche Verhältnis der Taxa erhalten bleibt und speziell niedrig-abundante Taxa besser identifiziert werden (Bars-Cortina et al., 2024, Durazzi et al., 2021, Hu et al., 2021, Rubiola et al., 2022).

Die Kombination von drei Methoden bietet dabei noch einen weiteren Vorteil, der bei einem einfachen Vergleich nicht gegeben ist: So können Abweichungen in einer Methode besser als Über-, oder Unterrepräsentation eingestuft werden, falls die anderen beiden Methoden in diesem Aspekt zu ähnlichen Ergebnissen kommen.

Zuletzt ist auch der kombinierte Einsatz von zwei statistischen Methoden der differentiellen Abundanz-Analyse eine weitere Stärke. Die Identifikation differentiell abundanter Taxa geht mit einem hohen Risiko einher, Falsch-positive Ergebnisse zu erzielen, was durch Methoden zur Korrektur multiplen Testens ausgeglichen werden kann. Durch eine zu strenge Korrektur geht man dabei jedoch das Risiko ein, potentiell relevante Ergebnisse zu verwerfen (Lin und Peddada, 2020b, Nearing et al., 2022).

Mit LEfSe und ANCOM-BC2 wurden zwei sehr unterschiedliche Methoden kombiniert, die sich in ihren Vor- und Nachteilen potentiell ergänzen (siehe 2.6 Datenanalyse und Statistik). Dadurch und indem der Fokus auf mehrfach identifizierte Taxa gelegt wird,

werden die Ergebnisse strenger gefiltert, was sich in der zuvor diskutierten, biologischen Plausibilität der konsistent identifizierten Taxa niederschlägt (siehe 4.2 Konsistent identifizierte Taxa).

4.8 Limitationen der vorliegenden Arbeit

Mit den zuvor genannten Stärken gehen einige Schwächen, beziehungsweise Limitationen der vorliegenden Arbeit einher. So ist es auch möglich die Wahl der Lebenspartner als Kontrollprobanden als Problem zu betrachten: Einige Arbeiten kamen zu dem Schluss, dass die Partner von Demenz-Patienten selber ein erhöhtes Risiko für kognitiven Abbau haben (Dassel et al., 2017). Dieser Zusammenhang ist zwar nicht unumstritten (Elayoubi et al., 2023, Pertl et al., 2015), jedoch könnte man argumentieren, dass eine potentielle Risikopopulation nicht ideal als Kontrollen geeignet ist.

Außerdem gibt es die Theorie, dass das Mikrobiom übertragbar sei, was auch mit einer Transmission von Krankheitszuständen einhergehen soll. Im Kontext von Alzheimer wurde dabei gezeigt, dass das orale und gastrointestinale Mikrobiom von Partnern von Alzheimer-Patienten Ähnlichkeiten zum Mikrobiom der Patienten und Unterschiede zu gesunden Kontrollen zeigt (Zhang et al., 2023). Allerdings ist die Richtung dieses Prozesses unklar, da im Tierexperiment auch gezeigt wurde, dass der Transfer des Mikrobioms von gesunden in erkrankte Tiere pathologische Veränderungen positiv beeinflusst (Kim et al., 2020). Insofern könnte man argumentieren, dass diese zu erwartende Annäherung der Mikrobiome von Patienten und Kontrollen eventuell identifizierte Unterschiede umso relevanter erscheinen lässt.

Eine größere Probandenzahl hätte die statistische Power der Arbeit erhöht und geholfen, eventuell nur schwach ausgeprägte Unterschiede zu identifizieren. Außerdem könnte man argumentieren, dass eventuelle Unterschiede im Mikrobiom als Bestandteil der Alzheimer-Pathologie in einem weiter fortgeschrittenen Stadium vielleicht stärker ausgeprägt wären.

Auch die Einschlusskriterien hätten strenger sein können: So war es aufgrund des fortgeschrittenen Alters der Probanden nicht möglich, Komorbiditäten und Vormedikation grundsätzlich auszuschließen. Ebenso hätte man potentielle Confounder wie die Ernährung der Probanden als wichtige Einflussfaktoren auf das orale Mikrobiom miterheben können (Santonocito et al., 2022), auch wenn dieser Aspekt

idealerweise durch ein vergleichbares Gesundheitsverhalten der Lebenspartner keine größere Rolle spielt (Di Castelnuovo et al., 2009, Lin, Pan et al., 2023, Nakaya et al., 2021, Retnakaran et al., 2021).

Die Wahl von Saliva als Probenmaterial bringt das Problem mit sich, dass er zum einen keinen Rückschluss auf die genaue Lokalisation einer mikrobiellen Veränderung innerhalb des Mundraums zulässt (Belstrøm, 2020) und es zum anderen vielen Probanden schwergefallen ist, eine ausreichende Menge zu sammeln. Speziell im Kontext von Alzheimer kann dies zum Problem werden, da gerade ältere Patienten zu einer ausgeprägten Mundtrockenheit neigen (Xu et al., 2019).

Eine weitere Limitation liegt in der Beurteilung des Mundstatus. Dieser wurde zwar orientierend erhoben, jedoch gibt es weit präzisere Möglichkeiten der Diagnostik (DG PARO, DGZMK, AWMF 2020). Außerdem lag der Fokus der Diagnostik auf einer Beurteilung von Zahnanzahl und Gesundheit des Zahnfleisches, ohne nähere Beurteilung des Kariesstatus.

Eine zentrale Kritik könnte man darüber hinaus im Hinblick auf die statistische Herangehensweise äußern: So werden verschiedene Probenarten (salivar und supragingival) mit verschiedenen Sequenziermethoden (16S und metagenomisch) und statistischen Tests (PCoA, LEfSe, ANCOM-BC2) genutzt, um eine einzige 0-Hypothese ablehnen zu können, nämlich dass sich das orale Mikrobiom von Alzheimer-Patienten und gesunden Kontrollen unterscheidet. Aus dieser Situation ergibt sich im Grunde ein erneutes Problem der multiplen Testung mit dem Risiko falsch-positiver Ergebnisse. Auch wenn ANCOM-BC2 eine Korrektur für multiples Testen nutzt, könnte man daher Argumente dafür finden, das Signifikanzniveau global noch weiter zu senken und die Robustheit der Ergebnisse dadurch zu steigern. Allerdings gibt es auch Autoren, die sagen, dass Daten, die eine deutliche Korrelation zeigen, in diesem Fall durch zu strenge Korrektur zu konservativ bewertet werden könnten (Xie, 2012). Bedenkt man den explorativen Charakter dieser Arbeit spricht das wiederum dafür, keine allzu strengen, statistischen Kriterien zu wählen.

Auch die Herangehensweise mehrfach identifizierte Taxa als potentiell relevant zu betrachten basiert eher auf Plausibilität und wurde zum Beispiel nicht zuvor mit Hilfe einer bekannten mikrobiellen Gemeinschaft erprobt. Die identifizierten Taxa hätten außerdem auf andere Arten als primär anhand der Identifikationsfrequenz hierarchisiert

werden können. So ließen sich auch Argumente dafür finden, die Taxa mit höherer Prävalenz und/oder relativer Abundanz, beziehungsweise großer Log-fold-change stärker zu gewichten.

Außerdem sollte erwähnt werden, dass die Sequenziertiefe der metagenomischen Sequenzierung weniger tief als gehofft ausfiel und teilweise stark zwischen den Proben variierte – ein Problem, dem man vor allem durch entsprechende technische Expertise im Umgang mit dem Probenmaterial hätte entgegenwirken können.

Als letzte Limitation bleibt noch das Querschnittsdesign der Arbeit an sich zu nennen: So sind etwaige Unterschiede des Mikrobioms von Patienten rein assoziative Beobachtungen und können ohne die Erhebung longitudinaler Daten nicht in einen kausalen Zusammenhang mit der Erkrankung gebracht werden. Außerdem ist es nicht möglich zu beurteilen, ob die beobachteten Unterschiede eine dauerhafte Veränderung darstellen, oder lediglich eine temporäre Abweichung, verursacht durch einen nicht näher definierten Einflussfaktor.

5 Schlussfolgerung

Mit dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob sich das orale Mikrobiom von Alzheimer-Patienten vom Mikrobiom gesunder Kontrollprobanden unterscheidet. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Stärken und Limitationen dieser Arbeit konnte diese Frage erfolgreich beantwortet und die entsprechend identifizierten Unterschiede ebenfalls erfolgreich in einen plausiblen, biologischen Gesamtkontext gesetzt werden. Darüber hinaus konnten einige wertvolle Beobachtungen im Hinblick auf die unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Sequenziermethoden gewonnen werden. Zukünftige Arbeiten können basierend auf diesen Erkenntnissen versuchen, diese Ergebnisse weiter auszubauen und mit Hilfe einer größeren Probandenzahl, eines longitudinalen Designs und strengerer Einschlusskriterien einen möglichen Kausalzusammenhang zwischen dem oralen Mikrobiom und der Entstehung von Alzheimer aufzudecken.

6 Finanzierung

Dieses Forschungsprojekt wurde nach erfolgreicher Einreichung eines Förderungsantrags mit finanziellen Mitteln in Höhe von 30000,00€ durch die Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V. unterstützt.

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abdulkareem, A. A., Al-Taweel, F. B., Al-Sharqi, A. J. B., Gul, S. S., Sha, A., & Chapple, I. L. C. (2023). Current concepts in the pathogenesis of periodontitis: from symbiosis to dysbiosis. *Journal of Oral Microbiology*, 15(1), 2197779. <https://doi.org/10.1080/20002297.2023.2197779>
- Abram, A. M., Szewczyk, M. M., Park, S. G., Sam, S. S., Eldana, H. B., Koria, F. J., Ferracciolo, J. M., Young, L. A., Qadir, H., Bonham, A. J., Yang, F., Zora, J. S., Abdulelah, S. A., Patel, N. A., Koleilat, A., Saleh, M. A., Alhabeil, J. A., Khan, S., Tripathi, A., ... Krukoni, E. S. (2022). A Co-Association of *Streptococcus mutans* and *Veillonella parvula/dispar* in Root Caries Patients and In Vitro Biofilms. *Infection and Immunity*, 90(10), e0035522. <https://doi.org/10.1128/iai.00355-22>
- Abranches J.Zeng L.Kajfasz JK.Palmer SR.Chakraborty B.Wen ZT.Richards VP.Brady LJ.Lemos JA. 2018. Biology of Oral Streptococci. *Microbiol Spectr* 6:10.1128/microbiolspec.gpp3-0042-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0042-2018>
- Abusleme, L., Hoare, A., Hong, B.-Y., & Diaz, P. I. (2021). Microbial signatures of health, gingivitis, and periodontitis. *Periodontology* 2000, 86(1), 57–78. <https://doi.org/10.1111/prd.12362>
- Agnello, M., Marques, J., Cen, L., Mittermuller, B., Huang, A., Chaichanasakul Tran, N., Shi, W., He, X., & Schroth, R. J. (2017). Microbiome Associated with Severe Caries in Canadian First Nations Children. *Journal of Dental Research*, 96(12), 1378–1385. <https://doi.org/10.1177/0022034517718819>
- Aguilar-Luis, M. A., Casas Apayco, L., Tinco Valdez, C., De Lama-Odría, M. D. C., Weilg, C., Mazulis, F., Silva-Caso, W. G., & Del Valle-Mendoza, J. M. (2021). Screening and Assessment of Antimicrobial Susceptibility of Periodontopathic Bacteria in Peruvian Patients with Periodontitis: A Pilot Study. *International Journal of Dentistry*, 2021, 2695793. <https://doi.org/10.1155/2021/2695793>
- Ahirwar, S. S., Snehi, S. K., & Gupta, M. K. (2021). Distribution and molecular characterisation of Lactobacilli in the oral cavity of children. *Indian Journal of Dental Research : Official Publication of Indian Society for Dental Research*, 32(1), 8–14. https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR_298_19
- Aja, E., Mangar, M., Fletcher, H. M., & Mishra, A. (2021). Filifactor alocis: Recent Insights and Advances. *Journal of Dental Research*, 100(8), 790–797. <https://doi.org/10.1177/00220345211000656>
- Al-Ahmad, A., Muzafferiy, F., Anderson, A. C., Wölber, J. P., Ratka-Krüger, P., Fretwurst, T., Nelson, K., Vach, K., & Hellwig, E. (2018). Shift of microbial composition of peri-implantitis-associated oral biofilm as revealed by 16S rRNA gene cloning. *Journal of Medical Microbiology*, 67(3), 332–340. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000682>
- AlEraky, D. M., Madi, M., El Tantawi, M., AlHumaid, J., Fita, S., AbdulAzeez, S., Borgio, J. F., Al-Harbi, F. A., & Alaghl, A. S. (2021). Predominance of non-*Streptococcus mutans* bacteria in dental biofilm and its relation to caries progression. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(12), 7390–7395. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.052>
- Al-Kamel, A., Baraniya, D., Al-Hajj, W. A., Halboub, E., Abdulrab, S., Chen, T., & Al-Hebshi, N. N. (2019). Subgingival microbiome of experimental gingivitis: shifts associated with the use of chlorhexidine and N-acetyl cysteine mouthwashes. *Journal of Oral Microbiology*, 11(1), 1608141. <https://doi.org/10.1080/20002297.2019.1608141>
- Alqahtani, T., Deore, S. L., Kide, A. A., Shende, B. A., Sharma, R., Dadarao Chakole, R., Nemade, L. S., Kishor Kale, N., Borah, S., Shrikant Deokar, S., Behera, A., Dhawal Bhandari, D., Gaikwad, N., Kalam Azad, A., & Ghosh, A. (2023). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease, and Parkinson's disease, Huntington's disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis -An updated review. *Mitochondrion*, 71, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2023.05.007>
- Álvarez, G., Arredondo, A., Isabal, S., Teughels, W., Laleman, I., Contreras, M. J., Isbej, L., Huapaya, E., Mendoza, G., Mor, C., Nart, J., Blanc, V., & León, R. (2023). Association of nine pathobionts with periodontitis in four South American and European countries. *Journal of Oral Microbiology*, 15(1), 2188630. <https://doi.org/10.1080/20002297.2023.2188630>

- Antezack, A., Etchecopar-Etchart, D., La Scola, B., & Monnet-Corti, V. (2023). New putative periodontopathogens and periodontal health-associated species: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Periodontal Research*, 58(5), 893–906. <https://doi.org/10.1111/jre.13173>
- Araújo, L. L., Lourenço, T. G. B., & Colombo, A. P. V. (2023). Periodontal disease severity is associated to pathogenic consortia comprising putative and candidate periodontal pathogens. *Journal of Applied Oral Science : Revista FOB*, 31, e20220359. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2022-0359>
- Armitage G. C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of periodontology*, 4(1), 1–6. <https://doi.org/10.1902/annals.1999.4.1.1>
- Asai, Y., Jinno, T., Igarashi, H., Ohyama, Y., & Ogawa, T. (2002). Detection and quantification of oral treponemes in subgingival plaque by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(9), 3334–3340. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.9.3334-3340.2002>
- Ashton, J. J., Beattie, R. M., Ennis, S., & Cleary, D. W. (2016). Analysis and Interpretation of the Human Microbiome. *Inflammatory Bowel Diseases*, 22(7), 1713–1722. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000809>
- Avgerinos, K. I., Ferrucci, L., & Kapogiannis, D. (2021). Effects of monoclonal antibodies against amyloid- β on clinical and biomarker outcomes and adverse event risks: A systematic review and meta-analysis of phase III RCTs in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, 68, 101339. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101339>
- B Abraham, S., Al-Marzooq, F., Samaranayake, L., Hamoudi, R. A., Himratul-Aznita, W. H., & Aly Ahmed, H. M. (2024). Molecular analyses indicate profuse bacterial diversity in primary and post-treatment endodontic infections within a cohort from the United Arab Emirates-A preliminary study. *PloS One*, 19(7), e0305537. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0305537>
- Babikow, E., Ghaltakhchyan, N., Livingston, T., Qu, Y., Liu, C., Hoxie, A., Sulkowski, T., Bocklage, C., Marsh, A., Phillips, S. T., Mitchell, K. B., Ribeiro, A. D. A., Jackson, T. H., Roach, J., Wu, D., Divaris, K., & Jacox, L. A. (2024). Longitudinal Microbiome Changes in Supragingival Biofilm Transcriptomes Induced by Orthodontics. *JDR Clinical and Translational Research*, 9(3), 265–276. <https://doi.org/10.1177/23800844231199393>
- Baker, J. L., Morton, J. T., Dinis, M., Alvarez, R., Tran, N. C., Knight, R., & Edlund, A. (2021). Deep metagenomics examines the oral microbiome during dental caries, revealing novel taxa and co-occurrences with host molecules. *Genome Research*, 31(1), 64–74. <https://doi.org/10.1101/gr.265645.120>
- Baker, P. J., Dixon, M., Evans, R. T., Dufour, L., Johnson, E., & Roopenian, D. C. (1999). CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infection and Immunity*, 67(6), 2804–2809. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.6.2804-2809.1999>
- Balmasova, I. P., Tsarev, V. N., Arutyunov, S. D., & Babayev, E. A. (2020). [Filifactor alocis and its role in the etiology of chronic periodontitis]. *Stomatologiia*, 99(3), 78–82. <https://doi.org/10.17116/stomat20209903178>
- Bancescu, G., Dumitriu, S., Bancescu, A., Pana, M., & Andrei, M. (2006). Oral streptococcal strains isolated from odontogenic infections and their susceptibility to antibiotics. *Revista Medico-Chirurgicala a Societati de Medici Si Naturalisti Din Iasi*, 110(4), 1012–1015.
- Bansal, K., Chaudhary, R., Mathur, V. P., & Tewari, N. (2020). Comparison of oral micro-flora in caries active and caries free Indian children using culture techniques and PCR analysis. *Indian Journal of Dental Research : Official Publication of Indian Society for Dental Research*, 31(3), 420–425. https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR_39_19
- Bao, K., Bostanci, N., Thurnheer, T., & Belibasakis, G. N. (2017). Proteomic shifts in multi-species oral biofilms caused by *Anaeroglobus geminatus*. *Scientific Reports*, 7(1), 4409. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04594-9>

- Bao, K., Li, X., Poveda, L., Qi, W., Selevsek, N., Gumus, P., Emingil, G., Grossmann, J., Diaz, P. I., Hajishengallis, G., Bostanci, N., & Belibasakis, G. N. (2020). Proteome and Microbiome Mapping of Human Gingival Tissue in Health and Disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 588155. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.588155>
- Bars-Cortina, D., Ramon, E., Rius-Sansalvador, B., Guinó, E., Garcia-Serrano, A., Mach, N., Khannous-Lleiffe, O., Saus, E., Gabaldón, T., Ibáñez-Sanz, G., Rodríguez-Alonso, L., Mata, A., García-Rodríguez, A., Obón-Santacana, M., & Moreno, V. (2024). Comparison between 16S rRNA and shotgun sequencing in colorectal cancer, advanced colorectal lesions, and healthy human gut microbiota. *BMC Genomics*, 25(1), 730. <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10621-7>
- Bathini, P., Foucras, S., Dupanloup, I., Imeri, H., Perna, A., Berruex, J. L., Doucey, M. A., Annoni, J. M., & Auber Alberi, L. (2020). Classifying dementia progression using microbial profiling of saliva. *Alzheimer's & dementia (Amsterdam, Netherlands)*, 12(1), e12000. <https://doi.org/10.1002/dad2.12000>
- Batty GD, Li Q, Huxley R, Zoungas S, Taylor BA, Neal B, de Galan B, Woodward M, Harrap SB, Colagiuri S, Patel A, Chalmers J; VANCE Collaborative group. Oral disease in relation to future risk of dementia and cognitive decline: prospective cohort study based on the Action in Diabetes and Vascular Disease: Preterax and Diamicon Modified-Release Evaluation (ADVANCE) trial. *Eur Psychiatry*. 2013 Jan;28(1):49-52. doi: 10.1016/j.eurpsy.2011.07.005.
- Baty, J. J., Stoner, S. N., & Scofield, J. A. (2022). Oral Commensal Streptococci: Gatekeepers of the Oral Cavity. *Journal of Bacteriology*, 204(11), e0025722. <https://doi.org/10.1128/jb.00257-22>
- Baumgartner, J. C., Khemaleelakul, S., & Xia, T. (2003). Identification of spirochetes (treponemes) in endodontic infections. *Journal of Endodontics*, 29(12), 794–797. <https://doi.org/10.1097/00004770-200312000-00002>
- Belstrøm, D., Fiehn, N.-E., Nielsen, C. H., Holmstrup, P., Kirkby, N., Klepac-Ceraj, V., Paster, B. J., & Twetman, S. (2014). Altered bacterial profiles in saliva from adults with caries lesions: a case-cohort study. *Caries Research*, 48(5), 368–375. <https://doi.org/10.1159/000357502>
- Belstrøm, D. (2020). The salivary microbiota in health and disease. *Journal of Oral Microbiology*, 12(1), 1723975. <https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1723975>
- Belstrøm, D., Constancias, F., Liu, Y., Yang, L., Drautz-Moses, D. I., Schuster, S. C., Kohli, G. S., Jakobsen, T. H., Holmstrup, P., & Givskov, M. (2017). Metagenomic and metatranscriptomic analysis of saliva reveals disease-associated microbiota in patients with periodontitis and dental caries. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 3, 23. <https://doi.org/10.1038/s41522-017-0031-4>
- Belstrøm, D., Fiehn, N.-E., Nielsen, C. H., Kirkby, N., Twetman, S., Klepac-Ceraj, V., Paster, B. J., & Holmstrup, P. (2014). Differences in bacterial saliva profile between periodontitis patients and a control cohort. *Journal of Clinical Periodontology*, 41(2), 104–112. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12190>
- Belstrøm, D., Grande, M. A., Sembler-Møller, M. L., Kirkby, N., Cotton, S. L., Paster, B. J., & Holmstrup, P. (2018). Influence of periodontal treatment on subgingival and salivary microbiotas. *Journal of Periodontology*, 89(5), 531–539. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0377>
- Belstrøm, D., Holmstrup, P., Fiehn, N.-E., Kirkby, N., Kokaras, A., Paster, B. J., & Bardow, A. (2017). Salivary microbiota in individuals with different levels of caries experience. *Journal of Oral Microbiology*, 9(1), 1270614. <https://doi.org/10.1080/20002297.2016.1270614>
- Belstrøm, D., Sembler-Møller, M. L., Grande, M. A., Kirkby, N., Cotton, S. L., Paster, B. J., & Holmstrup, P. (2017). Microbial profile comparisons of saliva, pooled and site-specific subgingival samples in periodontitis patients. *PloS One*, 12(8), e0182992. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182992>
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., ... Schlöter, M. (2020, June). Microbiome definition re-visited: old

concepts and new challenges. In *Microbiome* (Vol. 8, Issue 1, p. 103). <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>

Bernardi, S., Karygianni, L., Filippi, A., Anderson, A. C., Zürcher, A., Hellwig, E., Vach, K., Macchiarelli, G., & Al-Ahmad, A. (2020). Combining culture and culture-independent methods reveals new microbial composition of halitosis patients' tongue biofilm. *MicrobiologyOpen*, 9(2), e958. <https://doi.org/10.1002/mbo3.958>

Beule, L., & Karlovsky, P. (2020). Improved normalization of species count data in ecology by scaling with ranked subsampling (SRS): application to microbial communities. *PeerJ*, 8, e9593. <https://doi.org/10.7717/peerj.9593>

Beydoun, M. A., Beydoun, H. A., Hossain, S., El-Hajj, Z. W., Weiss, J., & Zonderman, A. B. (2020). Clinical and Bacterial Markers of Periodontitis and Their Association with Incident All-Cause and Alzheimer's Disease Dementia in a Large National Survey. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 75(1), 157–172. <https://doi.org/10.3233/JAD-200064>

Bhaumik, D., Salzman, E., Davis, E., Blostein, F., Li, G., Neiswanger, K., Weyant, R. J., Crout, R., McNeil, D. W., Marazita, M. L., & Foxman, B. (2024). Plaque Microbiome in Caries-Active and Caries-Free Teeth by Dentition. *JDR Clinical and Translational Research*, 9(1), 61–71. <https://doi.org/10.1177/23800844221121260>

Bizhang, M., Ellerbrock, B., Preza, D., Raab, W., Singh, P., Beikler, T., Henrich, B., & Zimmer, S. (2011). Detection of nine microorganisms from the initial carious root lesions using a TaqMan-based real-time PCR. *Oral Diseases*, 17(7), 642–652. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2011.01815.x>

Bray, J. R., & Curtis, J. T. (1957). An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 27(4), 325–349. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/1942268>

Briana, D. D., Papaevangelou, V., & Malamitsi-Puchner, A. (2021). The jury is still out on the existence of a placental microbiome. *Acta Paediatrica* (Oslo, Norway : 1992), 110(11), 2958–2963. <https://doi.org/10.1111/apa.16048>

Brito, F., Zaltman, C., Carvalho, A. T. P., Fischer, R. G., Persson, R., Gustafsson, A., & Figueredo, C. M. S. (2013). Subgingival microflora in inflammatory bowel disease patients with untreated periodontitis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 25(2), 239–245. <https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e32835a2b70>

Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit (BMG) unter Beteiligung der Arbeitsgruppe ICD des Kuratoriums für Fragen der Klassifikation im Gesundheitswesen (KKG). ICD-10-GM Version 2023, Systematisches Verzeichnis, Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision, Vorabfassung, Stand: 16.09.2022. Köln, 2023. Website: www.bfarm.de – Kodiersysteme – Services - Downloads – ICD-10-GM – Version 2023. (abgerufen am 09.06.2023).

Byrd, A. L., Belkaid, Y., & Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. *Nature Reviews. Microbiology*, 16(3), 143–155. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157>

Byun, R., Nadkarni, M. A., Chhour, K.-L., Martin, F. E., Jacques, N. A., & Hunter, N. (2004). Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(7), 3128–3136. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.7.3128-3136.2004>

Camelo-Castillo, A., Novoa, L., Balsa-Castro, C., Blanco, J., Mira, A., & Tomás, I. (2015). Relationship between periodontitis-associated subgingival microbiota and clinical inflammation by 16S pyrosequencing. *Journal of Clinical Periodontology*, 42(12), 1074–1082. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12470>

Camelo-Castillo, A. J., Mira, A., Pico, A., Nibali, L., Henderson, B., Donos, N., & Tomas, I. (2015). Subgingival microbiota in health compared to periodontitis and the influence of smoking. *Frontiers in Microbiology*, 6, 119. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00119>

- Carrizales-Sepúlveda, E. F., Ordaz-Farías, A., Vera-Pineda, R., & Flores-Ramírez, R. (2018). Periodontal Disease, Systemic Inflammation and the Risk of Cardiovascular Disease. *Heart, Lung & Circulation*, 27(11), 1327–1334. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2018.05.102>
- Carrouel, F., Viennot, S., Santamaria, J., Veber, P., & Bourgeois, D. (2016). Quantitative Molecular Detection of 19 Major Pathogens in the Interdental Biofilm of Periodontally Healthy Young Adults. *Frontiers in Microbiology*, 7, 840. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00840>
- Castillo, D. J., Rifkin, R. F., Cowan, D. A., & Potgieter, M. (2019). The Healthy Human Blood Microbiome: Fact or Fiction? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 148. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00148>
- Caufield, P. W., Li, Y., Dasanayake, A., & Saxena, D. (2007). Diversity of lactobacilli in the oral cavities of young women with dental caries. *Caries Research*, 41(1), 2–8. <https://doi.org/10.1159/000096099>
- Caufield, P. W., Schön, C. N., Saraithong, P., Li, Y., & Argimón, S. (2015). Oral Lactobacilli and Dental Caries: A Model for Niche Adaptation in Humans. *Journal of Dental Research*, 94(9 Suppl), 110S-8S. <https://doi.org/10.1177/0022034515576052>
- Celik, Z. C., Cakiris, A., Abaci, N., Yaniikoglu, F., Ilgin, C., Ekmekci, S. S., Celik, H., & Tagtekin, D. (2021). The complex microbiome of caries-active and caries-free supragingival plaques in permanent dentition. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 24(10), 1535–1540. https://doi.org/10.4103/njcp.njcp_49_21
- Chai, X., Liu, L., & Chen, F. (2024). Oral nitrate-reducing bacteria as potential probiotics for blood pressure homeostasis. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 11, 1337281. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2024.1337281>
- Chattin, B. R., Ishihara, K., Okuda, K., Hirai, Y., & Ishikawa, T. (1999). Specific microbial colonizations in the periodontal sites of HIV-infected subjects. *Microbiology and Immunology*, 43(9), 847–852. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1999.tb01219.x>
- Chávez de Paz, L., Svensäter, G., Dahlén, G., & Bergenholtz, G. (2005). Streptococci from root canals in teeth with apical periodontitis receiving endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 100(2), 232–241. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2004.10.008>
- Chen, B.-J., Takeshita, T., Tajikara, T., Asakawa, M., Kageyama, S., Shibata, Y., Ayukawa, Y., Yano, Y., & Yamashita, Y. (2023). Butyrate as a Potential Driver of a Dysbiotic Shift of the Tongue Microbiota. *MSphere*, 8(1), e0049022. <https://doi.org/10.1128/msphere.00490-22>
- Chen, C. (1996). Distribution of a newly described species, *Kingella oralis*, in the human oral cavity. *Oral Microbiology and Immunology*, 11(6), 425–427. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302x.1996.tb00206.x>
- Chen, C. K., Wu, Y. T., & Chang, Y. C. (2017). Association between chronic periodontitis and the risk of Alzheimer's disease: a retrospective, population-based, matched-cohort study. *Alzheimer's research & therapy*, 9(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s13195-017-0282-6>
- Chen, L., Cao, H., Wu, X., Xu, X., Ji, X., Wang, B., Zhang, P., & Li, H. (2022). Effects of oral health intervention strategies on cognition and microbiota alterations in patients with mild Alzheimer's disease: A randomized controlled trial. *Geriatric Nursing (New York, N.Y.)*, 48, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.gerinurse.2022.09.005>
- Chen, L., Li, X., Liu, J., Hou, Z., Wei, Y., Chen, M., Wang, B., Cao, H., Qiu, R., Zhang, Y., Ji, X., Zhang, P., Xue, M., Qiu, L., Wang, L., & Li, H. (2024). Distinctive subgingival microbial signatures in older adults with different levels of cognitive function. *Journal of clinical periodontology*, 51(8), 1066–1080. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13997>

- Chen, L., Wang, B., Liu, J., Wu, X., Xu, X., Cao, H., Ji, X., Zhang, P., Li, X., Hou, Z., & Li, H. (2022). Different oral and gut microbial profiles in those with Alzheimer's disease consuming anti-inflammatory diets. *Frontiers in Nutrition*, 9, 974694. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.974694>
- Chen, L., Xu, X., Wu, X., Cao, H., Li, X., Hou, Z., Wang, B., Liu, J., Ji, X., Zhang, P., & Li, H. (2022). A comparison of the composition and functions of the oral and gut microbiotas in Alzheimer's patients. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 942460. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.942460>
- Chen, L., Qin, B., Du, M., Zhong, H., Xu, Q., Li, Y., Zhang, P., & Fan, M. (2015). Extensive description and comparison of human supra-gingival microbiome in root caries and health. *PloS One*, 10(2), e0117064. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117064>
- Chen, T., Yu, W. H., Izard, J., Baranova, O. V., Lakshmanan, A., & Dewhirst, F. E. (2010). The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database : The Journal of Biological Databases and Curation*, 2010, baq013. <https://doi.org/10.1093/database/baq013>
- Chen, W., Jiang, Q., Yan, G., & Yang, D. (2020). The oral microbiome and salivary proteins influence caries in children aged 6 to 8 years. *BMC Oral Health*, 20(1), 295. <https://doi.org/10.1186/s12903-020-01262-9>
- Chen, X., Lu, Y., Chen, T., & Li, R. (2021). The Female Vaginal Microbiome in Health and Bacterial Vaginosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 631972. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.631972>
- Chen, X., Hu, X., Fang, J., Sun, X., Zhu, F., Sun, Y., & Wang, Y. (2022). Association of oral microbiota profile with sugar-sweetened beverages consumption in school-aged children. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 73(1), 82–92. <https://doi.org/10.1080/09637486.2021.1913102>
- Chen, X., Daliri, E. B.-M., Chelliah, R., & Oh, D.-H. (2020). Isolation and Identification of Potentially Pathogenic Microorganisms Associated with Dental Caries in Human Teeth Biofilms. *Microorganisms*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101596>
- Cheng, F., Huang, Z., Wei, W., & Li, Z. (2021). Fecal microbiota transplantation for Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Techniques in Coloproctology*, 25(5), 495–504. <https://doi.org/10.1007/s10151-020-02395-3>
- Cho, H., Ren, Z., Divaris, K., Roach, J., Lin, B. M., Liu, C., Azcarate-Peril, M. A., Simancas-Pallares, M. A., Shrestha, P., Orlenko, A., Ginnis, J., North, K. E., Zandona, A. G. F., Ribeiro, A. A., Wu, D., & Koo, H. (2023). *Selenomonas sputigena* acts as a pathobiont mediating spatial structure and biofilm virulence in early childhood caries. *Nature Communications*, 14(1), 2919. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38346-3>
- Choi, J.-W., Kim, S.-C., Hong, S.-H., & Lee, H.-J. (2017). Secretable Small RNAs via Outer Membrane Vesicles in Periodontal Pathogens. *Journal of Dental Research*, 96(4), 458–466. <https://doi.org/10.1177/0022034516685071>
- Choi, S., Kim, K., Chang, J., Kim, S. M., Kim, S. J., Cho, H.-J., & Park, S. M. (2019). Association of Chronic Periodontitis on Alzheimer's Disease or Vascular Dementia. *Journal of the American Geriatrics Society*, 67(6), 1234–1239. <https://doi.org/10.1111/jgs.15828>
- Chrisman, B., He, C., Jung, J.-Y., Stockham, N., Paskov, K., Washington, P., & Wall, D. P. (2022). The human “contaminome”: bacterial, viral, and computational contamination in whole genome sequences from 1000 families. *Scientific Reports*, 12(1), 9863. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13269-z>
- Chugal, N., Wang, J.-K., Wang, R., He, X., Kang, M., Li, J., Zhou, X., Shi, W., & Lux, R. (2011). Molecular characterization of the microbial flora residing at the apical portion of infected root canals of human teeth. *Journal of Endodontics*, 37(10), 1359–1364. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.06.020>
- Cirstea, M. S., Kliger, D., MacLellan, A. D., Yu, A. C., Langlois, J., Fan, M., Boroomand, S., Kharazyan, F., Hsiung, R. G. Y., MacVicar, B. A., Chertkow, H., Whitehead, V., Brett Finlay, B., & Appel-

- Cresswell, S. (2022). The Oral and Fecal Microbiota in a Canadian Cohort of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 87(1), 247–258. <https://doi.org/10.3233/JAD-215520>
- Clemente, J. C., Manasson, J., & Scher, J. U. (2018). The role of the gut microbiome in systemic inflammatory disease. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 360, j5145. <https://doi.org/10.1136/bmj.j5145>
- Cockburn, A. F., Dehlin, J. M., Ngan, T., Crout, R., Boskovic, G., Denvir, J., Primerano, D., Plassman, B. L., Wu, B., & Cuff, C. F. (2012). High throughput DNA sequencing to detect differences in the subgingival plaque microbiome in elderly subjects with and without dementia. *Investigative Genetics*, 3(1), 19. <https://doi.org/10.1186/2041-2223-3-19>
- Colombo, A. P. V., Bennet, S., Cotton, S. L., Goodson, J. M., Kent, R., Haffajee, A. D., Socransky, S. S., Hasturk, H., Van Dyke, T. E., Dewhirst, F. E., & Paster, B. J. (2012). Impact of periodontal therapy on the subgingival microbiota of severe periodontitis: comparison between good responders and individuals with refractory periodontitis using the human oral microbe identification microarray. *Journal of Periodontology*, 83(10), 1279–1287. <https://doi.org/10.1902/jop.2012.110566>
- Colombo, A. P. V., Boches, S. K., Cotton, S. L., Goodson, J. M., Kent, R., Haffajee, A. D., Socransky, S. S., Hasturk, H., Van Dyke, T. E., Dewhirst, F., & Paster, B. J. (2009). Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. *Journal of Periodontology*, 80(9), 1421–1432. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.090185>
- Colombo, A. V., Silva, C. M., Haffajee, A., & Colombo, A. P. V. (2006). Identification of oral bacteria associated with crevicular epithelial cells from chronic periodontitis lesions. *Journal of Medical Microbiology*, 55(Pt 5), 609–615. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46417-0>
- Contreras, A., Doan, N., Chen, C., Rusitanonta, T., Flynn, M. J., & Slots, J. (2000). Importance of *Dialister pneumosintes* in human periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology*, 15(4), 269–272. <https://doi.org/10.1034/j.1399-302x.2000.150410.x>
- Corby, P. M., Lyons-Weiler, J., Bretz, W. A., Hart, T. C., Aas, J. A., Boumenna, T., Goss, J., Corby, A. L., Junior, H. M., Weyant, R. J., & Paster, B. J. (2005). Microbial risk indicators of early childhood caries. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), 5753–5759. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5753-5759.2005>
- Costalonga, M., & Herzberg, M. C. (2014). The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunology letters*, 162(2 Pt A), 22–38. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.08.017>
- Costello, V. H., Robinson, S. L., Klusewitz, S., Surpris, G., Nahid, M., & Backlund, M. G. (2022). Infective endocarditis due to *Haemophilus sputorum*. In *Access microbiology* (Vol. 4, Issue 12, p. acmi000410). <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000410>
- Crociani, F., Biavati, B., Alessandrini, A., Chiarini, C., & Scardovi, V. (1996). *Bifidobacterium inopinatum* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp. nov., two new species isolated from human dental caries. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(2), 564–571. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-2-564>
- Cui, X., Liu, J., Xiao, W., Chu, Y., & Ouyang, X. (2019). Subgingival microbiome in Chinese patients with generalized aggressive periodontitis compared to healthy controls. *Archives of Oral Biology*, 101, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.02.012>
- Curry, K. D., Wang, Q., Nute, M. G., Tyshaieva, A., Reeves, E., Soriano, S., Wu, Q., Graeber, E., Finzer, P., Mendling, W., Savidge, T., Villapol, S., Dilthey, A., & Treangen, T. J. (2022). Emu: species-level microbial community profiling of full-length 16S rRNA Oxford Nanopore sequencing data. *Nature Methods*, 19(7), 845–853. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01520-4>
- Curtis, M. A., Diaz, P. I., & Van Dyke, T. E. (2020). The role of the microbiota in periodontal disease. *Periodontology 2000*, 83(1), 14–25. <https://doi.org/10.1111/prd.12296>

- Da, D., Zhao, Q., Zhang, H., Wu, W., Zeng, X., Liang, X., Jiang, Y., Xiao, Z., Yu, J., Ding, S., Zheng, L., Zhang, Y., Xu, X., & Ding, D. (2023). Oral microbiome in older adults with mild cognitive impairment. *Journal of Oral Microbiology*, 15(1), 2173544. <https://doi.org/10.1080/20002297.2023.2173544>
- Dabu, B., Mironiuc-Cureu, M., Jordan, D., Szmal, C., & Dumitriu, S. (2012). Identification of four *Treponema* species in subgingival samples by nested-PCR and their correlation with clinical diagnosis. *Roumanian Archives of Microbiology and Immunology*, 71(1), 43–47.
- D'Agostino, S., Valentini, G., Iarussi, F., & Dolci, M. (2024). Effect of Probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus plantarum* on Caries and Periodontal Diseases: A Systematic Review. *Dentistry Journal*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/dj12040102>
- Darveau, R. P. (2010). Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(7), 481–490. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2337>
- Dassel, K. B., Carr, D. C., & Vitaliano, P. (2017). Does Caring for a Spouse With Dementia Accelerate Cognitive Decline? Findings From the Health and Retirement Study. *The Gerontologist*, 57(2), 319–328. <https://doi.org/10.1093/geront/gnv148>
- de Jesus, V. C., Shikder, R., Oryniak, D., Mann, K., Alamri, A., Mittermuller, B., Duan, K., Hu, P., Schroth, R. J., & Chelikani, P. (2020). Sex-Based Diverse Plaque Microbiota in Children with Severe Caries. *Journal of Dental Research*, 99(6), 703–712. <https://doi.org/10.1177/0022034520908595>
- Del Pilar Angarita-Díaz, M., Fong, C., & Medina, D. (2024). Bacteria of healthy periodontal tissues as candidates of probiotics: a systematic review. *European Journal of Medical Research*, 29(1), 328. <https://doi.org/10.1186/s40001-024-01908-2>
- Delwel, S., Binnekade, T. T., Perez, R. S. G. M., Hertogh, C. M. P. M., Scherder, E. J. A., & Lobbezoo, F. (2018). Oral hygiene and oral health in older people with dementia: a comprehensive review with focus on oral soft tissues. *Clinical oral investigations*, 22(1), 93–108. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2264-2>
- Deuschl, G., Maier, W. Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde (DGPPN) und Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN) (Stand: 28.11.2023). S3-Leitlinie "Demenzen", Version: 4.0. AWMF, register number 038-013. (abgerufen am 16.07.2024).
- Deutsche Alzheimer Gesellschaft. (2022). Inzidenz und Inzidenzrate von Demenzerkrankungen in Deutschland nach Altersgruppe im Jahr 2021. Statista. Statista GmbH. <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/328783/umfrage/inzidenz-und-inzidenzrate-von-demenzerkrankungen-in-deutschland-nach-altersgruppe/> (abgerufen am 09.06.2023).
- Di Castelnuovo, A., Quacquareuccio, G., Donati, M. B., de Gaetano, G., & Iacoviello, L. (2009). Spousal concordance for major coronary risk factors: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Epidemiology*, 169(1), 1–8. <https://doi.org/10.1093/aje/kwn234>
- Diaz, P. I., Hoare, A., & Hong, B.-Y. (2016). Subgingival Microbiome Shifts and Community Dynamics in Periodontal Diseases. *Journal of the California Dental Association*, 44(7), 421–435.
- Ding, Y., Ren, J., Yu, H., Yu, W., & Zhou, Y. (2018). *Porphyromonas gingivalis*, a periodontitis causing bacterium, induces memory impairment and age-dependent neuroinflammation in mice. *Immunity & Ageing* : I & A, 15, 6. <https://doi.org/10.1186/s12979-017-0110-7>
- Djais, A., Nakazawa, F., Sato, M., Sato, N., Sundqvist, G., & Hoshino, E. (2006). Asaccharolytic anaerobic gram-negative coccobacilli (AAGNC) isolated from infected root canals and periodontal pockets. *Oral Microbiology and Immunology*, 21(1), 28–31. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2005.00249.x>
- Doan, N., Contreras, A., Flynn, J., Slots, J., & Chen, C. (2000). Molecular identification of *Dialister pneumosintes* in subgingival plaque of humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(8), 3043–3047. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.8.3043-3047.2000>

- Dominy, S. S., Lynch, C., Ermini, F., Benedyk, M., Marczyk, A., Konradi, A., Nguyen, M., Haditsch, U., Raha, D., Griffin, C., Holsinger, L. J., Arastu-Kapur, S., Kaba, S., Lee, A., Ryder, M. I., Potempa, B., Mydel, P., Hellvard, A., Adamowicz, K., ... Potempa, J. (2019). *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Science Advances*, 5(1), eaau3333. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau3333>
- Downes, J., Sutcliffe, I. C., Booth, V., & Wade, W. G. (2007). *Prevotella maculosa* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(Pt 12), 2936–2939. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65281-0>
- Du, C., Luo, Y., Walsh, S., & Grinspan, A. (2021). Oral Fecal Microbiota Transplant Capsules Are Safe and Effective for Recurrent *Clostridioides difficile* Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 55(4), 300–308. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000001495>
- Duan, D., Scofield, J. A., Zhou, X., & Wu, H. (2016). Fine-tuned production of hydrogen peroxide promotes biofilm formation of *Streptococcus parasanguinis* by a pathogenic cohabitant *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Environmental Microbiology*, 18(11), 4023–4036. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13425>
- Duan, X., Wu, T., Xu, X., Chen, D., Mo, A., Lei, Y., Cheng, L., Man, Y., Zhou, X., Wang, Y., & Yuan, Q. (2017). Smoking May Lead to Marginal Bone Loss Around Non-Submerged Implants During Bone Healing by Altering Salivary Microbiome: A Prospective Study. *Journal of Periodontology*, 88(12), 1297–1308. <https://doi.org/10.1902/jop.2017.160808>
- Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., Hampel, H., Molinuevo, J. L., Blennow, K., DeKosky, S. T., Gauthier, S., Selkoe, D., Bateman, R., Cappa, S., Crutch, S., Engelborghs, S., Frisoni, G. B., Fox, N. C., Galasko, D., Habert, M.-O., Jicha, G. A., Nordberg, A., ... Cummings, J. L. (2014). Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *The Lancet. Neurology*, 13(6), 614–629. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70090-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70090-0)
- Durazzi, F., Sala, C., Castellani, G., Manfreda, G., Remondini, D., & De Cesare, A. (2021). Comparison between 16S rRNA and shotgun sequencing data for the taxonomic characterization of the gut microbiota. *Scientific Reports*, 11(1), 3030. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82726-y>
- Egan, M. F., Kost, J., Tariot, P. N., Aisen, P. S., Cummings, J. L., Vellas, B., Sur, C., Mukai, Y., Voss, T., Furtek, C., Mahoney, E., Harper Mozley, L., Vandenberghe, R., Mo, Y., & Michelson, D. (2018). Randomized Trial of Verubecestat for Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. *The New England Journal of Medicine*, 378(18), 1691–1703. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706441>
- Eke, P. I., Thornton-Evans, G. O., Wei, L., Borgnakke, W. S., Dye, B. A., & Genco, R. J. (2018). Periodontitis in US Adults: National Health and Nutrition Examination Survey 2009-2014. *Journal of the American Dental Association* (1939), 149(7), 576-588.e6. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2018.04.023>
- Elashiry, M., Carroll, A., Yuan, J., Liu, Y., Hamrick, M., Cutler, C. W., Wang, Q., & Elsayed, R. (2024). Oral Microbially-Induced Small Extracellular Vesicles Cross the Blood-Brain Barrier. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(8). <https://doi.org/10.3390/ijms25084509>
- Elayoubi, J., Nelson, M. E., Mu, C. X., Haley, W. E., Wadley, V. G., Clay, O. J., Crowe, M., Cushman, M., Grant, J. S., Roth, D. L., & Andel, R. (2023). The role of caregiving in cognitive function and change: The REGARDS study. *Psychology and Aging*, 38(7), 712–724. <https://doi.org/10.1037/pag0000766>
- Ellett, F., Kacamak, N. I., Alvarez, C. R., Oliveira, E. H. S., Hasturk, H., Paster, B. J., Kantarci, A., & Irimia, D. (2023). *Fusobacterium nucleatum* dissemination by neutrophils. *Journal of Oral Microbiology*, 15(1), 2217067. <https://doi.org/10.1080/20002297.2023.2217067>
- Ene, A., Stegman, N., Wolfe, A., & Putonti, C. (2022). Genomic insights into *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus paragasseri*. *PeerJ*, 10, e13479. <https://doi.org/10.7717/peerj.13479>

- Fan, L., Mao, C., Hu, X., Zhang, S., Yang, Z., Hu, Z., Sun, H., Fan, Y., Dong, Y., Yang, J., Shi, C., & Xu, Y. (2019). New Insights Into the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neurology*, 10, 1312. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.01312>
- Fan, X., Monson, K. R., Peters, B. A., Whittington, J. M., Um, C. Y., Oberstein, P. E., McCullough, M. L., Freedman, N. D., Huang, W.-Y., Ahn, J., & Hayes, R. B. (2024). Altered salivary microbiota associated with high-sugar beverage consumption. *Scientific Reports*, 14(1), 13386. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-64324-w>
- Fang, H., Fu, L., & Wang, J. (2018). Protocol for Fecal Microbiota Transplantation in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BioMed Research International*, 2018, 8941340. <https://doi.org/10.1155/2018/8941340>
- Fatahi-Bafghi, M. (2021). Characterization of the *Rothia* spp. and their role in human clinical infections. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 93, 104877. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104877>
- Faveri, M., Mayer, M. P. A., Feres, M., de Figueiredo, L. C., Dewhirst, F. E., & Paster, B. J. (2008). Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. *Oral Microbiology and Immunology*, 23(2), 112–118. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00397.x>
- Faveri, M., Feres, M., Shibli, J. A., Hayacibara, R. F., Hayacibara, M. M., & de Figueiredo, L. C. (2006). Microbiota of the dorsum of the tongue after plaque accumulation: an experimental study in humans. *Journal of Periodontology*, 77(9), 1539–1546. <https://doi.org/10.1902/jop.2006.050366>
- Feng, J., Liu, J., Jiang, M., Chen, Q., Zhang, Y., Yang, M., & Zhai, Y. (2023). The Role of Oral Nitrate-Reducing Bacteria in the Prevention of Caries: A Review Related to Caries and Nitrate Metabolism. *Caries Research*, 57(2), 119–132. <https://doi.org/10.1159/000529162>
- Ferraro, C. T. L., Gornic, C., Barbosa, A. S., Peixoto, R. J. M., & Colombo, A. P. V. (2007). Detection of *Dialister pneumosintes* in the subgingival biofilm of subjects with periodontal disease. *Anaerobe*, 13(5–6), 244–248. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2007.09.002>
- Ferreira, D. C., Rôças, I. N., Paiva, S. S. M., Carmo, F. L., Cavalcante, F. S., Rosado, A. S., Santos, K. R. N., & Siqueira, J. F. J. (2011). Viral-bacterial associations in acute apical abscesses. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 112(2), 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2011.01.029>
- Fine, D. H., Markowitz, K., Fairlie, K., Tischio-Bereski, D., Ferrendiz, J., Furgang, D., Paster, B. J., & Dewhirst, F. E. (2013). A consortium of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Streptococcus parasanguinis*, and *Filifactor alocis* is present in sites prior to bone loss in a longitudinal study of localized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(9), 2850–2861. <https://doi.org/10.1128/JCM.00729-13>
- Fisher, L. E., & Russell, R. R. (1993). The isolation and characterization of milleri group streptococci from dental periapical abscesses. *Journal of Dental Research*, 72(8), 1191–1193. <https://doi.org/10.1177/00220345930720080501>
- Fleury, V., Zekeridou, A., Lazarevic, V., Gaïa, N., Giannopoulou, C., Genton, L., Cancela, J., Girard, M., Goldstein, R., Bally, J. F., Mombelli, A., Schrenzel, J., & Burkhard, P. R. (2021). Oral Dysbiosis and Inflammation in Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's disease*, 11(2), 619–631. <https://doi.org/10.3233/JPD-202459>
- Fogelholm, N., Leskelä, J., Manzoor, M., Holmer, J., Paju, S., Hiltunen, K., Roitto, H.-M., Saarela, R. K., Pitkälä, K., Eriksdotter, M., Buhlin, K., Pussinen, P. J., & Mäntylä, P. (2023). Subgingival microbiome at different levels of cognition. *Journal of Oral Microbiology*, 15(1), 2178765. <https://doi.org/10.1080/20002297.2023.2178765>
- Forest, N. (1979). [Characterization of *Mycoplasma salivarium* in periodontal diseases]. *Journal de biologie buccale*, 7(4), 321–330.

- Fouad, A. F., Kum, K.-Y., Clawson, M. L., Barry, J., Abenoja, C., Zhu, Q., Caimano, M., & Radolf, J. D. (2003). Molecular characterization of the presence of *Eubacterium* spp and *Streptococcus* spp in endodontic infections. *Oral Microbiology and Immunology*, 18(4), 249–255. <https://doi.org/10.1034/j.1399-302x.2003.00077.x>
- Fu, K. L., Chiu, M. J., Wara-Aswapati, N., Yang, C. N., Chang, L. C., Guo, Y. L., Ni, Y. H., & Chen, Y. W. (2023). Oral microbiome and serological analyses on association of Alzheimer's disease and periodontitis. *Oral diseases*, 29(8), 3677–3687. <https://doi.org/10.1111/odi.14348>
- Gallardo, G., & Holtzman, D. M. (2019). Amyloid- β and Tau at the Crossroads of Alzheimer's Disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1184, 187–203. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9358-8_16
- Gambin, D. J., Vitali, F. C., Casanova, K. A. S., DE Carli, J. P., Mazzon, R. R., Gomes, B. P. F. de A., Trentin, M. S., & Duque, T. M. (2024). Prevalence of species of yellow, purple and green microbial complexes in endo-perio lesions: a systematic review. *Brazilian Oral Research*, 38, e048. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2024.vol38.0048>
- Gao, Y., Liu, J., Xu, Z., Wu, T., Zhang, E., Li, K., Yang, J., Liu, W., & Sun, X. (2024). SoftCLIP: Softer Cross-Modal Alignment Makes CLIP Stronger. *Proceedings of the AAAI Conference on Artificial Intelligence*, 38(3), 1860–1868. <https://doi.org/10.1609/aaai.v38i3.27955>
- Garcia, B. A., Acosta, N. C., Tomar, S. L., Roesch, L. F. W., Lemos, J. A., Mugayar, L. R. F., & Abranches, J. (2021). Association of *Candida albicans* and Cbp(+) *Streptococcus mutans* with early childhood caries recurrence. *Scientific Reports*, 11(1), 10802. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90198-3>
- Gaugler, J., James, B., Johnson, T., Scholz, K., & Weuve, J. (2016). 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's and Dementia*, 12(4):459-509. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.03.001>
- George, N., Flamiatos, E., Kawasaki, K., Kim, N., Carriere, C., Phan, B., Joseph, R., Strauss, S., Kohli, R., Choi, D., Baumgartner, J. C., Sedgley, C., Maier, T., & Machida, C. A. (2016). Oral microbiota species in acute apical endodontic abscesses. *Journal of Oral Microbiology*, 8, 30989. <https://doi.org/10.3402/jom.v8.30989>
- Ghayoumi, N., Chen, C., & Slots, J. (2002). *Dialister pneumosintes*, a new putative periodontal pathogen. *Journal of Periodontal Research*, 37(1), 75–78. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0765.2002.05019.x>
- Giacomini, J. J., Torres-Morales, J., Dewhirst, F. E., Borisy, G. G., & Mark Welch, J. L. (2023). Site Specialization of Human Oral Veillonella Species. *Microbiology Spectrum*, 11(1), e0404222. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04042-22>
- Giacomini, J. J., Torres-Morales, J., Tang, J., Dewhirst, F. E., Borisy, G. G., & Mark Welch, J. L. (2024). Spatial ecology of *Haemophilus* and *Aggregatibacter* in the human oral cavity. *Microbiology Spectrum*, 12(4), e0401723. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04017-23>
- Gilbert, J. A., Blaser, M. J., Caporaso, J. G., Jansson, J. K., Lynch, S. V., & Knight, R. (2018). Current understanding of the human microbiome. *Nature Medicine*, 24(4), 392–400. <https://doi.org/10.1038/nm.4517>
- Gil-Montoya, J. A., Barrios, R., Santana, S., Sanchez-Lara, I., Pardo, C. C., Fornieles-Rubio, F., Montes, J., Ramírez, C., González-Moles, M. A., & Burgos, J. S. (2017). Association Between Periodontitis and Amyloid β Peptide in Elderly People With and Without Cognitive Impairment. *Journal of periodontology*, 88(10), 1051–1058. <https://doi.org/10.1902/jop.2017.170071>
- Gomes, B. P. F. A., Endo, M. S., & Martinho, F. C. (2012). Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. *Journal of Endodontics*, 38(8), 1082–1086. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.04.021>
- Gomes, B. P. F. A., Louzada, L. M., Almeida-Gomes, R. F., Pinheiro, E. T., Sousa, E. L. R., Jacinto, R. C., & Arruda-Vasconcelos, R. (2020). Investigation of Filifactor alocis in primary and in secondary

endodontic infections: A molecular study. *Archives of Oral Biology*, 118, 104826.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104826>

Gonçalves, C., Soares, G. M. S., Faveri, M., Pérez-Chaparro, P. J., Lobão, E., Figueiredo, L. C., Baccelli, G. T., & Feres, M. (2016). Association of three putative periodontal pathogens with chronic periodontitis in Brazilian subjects. *Journal of Applied Oral Science : Revista FOB*, 24(2), 181–185.
<https://doi.org/10.1590/1678-775720150445>

Gong, T., Chen, Q., Mao, H., Zhang, Y., Ren, H., Xu, M., Chen, H., & Yang, D. (2022). Outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* trigger NLRP3 inflammasome and induce neuroinflammation, tau phosphorylation, and memory dysfunction in mice. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 925435. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.925435>

GOWER, J. C. (1966). Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika*, 53(3–4), 325–338. <https://doi.org/10.1093/biomet/53.3-4.325>

Grabe, H. J., Schwahn, C., Volzke, H., Spitzer, C., Freyberger, H. J., John, U., Mundt, T., Biffar, R., & Kocher, T. (2009). Tooth loss and cognitive impairment. *Journal of Clinical Periodontology*, 36(7), 550–557. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2009.01426.x>

Grenier, D. (2013). *Porphyromonas gingivalis* Outer Membrane Vesicles Mediate Coaggregation and Piggybacking of *Treponema denticola* and *Lachnospirillum buccium*. *International Journal of Dentistry*, 2013, 305476. <https://doi.org/10.1155/2013/305476>

Grier, A., Myers, J. A., O'Connor, T. G., Quivey, R. G., Gill, S. R., & Kopycka-Kedzierawski, D. T. (2021). Oral Microbiota Composition Predicts Early Childhood Caries Onset. *Journal of Dental Research*, 100(6), 599–607. <https://doi.org/10.1177/0022034520979926>

Groß, K., Sahin, D., Kohns Vasconcelos, M., Pfeffer, K., Schwarz, F., & Henrich, B. (2022). Simultaneous presence of *Mycoplasma salivarium* and *Tannerella forsythia* in the implant sulcus after lateral augmentation with autogenous root grafts is associated with increased sulcus probing depth. *PloS One*, 17(7), e0270962. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270962>

Guo, H., Li, B., Yao, H., Liu, D., Chen, R., Zhou, S., Ji, Y., Zeng, L., & Du, M. (2023). Profiling the oral microbiomes in patients with Alzheimer's disease. *Oral Diseases*, 29(3), 1341–1355.
<https://doi.org/10.1111/odi.14110>

Guo, M., Wu, J., Hung, W., Sun, Z., Zhao, W., Lan, H., Zhao, Z., Wuri, G., Fang, B., Zhao, L., & Zhang, M. (2023). *Lactobacillus paracasei* ET-22 Suppresses Dental Caries by Regulating Microbiota of Dental Plaques and Inhibiting Biofilm Formation. *Nutrients*, 15(15). <https://doi.org/10.3390/nu15153316>

Hajishengallis, G., & Lamont, R. J. (2012). Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Molecular oral microbiology*, 27(6), 409–419. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2012.00663.x>

Hajishengallis, G., Darveau, R. P., & Curtis, M. A. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nature Reviews. Microbiology*, 10(10), 717–725. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2873>

Hajishengallis, G., Liang, S., Payne, M. A., Hashim, A., Jotwani, R., Eskandari, M. A., McIntosh, M. L., Alsam, A., Kirkwood, K. L., Lambris, J. D., Darveau, R. P., & Curtis, M. A. (2011). Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host & Microbe*, 10(5), 497–506. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.10.006>

Hampel, H., Mesulam, M.-M., Cuello, A. C., Khachaturian, A. S., Vergallo, A., Farlow, M. R., Snyder, P. J., Giacobini, E., & Khachaturian, Z. S. (2019). Revisiting the Cholinergic Hypothesis in Alzheimer's Disease: Emerging Evidence from Translational and Clinical Research. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, 6(1), 2–15. <https://doi.org/10.14283/jpad.2018.43>

Hampel, H., Mesulam, M.-M., Cuello, A. C., Farlow, M. R., Giacobini, E., Grossberg, G. T., Khachaturian, A. S., Vergallo, A., Cavado, E., Snyder, P. J., & Khachaturian, Z. S. (2018). The

- cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain : A Journal of Neurology*, 141(7), 1917–1933. <https://doi.org/10.1093/brain/awy132>
- Hansen, T. H., Kern, T., Bak, E. G., Kashani, A., Allin, K. H., Nielsen, T., Hansen, T., & Pedersen, O. (2018). Impact of a vegan diet on the human salivary microbiota. *Scientific Reports*, 8(1), 5847. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24207-3>
- Havsted, K., Stensson, M., Jansson, H., Carda-Diéguez, M., Pedersen, A., Neilands, J., Svensäter, G., & Mira, A. (2021). Bacterial Composition and Metabolomics of Dental Plaque From Adolescents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 716493. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.716493>
- Hayashi, K., Hasegawa, Y., Takemoto, Y., Cao, C., Takeya, H., Komohara, Y., Mukasa, A., & Kim-Mitsuyama, S. (2019). Continuous intracerebroventricular injection of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide induces systemic organ dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology*, 120, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.02.007>
- Hayes, W., & Sahu, S. (2020). The Human Microbiome: History and Future. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences : A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques*, 23, 404–411. <https://doi.org/10.18433/jpps31525>
- He, J., Tu, Q., Ge, Y., Qin, Y., Cui, B., Hu, X., Wang, Y., Deng, Y., Wang, K., Van Nostrand, J. D., Li, J., Zhou, J., Li, Y., & Zhou, X. (2018). Taxonomic and Functional Analyses of the Supragingival Microbiome from Caries-Affected and Caries-Free Hosts. *Microbial Ecology*, 75(2), 543–554. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1056-1>
- Hedberg, M. E., Moore, E. R. B., Svensson-Stadler, L., Hörstedt, P., Baranov, V., Hernell, O., Wai, S. N., Hammarström, S., & Hammarström, M.-L. (2012). *Lachnoanaerobaculum* gen. nov., a new genus in the Lachnospiraceae: characterization of *Lachnoanaerobaculum umeaense* gen. nov., sp. nov., isolated from the human small intestine, and *Lachnoanaerobaculum orale* sp. nov., isolated from saliva, and reclassifi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(Pt 11), 2685–2690. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.033613-0>
- Heller, D., Silva-Boghossian, C. M., do Souto, R. M., & Colombo, A. P. V. (2012). Subgingival microbial profiles of generalized aggressive and chronic periodontal diseases. *Archives of Oral Biology*, 57(7), 973–980. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.02.003>
- Henne, K., Rheinberg, A., Melzer-Krick, B., & Conrads, G. (2015). Aciduric microbial taxa including *Scardovia wiggsiae* and *Bifidobacterium* spp. in caries and caries free subjects. *Anaerobe*, 35(Pt A), 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.011>
- Henriques, L. C. F., de Brito, L. C. N., Tavares, W. L. F., Teles, R. P., Vieira, L. Q., Teles, F. R., & Sobrinho, A. P. R. (2016). Microbial Ecosystem Analysis in Root Canal Infections Refractory to Endodontic Treatment. *Journal of Endodontics*, 42(8), 1239–1245. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.05.014>
- Herrero, E. R., Slomka, V., Bernaerts, K., Boon, N., Hernandez-Sanabria, E., Passoni, B. B., Quirynen, M., & Teughels, W. (2016). Antimicrobial effects of commensal oral species are regulated by environmental factors. *Journal of Dentistry*, 47, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.02.007>
- Hiranmayi, K. V., Sirisha, K., Ramoji Rao, M. V., & Sudhakar, P. (2017). Novel Pathogens in Periodontal Microbiology. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 9(3), 155–163. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_288_16
- Holmer, J., Aho, V., Eriksdotter, M., Paulin, L., Pietiäinen, M., Auvinen, P., Schultzberg, M., Pussinen, P. J., & Buhlin, K. (2021). Subgingival microbiota in a population with and without cognitive dysfunction. *Journal of Oral Microbiology*, 13(1), 1854552. <https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1854552>

- Holt, S. C., Ebersole, J., Felton, J., Brunsvold, M., & Kornman, K. S. (1988). Implantation of *Bacteroides gingivalis* in nonhuman primates initiates progression of periodontitis. *Science (New York, N.Y.)*, 239(4835), 55–57. <https://doi.org/10.1126/science.3336774>
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, 82(11), 801–811. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
- Huang, X., Browngardt, C. M., Jiang, M., Ahn, S.-J., Burne, R. A., & Nascimento, M. M. (2018). Diversity in Antagonistic Interactions between Commensal Oral Streptococci and *Streptococcus mutans*. *Caries Research*, 52(1–2), 88–101. <https://doi.org/10.1159/000479091>
- Huang, X., Palmer, S. R., Ahn, S.-J., Richards, V. P., Williams, M. L., Nascimento, M. M., & Burne, R. A. (2016). A Highly Arginolytic *Streptococcus* Species That Potently Antagonizes *Streptococcus mutans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(7), 2187–2201. <https://doi.org/10.1128/AEM.03887-15>
- Huffines, J. T., & Scofield, J. A. (2020). Disruption of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergy by a commensal streptococcus. *Scientific Reports*, 10(1), 19661. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76744-5>
- Hutter, G., Schlagenhaut, U., Valenza, G., Horn, M., Burgemeister, S., Claus, H., & Vogel, U. (2003). Molecular analysis of bacteria in periodontitis: evaluation of clone libraries, novel phylotypes and putative pathogens. *Microbiology (Reading, England)*, 149(Pt 1), 67–75. <https://doi.org/10.1099/mic.0.25791-0>
- Ikeda, E., Shiba, T., Ikeda, Y., Suda, W., Nakasato, A., Takeuchi, Y., Azuma, M., Hattori, M., & Izumi, Y. (2020). Japanese subgingival microbiota in health vs disease and their roles in predicted functions associated with periodontitis. *Odontology*, 108(2), 280–291. <https://doi.org/10.1007/s10266-019-00452-4>
- Ilievski, V., Zuchowska, P. K., Green, S. J., Toth, P. T., Ragozzino, M. E., Le, K., Aljewari, H. W., O'Brien-Simpson, N. M., Reynolds, E. C., & Watanabe, K. (2018). Chronic oral application of a periodontal pathogen results in brain inflammation, neurodegeneration and amyloid beta production in wild type mice. *PloS one*, 13(10), e0204941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204941>
- Ishida, N., Ishihara, Y., Ishida, K., Tada, H., Funaki-Kato, Y., Hagiwara, M., Ferdous, T., Abdullah, M., Mitani, A., Michikawa, M., & Matsushita, K. (2017). Periodontitis induced by bacterial infection exacerbates features of Alzheimer's disease in transgenic mice. *NPJ Aging and Mechanisms of Disease*, 3, 15. <https://doi.org/10.1038/s41514-017-0015-x>
- Issilbayeva, A., Kaiyrykyzy, A., Vinogradova, E., Jarmukhanov, Z., Kozhakhmetov, S., Kassenova, A., Nurgazyev, M., Mukhanbetzhanov, N., Alzhanova, D., Zholdasbekova, G., Askarova, S., & Kushugulova, A. R. (2024). Oral Microbiome Stamp in Alzheimer's Disease. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 13(3). <https://doi.org/10.3390/pathogens13030195>
- Iwasaki, M., Kimura, Y., Ogawa, H., Yamaga, T., Ansai, T., Wada, T., Sakamoto, R., Ishimoto, Y., Fujisawa, M., Okumiya, K., Miyazaki, H., & Matsubayashi, K. (2019). Periodontitis, periodontal inflammation, and mild cognitive impairment: A 5-year cohort study. *Journal of periodontal research*, 54(3), 233–240. <https://doi.org/10.1111/jre.12623>
- Jacinto, R. C., Gomes, B. P. F. A., Desai, M., Rajendram, D., & Shah, H. N. (2007). Bacterial examination of endodontic infections by clonal analysis in concert with denaturing high-performance liquid chromatography. *Oral Microbiology and Immunology*, 22(6), 403–410. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00378.x>
- Jentsch, H., Rodloff, A. C., Gerweck, M. K., & Stingu, C.-S. (2021). Streptococci in the Subgingival Biofilm and Periodontal Therapy. *Oral Health & Preventive Dentistry*, 19, 25–31. <https://doi.org/10.3290/j.ohpd.b875517>
- Ji, S., Kook, J.-K., Park, S.-N., Lim, Y. K., Choi, G. H., & Jung, J.-S. (2023). Characteristics of the Salivary Microbiota in Periodontal Diseases and Potential Roles of Individual Bacterial Species To

Predict the Severity of Periodontal Disease. *Microbiology Spectrum*, 11(3), e0432722.
<https://doi.org/10.1128/spectrum.04327-22>

Jiang, S., Gao, X., Jin, L., & Lo, E. C. M. (2016). Salivary Microbiome Diversity in Caries-Free and Caries-Affected Children. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12).
<https://doi.org/10.3390/ijms17121978>

Johansson, I., Witkowska, E., Kaveh, B., Lif Holgersson, P., & Tanner, A. C. R. (2016). The Microbiome in Populations with a Low and High Prevalence of Caries. *Journal of Dental Research*, 95(1), 80–86.
<https://doi.org/10.1177/0022034515609554>

Jumas-Bilak, E., Jean-Pierre, H., Carlier, J.-P., Teyssier, C., Bernard, K., Gay, B., Campos, J., Morio, F., & Marchandin, H. (2005). *Dialister microaerophilus* sp. nov. and *Dialister propionificiens* sp. nov., isolated from human clinical samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(Pt 6), 2471–2478. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63715-0>

Jung, I. Y., Choi, B., Kum, K. Y., Yoo, Y. J., Yoon, T. C., Lee, S. J., & Lee, C. Y. (2001). Identification of oral spirochetes at the species level and their association with other bacteria in endodontic infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 92(3), 329–334.
<https://doi.org/10.1067/moe.2001.117263>

Kamer, A. R., Pirraglia, E., Tsui, W., Rusinek, H., Vallabhajosula, S., Mosconi, L., Yi, L., McHugh, P., Craig, R. G., Svetcov, S., Linker, R., Shi, C., Glodzik, L., Williams, S., Corby, P., Saxena, D., & de Leon, M. J. (2015). Periodontal disease associates with higher brain amyloid load in normal elderly. *Neurobiology of aging*, 36(2), 627–633. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.10.038>

Kamer, A. R., Craig, R. G., Pirraglia, E., Dasanayake, A. P., Norman, R. G., Boylan, R. J., Nehorayoff, A., Glodzik, L., Brys, M., & de Leon, M. J. (2009). TNF-alpha and antibodies to periodontal bacteria discriminate between Alzheimer's disease patients and normal subjects. *Journal of Neuroimmunology*, 216(1–2), 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.08.013>

Kanasi, E., Johansson, I., Lu, S. C., Kressin, N. R., Nunn, M. E., Kent, R. J., & Tanner, A. C. R. (2010). Microbial risk markers for childhood caries in pediatricians' offices. *Journal of Dental Research*, 89(4), 378–383. <https://doi.org/10.1177/0022034509360010>

Kaul, A., Mandal, S., Davidov, O., & Peddada, S. D. (2017). Analysis of Microbiome Data in the Presence of Excess Zeros. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2114. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02114>

Kaye, E. K., Valencia, A., Baba, N., Spiro, A. 3rd, Dietrich, T., & Garcia, R. I. (2010). Tooth loss and periodontal disease predict poor cognitive function in older men. *Journal of the American Geriatrics Society*, 58(4), 713–718. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2010.02788.x>

Kazemtabrizi, A., Haddadi, A., Shavandi, M., & Harzandi, N. (2020). Metagenomic investigation of bacteria associated with dental lesions: a cross-sectional study. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*, 25(2), e240–e251. <https://doi.org/10.4317/medoral.23326>

Kazor, C. E., Mitchell, P. M., Lee, A. M., Stokes, L. N., Loesche, W. J., Dewhirst, F. E., & Paster, B. J. (2003). Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(2), 558–563. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.2.558-563.2003>

Kesim, B., Ülger, S. T., Aslan, G., Cudal, H., Üstün, Y., & Küçük, M. Ö. (2023). Amplicon-based next-generation sequencing for comparative analysis of root canal microbiome of teeth with primary and persistent/secondary endodontic infections. *Clinical Oral Investigations*, 27(3), 995–1004.
<https://doi.org/10.1007/s00784-023-04882-x>

Kianoush, N., Adler, C. J., Nguyen, K.-A. T., Browne, G. V., Simonian, M., & Hunter, N. (2014). Bacterial profile of dentine caries and the impact of pH on bacterial population diversity. *PloS One*, 9(3), e92940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092940>

- Kim, H.-J., Ahn, D.-H., Yu, Y., Han, H., Kim, S. Y., Joo, J.-Y., Chung, J., Na, H. S., & Lee, J.-Y. (2023). Microbial profiling of peri-implantitis compared to the periodontal microbiota in health and disease using 16S rRNA sequencing. *Journal of Periodontal & Implant Science*, 53(1), 69–84. <https://doi.org/10.5051/jpis.2202080104>
- Kim, M.-S., Kim, Y., Choi, H., Kim, W., Park, S., Lee, D., Kim, D. K., Kim, H. J., Choi, H., Hyun, D.-W., Lee, J.-Y., Choi, E. Y., Lee, D.-S., Bae, J.-W., & Mook-Jung, I. (2020). Transfer of a healthy microbiota reduces amyloid and tau pathology in an Alzheimer's disease animal model. *Gut*, 69(2), 283–294. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317431>
- Kim, N., Ma, J., Kim, W., Kim, J., Belenky, P., & Lee, I. (2024). Genome-resolved metagenomics: a game changer for microbiome medicine. *Experimental & Molecular Medicine*, 56(7), 1501–1512. <https://doi.org/10.1038/s12276-024-01262-7>
- Kinashi, Y., & Hase, K. (2021). Partners in Leaky Gut Syndrome: Intestinal Dysbiosis and Autoimmunity. *Frontiers in Immunology*, 12, 673708. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.673708>
- Kistler, J. O., Booth, V., Bradshaw, D. J., & Wade, W. G. (2013). Bacterial community development in experimental gingivitis. *PloS One*, 8(8), e71227. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071227>
- Kebschull, M. Deutsche Gesellschaft für Parodontologie (DG PARO), Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK) und andere (2020). S3-Leitlinie “Die Behandlung von Parodontitis Stadium I bis III, Die deutsche Implementierung der S3-Leitlinie „Treatment of Stage I–III Periodontitis“ der European Federation of Periodontology (EFP)”. AWMF, register number 083-043 (abgerufen am 15.06.2023).
- Kneist, S., Schmidt, F., Callaway, A., Willershausen, B., Rupf, S., Wicht, M., & Thiede, B. (2010). Diversity of *Lactobacillus* species in deep carious lesions of primary molars. *European Archives of Paediatric Dentistry : Official Journal of the European Academy of Paediatric Dentistry*, 11(4), 181–186. <https://doi.org/10.1007/BF03262741>
- Ko, Y., Lee, E.-M., Park, J. C., Gu, M. B., Bak, S., & Ji, S. (2020). Salivary microbiota in periodontal health and disease and their changes following nonsurgical periodontal treatment. *Journal of Periodontal & Implant Science*, 50(3), 171–182. <https://doi.org/10.5051/jpis.2020.50.3.171>
- Kolenbrander, P. E., Andersen, R. N., & Moore, L. V. (1989). Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas sputigena* with strains from 11 genera of oral bacteria. *Infection and Immunity*, 57(10), 3194–3203. <https://doi.org/10.1128/iai.57.10.3194-3203.1989>
- Köll, P., Mändar, R., Marcotte, H., Leibur, E., Mikelsaar, M., & Hammarström, L. (2008). Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. *Oral Microbiology and Immunology*, 23(2), 139–147. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00402.x>
- Köll-Klais, P., Mändar, R., Leibur, E., Marcotte, H., Hammarström, L., & Mikelsaar, M. (2005). Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. *Oral Microbiology and Immunology*, 20(6), 354–361. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2005.00239.x>
- Könönen, E., Fteita, D., Gursoy, U. K., & Gursoy, M. (2022). *Prevotella* species as oral residents and infectious agents with potential impact on systemic conditions. *Journal of Oral Microbiology*, 14(1), 2079814. <https://doi.org/10.1080/20002297.2022.2079814>
- Kotecha, A. M., Correa, A. D. C., Fisher, K. M., & Rushworth, J. V. (2018). Olfactory Dysfunction as a Global Biomarker for Sniffing out Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis. *Biosensors*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/bios8020041>
- Kotrashetti, V. S., Bhat, K. G., Kugaji, M. S., Naik, S. S., & Tanakanti, P. (2023). Simultaneous detection and evaluation of *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella loeschei*, and *Prevotella melaninogenica* in subgingival plaque samples of chronic periodontitis and healthy individuals

through multiplex polymerase chain r. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 27(3), 283–289. https://doi.org/10.4103/jisp.jisp_154_22

Kumpitsch, C., Koskinen, K., Schöpf, V., & Moissl-Eichinger, C. (2019). The microbiome of the upper respiratory tract in health and disease. *BMC Biology*, 17(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0703-z>

Lafaurie, G. I., Castillo, D. M., Iniesta, M., Sanz, M., Gómez, L. A., Castillo, Y., Pianeta, R., Delgadillo, N. A., Neuta, Y., Diaz-Báez, D., & Herrera, D. (2023). Differential analysis of culturable and unculturable subgingival target microorganisms according to the stages of periodontitis. *Clinical Oral Investigations*, 27(6), 3029–3043. <https://doi.org/10.1007/s00784-023-04907-5>

Lafaurie, G. I., Neuta, Y., Ríos, R., Pacheco-Montealegre, M., Pianeta, R., Castillo, D. M., Herrera, D., Reyes, J., Diaz, L., Castillo, Y., Sanz, M., & Iniesta, M. (2022). Differences in the subgingival microbiome according to stage of periodontitis: A comparison of two geographic regions. *PloS One*, 17(8), e0273523. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273523>

Lai, C. H., Listgarten, M. A., Evian, C. I., & Dougherty, P. (1986). Serum IgA and IgG antibodies to *Treponema vincentii* and *Treponema denticola* in adult periodontitis, juvenile periodontitis and periodontally healthy subjects. *Journal of Clinical Periodontology*, 13(8), 752–757. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1986.tb00878.x>

Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., & Pace, N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(20), 6955–6959. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.6955>

Lange, D. E., Plagmann, H. C., Eenboom, A., & Promesberger, A. (1977). [Clinical methods for the objective evaluation of oral hygiene]. *Deutsche zahnärztliche Zeitschrift*, 32(1), 44–47.

Ledder, R. G., Gilbert, P., Huws, S. A., Aarons, L., Ashley, M. P., Hull, P. S., & McBain, A. J. (2007). Molecular analysis of the subgingival microbiota in health and disease. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(2), 516–523. <https://doi.org/10.1128/AEM.01419-06>

Lee, C.-T., Li, R., Zhu, L., Tribble, G. D., Zheng, W. J., Ferguson, B., Maddipati, K. R., Angelov, N., & Van Dyke, T. E. (2021). Subgingival Microbiome and Specialized Pro-Resolving Lipid Mediator Pathway Profiles Are Correlated in Periodontal Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 12, 691216. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.691216>

Lee, L.-W., Lee, Y.-L., Hsiao, S.-H., & Lin, H.-P. (2017). Bacteria in the apical root canals of teeth with apical periodontitis. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi*, 116(6), 448–456. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2016.08.010>

Lee, Y. L., Hu, H. Y., Huang, L. Y., Chou, P., & Chu, D. (2017). Periodontal Disease Associated with Higher Risk of Dementia: Population-Based Cohort Study in Taiwan. *Journal of the American Geriatrics Society*, 65(9), 1975–1980. <https://doi.org/10.1111/jgs.14944>

Lee, Y. T., Lee, H. C., Hu, C. J., Huang, L. K., Chao, S. P., Lin, C. P., Su, E. C., Lee, Y. C., & Chen, C. C. (2017). Periodontitis as a Modifiable Risk Factor for Dementia: A Nationwide Population-Based Cohort Study. *Journal of the American Geriatrics Society*, 65(2), 301–305. <https://doi.org/10.1111/jgs.14449>

Leira, Y., Carballo, Á., Orlandi, M., Aldrey, J. M., Pías-Peleteiro, J. M., Moreno, F., Vázquez-Vázquez, L., Campos, F., D'Aiuto, F., Castillo, J., Sobrino, T., & Blanco, J. (2020). Periodontitis and systemic markers of neurodegeneration: A case-control study. *Journal of clinical periodontology*, 47(5), 561–571. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13267>

Lim, Y. K., Park, S.-N., Shin, J. H., Chang, Y.-H., Shin, Y., Paek, J., Kim, H., & Kook, J.-K. (2019). *Streptococcus periodonticum* sp. nov., Isolated from Human Subgingival Dental Plaque of Periodontitis Lesion. *Current Microbiology*, 76(7), 835–841. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01695-8>

- Lin, B., Pan, L., He, H., Hu, Y., Tu, J., Zhang, L., Cui, Z., Ren, X., Wang, X., Nai, J., & Shan, G. (2023). Spousal Similarities in Cardiovascular Risk Factors in Northern China: A Community-Based Cross-Sectional Study. *International Journal of Public Health*, 68, 1605620. <https://doi.org/10.3389/ijph.2023.1605620>
- Lin, H., & Peddada, S. Das. (2020a). Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. *Nature Communications*, 11(1), 3514. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17041-7>
- Lin, H., & Peddada, S. Das. (2020b). Analysis of microbial compositions: a review of normalization and differential abundance analysis. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 6(1), 60. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-00160-w>
- Lin, H., & Peddada, S. Das. (2024). Multigroup analysis of compositions of microbiomes with covariate adjustments and repeated measures. *Nature Methods*, 21(1), 83–91. <https://doi.org/10.1038/s41592-023-02092-7>
- Lin, T.-Y., Wang, P.-Y., Lin, C.-Y., & Hung, S.-C. (2024). Association of the oral microbiome with cognitive function among older adults: NHANES 2011-2012. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 28(8), 100264. <https://doi.org/10.1016/j.jnha.2024.100264>
- Lin, X., Wang, Y., Ma, Z., Xie, M., Liu, Z., Cheng, J., Tian, Y., & Shi, H. (2023). Correlation between caries activity and salivary microbiota in preschool children. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1141474. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1141474>
- Liu, S., Chen, M., Wang, Y., Zhou, X., Peng, X., Ren, B., Li, M., & Cheng, L. (2020). Effect of *Veillonella parvula* on the physiological activity of *Streptococcus mutans*. *Archives of Oral Biology*, 109, 104578. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.104578>
- Liu, T., Liu, J., Liu, J., Yang, R., Lu, X., He, X., Shi, W., & Guo, L. (2020). Interspecies Interactions Between *Streptococcus Mutans* and *Streptococcus Agalactiae* in vitro. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 344. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00344>
- Liu, X.-X., Jiao, B., Liao, X.-X., Guo, L.-N., Yuan, Z.-H., Wang, X., Xiao, X.-W., Zhang, X.-Y., Tang, B.-S., & Shen, L. (2019). Analysis of Salivary Microbiome in Patients with Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 72(2), 633–640. <https://doi.org/10.3233/JAD-190587>
- Liu, Y., Wu, Z., Nakanishi, Y., Ni, J., Hayashi, Y., Takayama, F., Zhou, Y., Kadowaki, T., & Nakanishi, H. (2017). Infection of microglia with *Porphyromonas gingivalis* promotes cell migration and an inflammatory response through the gingipain-mediated activation of protease-activated receptor-2 in mice. *Scientific Reports*, 7(1), 11759. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12173-1>
- Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., & Huttenhower, C. (2016). The healthy human microbiome. *Genome Medicine*, 8(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0307-y>
- López-López, A., & Mira, A. (2020). Shifts in Composition and Activity of Oral Biofilms After Fluoride Exposure. *Microbial Ecology*, 80(3), 729–738. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01531-8>
- Lourenço, T. G. B., Heller, D., Silva-Boghossian, C. M., Cotton, S. L., Paster, B. J., & Colombo, A. P. V. (2014). Microbial signature profiles of periodontally healthy and diseased patients. *Journal of Clinical Periodontology*, 41(11), 1027–1036. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12302>
- Lu, C., Chu, Y., Liu, J. R., Liu, W. Y., & Ouyang, X. Y. (2021). Subgingival Microbial Profiles of Young Chinese Adults with Stage I/II Periodontitis, Gingivitis and Periodontal Health Status. *The Chinese Journal of Dental Research*, 24(3), 167–175. <https://doi.org/10.3290/j.cjdr.b1965003>
- Lu, C., Zhao, Q., Deng, J., Chen, K., Jiang, X., Ma, F., Ma, S., & Li, Z. (2022). Salivary Microbiome Profile of Diabetes and Periodontitis in a Chinese Population. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 933833. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.933833>
- Lu, J., Breitwieser, F. P., Thielen, P., & Salzberg, S. L. (2016). Bracken: Estimating species abundance in metagenomics data. *BioRxiv*, 51813. <https://doi.org/10.1101/051813>

- Lu, J., Rincon, N., Wood, D. E., Breitwieser, F. P., Pockrandt, C., Langmead, B., Salzberg, S. L., & Steinegger, M. (2022). Metagenome analysis using the Kraken software suite. *Nature Protocols*, 17(12), 2815–2839. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00738-y>
- Lu, L., Zheng, X., Wang, S., Tang, C., Zhang, Y., Yao, G., Zeng, J., Ge, S., Wen, H., Xu, M., Guyatt, G., & Xu, N. (2020). Anti-A β agents for mild to moderate Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 91(12), 1316–1324. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2020-323497>
- Luckey, T. D. (1972). Introduction to intestinal microecology. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 25(12), 1292–1294. <https://doi.org/10.1093/ajcn/25.12.1292>
- Lundmark, A., Hu, Y. O. O., Huss, M., Johannsen, G., Andersson, A. F., & Yucel-Lindberg, T. (2019). Identification of Salivary Microbiota and Its Association With Host Inflammatory Mediators in Periodontitis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 216. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00216>
- Machado, V., Botelho, J., Escalda, C., Hussain, S. B., Luthra, S., Mascarenhas, P., Orlandi, M., Mendes, J. J., & D'Aiuto, F. (2021). Serum C-Reactive Protein and Periodontitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Immunology*, 12, 706432. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.706432>
- Mansfield, J. M., Campbell, J. H., Bhandari, A. R., Jesionowski, A. M., & Vickerman, M. M. (2012). Molecular analysis of 16S rRNA genes identifies potentially periodontal pathogenic bacteria and archaea in the plaque of partially erupted third molars. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery : Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 70(7), 1506–1507. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2011.09.049>
- Mantzourani, M., Fenlon, M., & Beighton, D. (2009). Association between Bifidobacteriaceae and the clinical severity of root caries lesions. *Oral Microbiology and Immunology*, 24(1), 32–37. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2008.00470.x>
- Maraki, S., Papadakis, I. S., Chronakis, E., Panagopoulos, D., & Vakis, A. (2016). *Aggregatibacter aphrophilus* brain abscess secondary to primary tooth extraction: Case report and literature review. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*, 49(1), 119–122. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2013.12.007>
- Marchesan, J., Jiao, Y., Schaff, R. A., Hao, J., Morelli, T., Kinney, J. S., Gerow, E., Sheridan, R., Rodrigues, V., Paster, B. J., Inohara, N., & Giannobile, W. V. (2016). TLR4, NOD1 and NOD2 mediate immune recognition of putative newly identified periodontal pathogens. *Molecular Oral Microbiology*, 31(3), 243–258. <https://doi.org/10.1111/omi.12116>
- Marchini, L., Ettinger, R., Caprio, T., & Jucan, A. (2019). Oral health care for patients with Alzheimer's disease: An update. *Special Care in Dentistry : Official Publication of the American Association of Hospital Dentists, the Academy of Dentistry for the Handicapped, and the American Society for Geriatric Dentistry*, 39(3), 262–273. <https://doi.org/10.1111/scd.12375>
- Martel, J., Chang, S.-H., Ko, Y.-F., Hwang, T.-L., Young, J. D., & Ojcius, D. M. (2022). Gut barrier disruption and chronic disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 33(4), 247–265. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2022.01.002>
- Mashima, I., Liao, Y.-C., Lin, C.-H., Nakazawa, F., Haase, E. M., Kiyoura, Y., & Scannapieco, F. A. (2021). Comparative Pan-Genome Analysis of Oral *Veillonella* Species. *Microorganisms*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081775>
- Mashima, I., & Nakazawa, F. (2014). The influence of oral *Veillonella* species on biofilms formed by *Streptococcus* species. *Anaerobe*, 28, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.05.003>
- Mashima, I., Theodorea, C. F., Thaweboon, B., Thaweboon, S., Scannapieco, F. A., & Nakazawa, F. (2017). Exploring the salivary microbiome of children stratified by the oral hygiene index. *PloS One*, 12(9), e0185274. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185274>

- Máximo, M. B., de Mendonça, A. C., Renata Santos, V., Figueiredo, L. C., Feres, M., & Duarte, P. M. (2009). Short-term clinical and microbiological evaluations of peri-implant diseases before and after mechanical anti-infective therapies. *Clinical Oral Implants Research*, 20(1), 99–108. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2008.01618.x>
- McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R. J., Kawas, C. H., Klunk, W. E., Koroshetz, W. J., Manly, J. J., Mayeux, R., Mohs, R. C., Morris, J. C., Rossor, M. N., Scheltens, P., Carrillo, M. C., Thies, B., Weintraub, S., & Phelps, C. H. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association*, 7(3), 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005>
- Meghil, M. M., & Cutler, C. W. (2020). Oral Microbes and Mucosal Dendritic Cells, “Spark and Flame” of Local and Distant Inflammatory Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5). <https://doi.org/10.3390/ijms21051643>
- Miklossy, J. (1993). Alzheimer's disease--a spirochetosis? *Neuroreport*, 4(7), 841–848.
- Miklossy, J. (2015). Historic evidence to support a causal relationship between spirochetal infections and Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7, 46. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00046>
- Miklossy, J. (2016). Bacterial Amyloid and DNA are Important Constituents of Senile Plaques: Further Evidence of the Spirochetal and Biofilm Nature of Senile Plaques. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 53(4), 1459–1473. <https://doi.org/10.3233/JAD-160451>
- Miklossy, J. (2011). Alzheimer's disease - a neurospirochetosis. Analysis of the evidence following Koch's and Hill's criteria. *Journal of Neuroinflammation*, 8, 90. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-90>
- Minn, Y. K., Suk, S. H., Park, H., Cheong, J. S., Yang, H., Lee, S., Do, S. Y., & Kang, J. S. (2013). Tooth loss is associated with brain white matter change and silent infarction among adults without dementia and stroke. *Journal of Korean medical science*, 28(6), 929–933. <https://doi.org/10.3346/jkms.2013.28.6.929>
- Montagner, F., Jacinto, R. C., Signoretti, F. G. C., & Gomes, B. P. F. A. (2010). Treponema species detected in infected root canals and acute apical abscess exudates. *Journal of Endodontics*, 36(11), 1796–1799. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.08.008>
- Monteiro, M. F., Altabtbaei, K., Kumar, P. S., Casati, M. Z., Ruiz, K. G. S., Sallum, E. A., Nociti-Junior, F. H., & Casarin, R. C. V. (2021). Parents with periodontitis impact the subgingival colonization of their offspring. *Scientific Reports*, 11(1), 1357. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80372-4>
- Moore, L. V., Moore, W. E., Riley, C., Brooks, C. N., Burmeister, J. A., & Smibert, R. M. (1993). Periodontal microflora of HIV positive subjects with gingivitis or adult periodontitis. *Journal of Periodontology*, 64(1), 48–56. <https://doi.org/10.1902/jop.1993.64.1.48>
- Moore, W. E., Holdeman, L. V., Smibert, R. M., Cato, E. P., Burmeister, J. A., Palcanis, K. G., & Ranney, R. R. (1984). Bacteriology of experimental gingivitis in children. *Infection and Immunity*, 46(1), 1–6. <https://doi.org/10.1128/iai.46.1.1-6.1984>
- Moore, W. E., Holdeman, L. V., Smibert, R. M., Good, I. J., Burmeister, J. A., Palcanis, K. G., & Ranney, R. R. (1982). Bacteriology of experimental gingivitis in young adult humans. *Infection and Immunity*, 38(2), 651–667. <https://doi.org/10.1128/iai.38.2.651-667.1982>
- Morrison, D. J., & Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*, 7(3), 189–200. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082>
- Moter, A., Riep, B., Haban, V., Heuner, K., Siebert, G., Berning, M., Wyss, C., Ehmke, B., Flemmig, T. F., & Göbel, U. B. (2006). Molecular epidemiology of oral treponemes in patients with periodontitis and in periodontitis-resistant subjects. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(9), 3078–3085. <https://doi.org/10.1128/JCM.00322-06>

- Munson, M. A., Banerjee, A., Watson, T. F., & Wade, W. G. (2004). Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(7), 3023–3029. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.7.3023-3029.2004>
- Murad, C. F., Sassone, L. M., Faveri, M., Hirata, R. J., Figueiredo, L., & Feres, M. (2014). Microbial diversity in persistent root canal infections investigated by checkerboard DNA-DNA hybridization. *Journal of Endodontics*, 40(7), 899–906. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.02.010>
- Na, H. S., Jung, N.-Y., Song, Y., Kim, S. Y., Kim, H.-J., Lee, J. Y., & Chung, J. (2024). A distinctive subgingival microbiome in patients with periodontitis and Alzheimer's disease compared with cognitively unimpaired periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology*, 51(1), 43–53. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13880>
- Na, H. S., Kim, S. Y., Han, H., Kim, H.-J., Lee, J.-Y., Lee, J.-H., & Chung, J. (2020). Identification of Potential Oral Microbial Biomarkers for the Diagnosis of Periodontitis. *Journal of Clinical Medicine*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/jcm9051549>
- Nadkarni, M. A., Browne, G. V., Chhour, K.-L., Byun, R., Nguyen, K.-A., Chapple, C. C., Jacques, N. A., & Hunter, N. (2012). Pattern of distribution of *Prevotella* species/phylotypes associated with healthy gingiva and periodontal disease. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology, 31(11), 2989–2999. <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1651-5>
- Nadkarni, M. A., Chhour, K.-L., Browne, G. V., Byun, R., Nguyen, K.-A., Chapple, C. C., Jacques, N. A., & Hunter, N. (2015). Age-dependent changes in *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella* species/phylotypes in healthy gingiva and inflamed/diseased sub-gingival sites. *Clinical Oral Investigations*, 19(4), 911–919. <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1301-7>
- Nadkarni, M. A., Simonian, M. R., Harty, D. W. S., Zoellner, H., Jacques, N. A., & Hunter, N. (2010). Lactobacilli are prominent in the initial stages of polymicrobial infection of dental pulp. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(5), 1732–1740. <https://doi.org/10.1128/JCM.01912-09>
- Nagpal, D., Prakash, S., Bhat, K. G., & Singh, G. (2016). Detection and comparison of *Selenomonas sputigena* in subgingival biofilms in chronic and aggressive periodontitis patients. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 20(3), 286–291. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.181247>
- Nakaya, N., Xie, T., Scheerder, B., Tsuchiya, N., Narita, A., Nakamura, T., Metoki, H., Obara, T., Ishikuro, M., Hozawa, A., Snieder, H., & Kuriyama, S. (2021). Spousal similarities in cardiometabolic risk factors: A cross-sectional comparison between Dutch and Japanese data from two large biobank studies. *Atherosclerosis*, 334, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2021.08.037>
- Naorungroj, S., Schoenbach, V. J., Beck, J., Mosley, T. H., Gottesman, R. F., Alonso, A., Heiss, G., & Slade, G. D. (2013). Cross-sectional associations of oral health measures with cognitive function in late middle-aged adults: a community-based study. *Journal of the American Dental Association* (1939), 144(12), 1362–1371. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2013.0072>
- Naorungroj, S., Schoenbach, V. J., Wruck, L., Mosley, T. H., Gottesman, R. F., Alonso, A., Heiss, G., Beck, J., & Slade, G. D. (2015). Tooth loss, periodontal disease, and cognitive decline in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 43(1), 47–57. <https://doi.org/10.1111/cdoe.12128>
- Nara, P. L., Sindelar, D., Penn, M. S., Potempa, J., & Griffin, W. S. T. (2021). *Porphyromonas gingivalis* Outer Membrane Vesicles as the Major Driver of and Explanation for Neuropathogenesis, the Cholinergic Hypothesis, Iron Dyshomeostasis, and Salivary Lactoferrin in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* : JAD, 82(4), 1417–1450. <https://doi.org/10.3233/JAD-210448>
- Nardello, L. C. L., Amado, P. P. P., Franco, D. C., Cazares, R. X. R., Nogales, C. G., Mayer, M. P. A., Karygianni, L., Thurnheer, T., & Pinheiro, E. T. (2020). Next-Generation Sequencing to Assess Potentially Active Bacteria in Endodontic Infections. *Journal of Endodontics*, 46(8), 1105–1112. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.05.004>

- Nearing, J. T., Douglas, G. M., Hayes, M. G., MacDonald, J., Desai, D. K., Allward, N., Jones, C. M. A., Wright, R. J., Dhanani, A. S., Comeau, A. M., & Langille, M. G. I. (2022). Microbiome differential abundance methods produce different results across 38 datasets. *Nature Communications*, 13(1), 342. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28034-z>
- Neelakandan, A., Potluri, R., Yadalam, P. K., Chakraborty, P., Saravanan, A. V., & Arunraj, R. (2021). The Varied Proportion of Filifactor alocis in Periodontal Health and Disease in the South Indian Subpopulation. *Contemporary Clinical Dentistry*, 12(4), 433–438. https://doi.org/10.4103/ccd.ccd_803_20
- Neugent, M. L., Hulyalkar, N. V., Nguyen, V. H., Zimmern, P. E., & De Nisco, N. J. (2020). Advances in Understanding the Human Urinary Microbiome and Its Potential Role in Urinary Tract Infection. *MBio*, 11(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00218-20>
- Newbrun, E. (1996). Indices to measure gingival bleeding. *Journal of Periodontology*, 67(6), 555–561. <https://doi.org/10.1902/jop.1996.67.6.555>
- Nie, R., Wu, Z., Ni, J., Zeng, F., Yu, W., Zhang, Y., Kadowaki, T., Kashiwazaki, H., Teeling, J. L., & Zhou, Y. (2019). Porphyromonas gingivalis Infection Induces Amyloid- β Accumulation in Monocytes/Macrophages. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 72(2), 479–494. <https://doi.org/10.3233/JAD-190298>
- Nobbs, A., & Kreth, J. (2019). Genetics of sanguinis-Group Streptococci in Health and Disease. *Microbiology Spectrum*, 7(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0052-2018>
- Noble, J. M., Scarneas, N., Celenti, R. S., Elkind, M. S., Wright, C. B., Schupf, N., & Papapanou, P. N. (2014). Serum IgG antibody levels to periodontal microbiota are associated with incident Alzheimer disease. *PloS one*, 9(12), e114959. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114959>
- Nóbrega, L. M. M., Delboni, M. G., Martinho, F. C., Zaia, A. A., Ferraz, C. C. R., & Gomes, B. P. F. A. (2013). Treponema diversity in root canals with endodontic failure. *European Journal of Dentistry*, 7(1), 61–68.
- Nóbrega, L. M. M., Montagner, F., Ribeiro, A. C., Mayer, M. A. P., & Gomes, B. P. F. de A. (2016a). Bacterial diversity of symptomatic primary endodontic infection by clonal analysis. *Brazilian Oral Research*, 30(1), e103. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0103>
- Nóbrega, L. M. M., Montagner, F., Ribeiro, A. C., Mayer, M. A. P., & Gomes, B. P. F. A. (2016b). Molecular Identification of Cultivable Bacteria From Infected Root Canals Associated With Acute Apical Abscess. *Brazilian Dental Journal*, 27(3), 318–324. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201600715>
- Nonnenmacher, C., Dalpke, A., Rochon, J., Flores-de-Jacoby, L., Mutters, R., & Heeg, K. (2005). Real-time polymerase chain reaction for detection and quantification of bacteria in periodontal patients. *Journal of Periodontology*, 76(9), 1542–1549. <https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.9.1542>
- Nørskov-Lauritsen, N., Bruun, B., Andersen, C., & Kilian, M. (2012). Identification of haemolytic Haemophilus species isolated from human clinical specimens and description of Haemophilus sputorum sp. nov. *International Journal of Medical Microbiology : IJMM*, 302(2), 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2012.01.001>
- Nørskov-Lauritsen, N., & Kilian, M. (2006). Reclassification of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Haemophilus aphrophilus, Haemophilus paraphrophilus and Haemophilus segnis as Aggregatibacter actinomycetemcomitans gen. nov., comb. nov., Aggregatibacter aphrophilus comb. nov. and Aggregatibacter. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(Pt 9), 2135–2146. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.64207-0>
- Okamoto, N., Morikawa, M., Tomioka, K., Yanagi, M., Amano, N., & Kurumatani, N. (2015). Association between tooth loss and the development of mild memory impairment in the elderly: the Fujiwara-kyo Study. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 44(3), 777–786. <https://doi.org/10.3233/JAD-141665>

- Olczak, T., Simpson, W., Liu, X., & Genco, C. A. (2005). Iron and heme utilization in *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), 119–144. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.09.001>
- O’Leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., Ciufo, S., Haddad, D., McVeigh, R., Rajput, B., Robbertse, B., Smith-White, B., Ako-Adjei, D., Astashyn, A., Badretdin, A., Bao, Y., Blinkova, O., Brover, V., Chetvernin, V., Choi, J., Cox, E., Ermolaeva, O., ... Pruitt, K. D. (2016). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D733–45. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189>
- Oliveira, R. R. D. S., Fermiano, D., Feres, M., Figueiredo, L. C., Teles, F. R. F., Soares, G. M. S., & Faveri, M. (2016). Levels of Candidate Periodontal Pathogens in Subgingival Biofilm. *Journal of Dental Research*, 95(6), 711–718. <https://doi.org/10.1177/0022034516634619>
- Ordinola-Zapata, R., Costalonga, M., Dietz, M., Lima, B. P., & Staley, C. (2024). The root canal microbiome diversity and function. A whole-metagenome shotgun analysis. *International Endodontic Journal*, 57(7), 872–884. <https://doi.org/10.1111/iej.13911>
- Stein, P. S., Desrosiers, M., Donegan, S. J., Yepes, J. F., & Kryscio, R. J. (2007). Tooth loss, dementia and neuropathology in the Nun study. *Journal of the American Dental Association* (1939), 138(10), 1314–1382. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2007.0046>
- Paganini-Hill, A., White, S. C., & Atchison, K. A. (2012). Dentition, dental health habits, and dementia: the Leisure World Cohort Study. *Journal of the American Geriatrics Society*, 60(8), 1556–1563. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2012.04064.x>
- Panzarella, V., Mauceri, R., Baschi, R., Maniscalco, L., Campisi, G., & Monastero, R. (2022). Oral Health Status in Subjects with Amnesic Mild Cognitive Impairment and Alzheimer’s Disease: Data from the Zabùt Aging Project. *Journal of Alzheimer’s Disease : JAD*, 87(1), 173–183. <https://doi.org/10.3233/JAD-200385>
- Papapanou, P. N., Neiderud, A. M., Papadimitriou, A., Sandros, J., & Dahlén, G. (2000). “Checkerboard” assessments of periodontal microbiota and serum antibody responses: a case-control study. *Journal of Periodontology*, 71(6), 885–897. <https://doi.org/10.1902/jop.2000.71.6.885>
- Papapanou, P. N., Park, H., Cheng, B., Kokaras, A., Paster, B., Burkett, S., Watson, C. W.-M., Annavajhala, M. K., Uhlemann, A.-C., & Noble, J. M. (2020). Subgingival microbiome and clinical periodontal status in an elderly cohort: The WHICAP ancillary study of oral health. *Journal of Periodontology*, 91 Suppl 1(Suppl 1), S56–S67. <https://doi.org/10.1002/JPER.20-0194>
- Park, D. H., Park, O. J., Yoo, Y. J., Perinpanayagam, H., Cho, E. B., Kim, K., Park, J., Noblett, W. C., Kum, K. Y., & Han, S. H. (2024). Microbiota Association and Profiling of Gingival Sulci and Root Canals of Teeth with Primary or Secondary/Persistent Endodontic Infections. *Journal of endodontics*, 50(8), 1124–1133. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2024.04.016>
- Park, H., Suk, S. H., Cheong, J. S., Lee, H. S., Chang, H., Do, S. Y., & Kang, J. S. (2013). Tooth loss may predict poor cognitive function in community-dwelling adults without dementia or stroke: the PRESENT project. *Journal of Korean medical science*, 28(10), 1518–1521. <https://doi.org/10.3346/jkms.2013.28.10.1518>
- Park, S.-N., Lim, Y. K., Shin, J. H., Chang, Y.-H., Shin, Y., Paek, J., Kim, H., & Kook, J.-K. (2019). *Streptococcus gwangjuense* sp. nov., Isolated from Human Pericoronitis. *Current Microbiology*, 76(7), 799–803. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01687-8>
- Pereira, R. S., Rodrigues, V. A. A., Furtado, W. T., Gueiros, S., Pereira, G. S., & Avila-Campos, M. J. (2017). Microbial analysis of root canal and periradicular lesion associated to teeth with endodontic failure. *Anaerobe*, 48, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.06.016>
- Pérez-Chaparro, P. J., McCulloch, J. A., Mamizuka, E. M., Moraes, A. da C. L., Faveri, M., Figueiredo, L. C., Duarte, P. M., & Feres, M. (2018). Do different probing depths exhibit striking differences in microbial profiles? *Journal of Clinical Periodontology*, 45(1), 26–37. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12811>

- Persson, G. R., & Renvert, S. (2014). Cluster of bacteria associated with peri-implantitis. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 16(6), 783–793. <https://doi.org/10.1111/cid.12052>
- Pertl, M. M., Lawlor, B. A., Robertson, I. H., Walsh, C., & Brennan, S. (2015). Risk of Cognitive and Functional Impairment in Spouses of People With Dementia: Evidence From the Health and Retirement Study. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, 28(4), 260–271. <https://doi.org/10.1177/0891988715588834>
- Petersen, C., & Round, J. L. (2014). Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cellular Microbiology*, 16(7), 1024–1033. <https://doi.org/10.1111/cmi.12308>
- Pinheiro, E. T., Karygianni, L., Candeiro, G. T. M., Vilela, B. G., Dantas, L. O., Pereira, A. C. C., Gomes, B. P. F. A., Attin, T., Thurnheer, T., & Russo, G. (2024). Metatranscriptome and Resistome of the Endodontic Microbiome. *Journal of endodontics*, 50(8), 1059–1072.e4. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2024.03.015>
- Pinto, K. P., Barbosa, A. F. A., Silva, E. J. N. L., Santos, A. P. P., & Sassone, L. M. (2023). What Is the Microbial Profile in Persistent Endodontic Infections? A Scoping Review. *Journal of Endodontics*, 49(7), 786–798.e7. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2023.05.010>
- Piwat, S., Teanpaisan, R., Dahlén, G., Thitasomakul, S., & Douglas, C. W. I. (2012). Acid production and growth by oral *Lactobacillus* species in vitro. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 3(1), 56–61. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1626.2011.00098.x>
- Polymeri, A., van der Horst, J., Buijs, M. J., Zaura, E., Wismeijer, D., Crielaard, W., Loos, B. G., Laine, M. L., & Brandt, B. W. (2021). Submucosal microbiome of peri-implant sites: A cross-sectional study. *Journal of Clinical Periodontology*, 48(9), 1228–1239. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13502>
- Poole, S., Singhrao, S. K., Chukkapalli, S., Rivera, M., Velsko, I., Kesavalu, L., & Crean, S. (2015). Active invasion of *Porphyromonas gingivalis* and infection-induced complement activation in ApoE^{-/-} mice brains. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 43(1), 67–80. <https://doi.org/10.3233/JAD-140315>
- Poole, S., Singhrao, S. K., Kesavalu, L., Curtis, M. A., & Crean, S. (2013). Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer's disease brain tissue. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 36(4), 665–677. <https://doi.org/10.3233/JAD-121918>
- Pourhajibagher, M., Ghorbanzadeh, R., & Bahador, A. (2017). Culture-dependent approaches to explore the prevalence of root canal pathogens from endodontic infections. *Brazilian Oral Research*, 31, e108. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2017.vol31.0108>
- Preza, D., Olsen, I., Aas, J. A., Willumsen, T., Grinde, B., & Paster, B. J. (2008). Bacterial profiles of root caries in elderly patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(6), 2015–2021. <https://doi.org/10.1128/JCM.02411-07>
- Qian, X., Zhang, S., Duan, L., Yang, F., Zhang, K., Yan, F., & Ge, S. (2021). Periodontitis Deteriorates Cognitive Function and Impairs Neurons and Glia in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 79(4), 1785–1800. <https://doi.org/10.3233/JAD-201007>
- Qiu, C., Zhou, W., Shen, H., Wang, J., Tang, R., Wang, T., Xie, X., Hong, B., Ren, R., Wang, G., & Song, Z. (2024). Profiles of subgingival microbiomes and gingival crevicular metabolic signatures in patients with amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, 16(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s13195-024-01402-1>
- Qudeimat, M. A., Alyahya, A., Karched, M., Behbehani, J., & Salako, N. O. (2021). Dental plaque microbiota profiles of children with caries-free and caries-active dentition. *Journal of Dentistry*, 104, 103539. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2020.103539>
- Ranjan, R., Rout, M., Mishra, M., & Kore, S. A. (2019). Tooth loss and dementia: An oro-neural connection. A cross-sectional study. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 23(2), 158–162. https://doi.org/10.4103/jisp.jisp_430_18

- Razooqi, Z., Höglund Åberg, C., Kwamin, F., Claesson, R., Haubek, D., Oscarsson, J., & Johansson, A. (2022). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Filifactor alocis* as Associated with Periodontal Attachment Loss in a Cohort of Ghanaian Adolescents. *Microorganisms*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122511>
- Reis, A. C. M., Bezerra, D. da S., Hart-Chú, E. N. S., Stipp, R. N., Guedes, S. F. de F., Neves, B. G., & Rodrigues, L. K. A. (2021). Quantification and gene expression of *Lactobacillus casei* group species associated with dentinal lesions in early childhood caries. *The Saudi Dental Journal*, 33(2), 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2020.01.006>
- Requena, T., & Velasco, M. (2021). The human microbiome in sickness and in health. *Revista Clinica Espanola*, 221(4), 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.rceng.2019.07.018>
- Retnakaran, R., Wen, S. W., Tan, H., Zhou, S., Ye, C., Shen, M., Smith, G. N., & Walker, M. C. (2021). Spousal Concordance of Cardiovascular Risk Factors in Newly Married Couples in China. *JAMA Network Open*, 4(12), e2140578. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.40578>
- Reyes-Ortiz, C. A., Luque, J. S., Eriksson, C. K., & Soto, L. (2013). Self-reported tooth loss and cognitive function: Data from the Hispanic Established Populations for Epidemiologic Studies of the Elderly (Hispanic EPESE). *Colombia medica (Cali, Colombia)*, 44(3), 139–145.
- Ribeiro, A. C., Matarazzo, F., Faveri, M., Zezell, D. M., & Mayer, M. P. A. (2011). Exploring bacterial diversity of endodontic microbiota by cloning and sequencing 16S rRNA. *Journal of Endodontics*, 37(7), 922–926. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.04.007>
- Riviere, G. R., Riviere, K. H., & Smith, K. S. (2002). Molecular and immunological evidence of oral *Treponema* in the human brain and their association with Alzheimer's disease. *Oral Microbiology and Immunology*, 17(2), 113–118. <https://doi.org/10.1046/j.0902-0055.2001.00100.x>
- Riviere, G. R., Smith, K. S., Carranza, N. J., Tzagaroulaki, E., Kay, S. L., & Dock, M. (1995). Subgingival distribution of *Treponema denticola*, *Treponema socranskii*, and pathogen-related oral spirochetes: prevalence and relationship to periodontal status of sampled sites. *Journal of Periodontology*, 66(10), 829–837. <https://doi.org/10.1902/jop.1995.66.10.829>
- Rôças, I. N., & Siqueira, J. F. J. (2005). Species-directed 16S rRNA gene nested PCR detection of *Olsenella* species in association with endodontic diseases. *Letters in Applied Microbiology*, 41(1), 12–16. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01723.x>
- Rôças, I. N., Baumgartner, J. C., Xia, T., & Siqueira, J. F. J. (2006). Prevalence of selected bacterial named species and uncultivated phylotypes in endodontic abscesses from two geographic locations. *Journal of Endodontics*, 32(12), 1135–1138. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2006.05.001>
- Rôças, I. N., Hülsmann, M., & Siqueira, J. F. J. (2008). Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. *Journal of Endodontics*, 34(8), 926–931. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.05.008>
- Rôças, I. N., Lima, K. C., Assunção, I. V., Gomes, P. N., Bracks, I. V., & Siqueira, J. F. J. (2015). Advanced Caries Microbiota in Teeth with Irreversible Pulpitis. *Journal of Endodontics*, 41(9), 1450–1455. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.05.013>
- Rôças, I. N., & Siqueira, J. F. J. (2006). Characterization of *Dialister* species in infected root canals. *Journal of Endodontics*, 32(11), 1057–1061. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2006.04.010>
- Rôças, I. N., & Siqueira, J. F. J. (2009). Prevalence of new candidate pathogens *Prevotella baroniae*, *Prevotella multisaccharivorax* and as-yet-uncultivated *Bacteroidetes* clone X083 in primary endodontic infections. *Journal of Endodontics*, 35(10), 1359–1362. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.05.033>
- Rôças, I. N., Siqueira, J. F. J., & Debelian, G. J. (2011). Analysis of symptomatic and asymptomatic primary root canal infections in adult Norwegian patients. *Journal of Endodontics*, 37(9), 1206–1212. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.05.026>

- Romani Vestman, N., Chen, T., Lif Holgerson, P., Öhman, C., & Johansson, I. (2015). Oral Microbiota Shift after 12-Week Supplementation with *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and PTA 5289; A Randomized Control Trial. *PloS One*, 10(5), e0125812. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125812>
- Rosa, T. P., Signoretti, F. G., Montagner, F., Gomes, B. P., & Jacinto, R. C. (2015). Prevalence of *Treponema* spp. in endodontic retreatment-resistant periapical lesions. *Brazilian oral research*, 29, S1806-83242015000100228. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2015.vol29.0031>
- Rubiola, S., Macori, G., Civera, T., Fanning, S., Mitchell, M., & Chiesa, F. (2022). Comparison Between Full-Length 16S rRNA Metabarcoding and Whole Metagenome Sequencing Suggests the Use of Either Is Suitable for Large-Scale Microbiome Studies. *Foodborne Pathogens and Disease*, 19(7), 495–504. <https://doi.org/10.1089/fpd.2022.0027>
- Kaba S, Lynch C, Raha D, et al. Clinical Trials and Aging: 11th Conference Clinical Trials on Alzheimer's Disease, October 24-27, 2018, Barcelona, Spain. *The Journal Of Prevention of Alzheimer's Disease*. 2018;5:1–151.
- Sabbagh, M. N., & Decourt, B. (2022). COR388 (atuzaginstat): an investigational gingipain inhibitor for the treatment of Alzheimer disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 31(10), 987–993. <https://doi.org/10.1080/13543784.2022.2117605>
- Sakamoto, M., Rôças, I. N., Siqueira, J. F. J., & Benno, Y. (2006). Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiology and Immunology*, 21(2), 112–122. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2006.00270.x>
- Sakamoto, M., Takeuchi, Y., Umeda, M., Ishikawa, I., Benno, Y., & Nakase, T. (1999). Detection of *Treponema socranskii* associated with human periodontitis by PCR. *Microbiology and Immunology*, 43(5), 485–490. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1999.tb02432.x>
- 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. *Microbiology and Immunology*, 44(8), 643–652. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2000.tb02545.x>
- Sakamoto, M., Huang, Y., Ohnishi, M., Umeda, M., Ishikawa, I., & Benno, Y. (2004). Changes in oral microbial profiles after periodontal treatment as determined by molecular analysis of 16S rRNA genes. *Journal of Medical Microbiology*, 53(Pt 6), 563–571. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45576-0>
- Sampaio-Maia, B., Caldas, I. M., Pereira, M. L., Pérez-Mongiovi, D., & Araujo, R. (2016). The Oral Microbiome in Health and Its Implication in Oral and Systemic Diseases. *Advances in Applied Microbiology*, 97, 171–210. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2016.08.002>
- Santonocito, S., Giudice, A., Polizzi, A., Troiano, G., Merlo, E. M., Sclafani, R., Grosso, G., & Isola, G. (2022). A Cross-Talk between Diet and the Oral Microbiome: Balance of Nutrition on Inflammation and Immune System's Response during Periodontitis. *Nutrients*, 14(12). <https://doi.org/10.3390/nu14122426>
- Sanz, M., Del Castillo, A. M., Jepsen, S., Gonzalez-Juanatey, J. R., D'Aiuto, F., Bouchard, P., Chapple, I., Dietrich, T., Gotsman, I., Graziani, F., Herrera, D., Loos, B., Madianos, P., Michel, J. B., Perel, P., Pieske, B., Shapira, L., Shechter, M., Tonetti, M., ... Wimmer, G. (2020). Periodontitis and Cardiovascular Diseases. Consensus Report. *Global Heart*, 15(1), 1. <https://doi.org/10.5334/gh.400>
- Sassone, L., Fidel, R., Figueiredo, L., Fidel, S., Faveri, M., & Feres, M. (2007). Evaluation of the microbiota of primary endodontic infections using checkerboard DNA-DNA hybridization. *Oral Microbiology and Immunology*, 22(6), 390–397. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00376.x>
- Sassone, L. M., Fidel, R. A., Faveri, M., Guerra, R., Figueiredo, L., Fidel, S. R., & Feres, M. (2008). A microbiological profile of symptomatic teeth with primary endodontic infections. *Journal of Endodontics*, 34(5), 541–545. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.02.004>
- Schirrmeister, J. F., Liebenow, A.-L., Pelz, K., Wittmer, A., Serr, A., Hellwig, E., & Al-Ahmad, A. (2009). New bacterial compositions in root-filled teeth with periradicular lesions. *Journal of Endodontics*, 35(2), 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.10.024>

- Schmidt, T. S. B., Raes, J., & Bork, P. (2018). The Human Gut Microbiome: From Association to Modulation. *Cell*, 172(6), 1198–1215. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.044>
- Schulz, S., Porsch, M., Grosse, I., Hoffmann, K., Schaller, H.-G., & Reichert, S. (2019). Comparison of the oral microbiome of patients with generalized aggressive periodontitis and periodontitis-free subjects. *Archives of Oral Biology*, 99, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.01.015>
- Schulze-Schweifing, K., Banerjee, A., & Wade, W. G. (2014). Comparison of bacterial culture and 16S rRNA community profiling by clonal analysis and pyrosequencing for the characterization of the dentine caries-associated microbiome. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4, 164. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00164>
- Schwartz, J. L., Peña, N., Kavar, N., Zhang, A., Callahan, N., Robles, S. J., Griebel, A., & Adami, G. R. (2021). Old age and other factors associated with salivary microbiome variation. *BMC Oral Health*, 21(1), 490. <https://doi.org/10.1186/s12903-021-01828-1>
- Schwendicke, F., Dörfer, C., Kneist, S., Meyer-Lueckel, H., & Paris, S. (2014). Cariogenic effects of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in a dental biofilm model. *Caries Research*, 48(3), 186–192. <https://doi.org/10.1159/000355907>
- Seerangaiyan, K., van Winkelhoff, A. J., Harmsen, H. J. M., Rossen, J. W. A., & Winkel, E. G. (2017). The tongue microbiome in healthy subjects and patients with intra-oral halitosis. *Journal of Breath Research*, 11(3), 36010. <https://doi.org/10.1088/1752-7163/aa7c24>
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12(6), R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>
- Selvakumar, D. R., Krishnamoorthy, S., Venkatesan, K., Ramanathan, A., Abbott, P. V., & Angambakkam Rajasekaran, P. (2021). Active Bacteria in Carious Dentin of Mandibular Molars with Different Pulp Conditions: An In Vivo Study. *Journal of Endodontics*, 47(12), 1883–1889. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2021.08.018>
- Sengoku, R. (2020). Aging and Alzheimer's disease pathology. *Neuropathology : Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 40(1), 22–29. <https://doi.org/10.1111/neup.12626>
- Shaddox, L. M., Huang, H., Lin, T., Hou, W., Harrison, P. L., Aukhil, I., Walker, C. B., Klepac-Ceraj, V., & Paster, B. J. (2012). Microbiological characterization in children with aggressive periodontitis. *Journal of Dental Research*, 91(10), 927–933. <https://doi.org/10.1177/0022034512456039>
- Shaikh, H. F. M., Oswal, P. U., Kugaji, M. S., Katti, S. S., Bhat, K. G., Kandaswamy, E., & Joshi, V. M. (2024). Association of *F. alocis* and *D. pneumosintes* with Periodontitis Disease Severity and Red Complex Bacteria. *Dentistry Journal*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/dj12040105>
- Silbereisen, A., Bao, K., Wolski, W., Nanni, P., Kunz, L., Afacan, B., Emingil, G., & Bostanci, N. (2024). Probing the salivary proteome for prognostic biomarkers in response to non-surgical periodontal therapy. *Journal of clinical periodontology*, 10.1111/jcpe.13990. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13990>
- Singh Rao, S. K., & Olsen, I. (2018). Are Porphyromonas gingivalis Outer Membrane Vesicles Microbullets for Sporadic Alzheimer's Disease Manifestation?. *Journal of Alzheimer's disease reports*, 2(1), 219–228. <https://doi.org/10.3233/ADR-180080>
- Siqueira, J. F. J., & Rôças, I. N. (2005). Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(7), 3314–3319. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3314-3319.2005>
- Siqueira, J. F. J., & Rôças, I. N. (2004a). Simultaneous detection of *Dialister pneumosintes* and *Filifactor alocis* in endodontic infections by 16S rDNA-directed multiplex PCR. *Journal of Endodontics*, 30(12), 851–854. <https://doi.org/10.1097/01.don.0000132300.13023.5d>

- Siqueira, J. F. J., & Rôças, I. N. (2004b). *Treponema* species associated with abscesses of endodontic origin. *Oral Microbiology and Immunology*, 19(5), 336–339. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302x.2004.00156.x>
- Siqueira, J. F. J., & Rôças, I. N. (2009). The microbiota of acute apical abscesses. *Journal of Dental Research*, 88(1), 61–65. <https://doi.org/10.1177/0022034508328124>
- Siqueira, J. F., Rôças, I. N., Moraes, S. R., & Santos, K. R. N. (2002). Direct amplification of rRNA gene sequences for identification of selected oral pathogens in root canal infections. *International Endodontic Journal*, 35(4), 345–351. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2002.00485.x>
- Siqueira, J. F. J., & Rôças, I. N. (2002). *Dialister pneumosintes* can be a suspected endodontic pathogen. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 94(4), 494–498. <https://doi.org/10.1067/moe.2002.125202>
- Siqueira, J. F. J., & Rôças, I. N. (2003a). *Treponema socranskii* in primary endodontic infections as detected by nested PCR. *Journal of Endodontics*, 29(4), 244–247. <https://doi.org/10.1097/00004770-200304000-00003>
- Siqueira, J. F. J., & Rôças, I. N. (2003b). PCR-based identification of *Treponema maltophilum*, *T. amylovorum*, *T. medium*, and *T. lecithinolyticum* in primary root canal infections. *Archives of Oral Biology*, 48(7), 495–502. [https://doi.org/10.1016/s0003-9969\(03\)00092-x](https://doi.org/10.1016/s0003-9969(03)00092-x)
- Siqueira, J. F. J., & Rôças, I. N. (2003c). Positive and negative bacterial associations involving *Dialister pneumosintes* in primary endodontic infections. *Journal of Endodontics*, 29(7), 438–441. <https://doi.org/10.1097/00004770-200307000-00003>
- Siqueira, J. F. J., Rôças, I. N., Souto, R., de Uzeda, M., & Colombo, A. P. (2002). *Actinomyces* species, streptococci, and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections. *Journal of Endodontics*, 28(3), 168–172. <https://doi.org/10.1097/00004770-200203000-00006>
- Siqueira, J. F. J., Silva, W. O., Romeiro, K., Gominho, L. F., Alves, F. R. F., & Rôças, I. N. (2024). Apical root canal microbiome associated with primary and posttreatment apical periodontitis: A systematic review. *International Endodontic Journal*, 57(8), 1043–1058. <https://doi.org/10.1111/iej.14071>
- Sisk-Hackworth, L., Ortiz-Velez, A., Reed, M. B., & Kelley, S. T. (2021). Compositional Data Analysis of Periodontal Disease Microbial Communities. *Frontiers in Microbiology*, 12, 617949. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.617949>
- Skelly, E., Johnson, N. W., Kapellas, K., Kroon, J., Lalloo, R., & Weyrich, L. (2020). Response of Salivary Microbiota to Caries Preventive Treatment in Aboriginal and Torres Strait Islander Children. *Journal of Oral Microbiology*, 12(1), 1830623. <https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1830623>
- Smith, S. I., Aweh, A. J., Coker, A. O., Savage, K. O., Abosedo, D. A., & Oyediji, K. S. (2001). Lactobacilli in human dental caries and saliva. *Microbios*, 105(411), 77–85.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent, R. L. J. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(2), 134–144. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x>
- Song, Z., Fang, S., Guo, T., Wen, Y., Liu, Q., & Jin, Z. (2023). Microbiome and metabolome associated with white spot lesions in patients treated with clear aligners. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1119616. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1119616>
- Sparks Stein, P., Steffen, M. J., Smith, C., Jicha, G., Ebersole, J. L., Abner, E., & Dawson, D., 3rd (2012). Serum antibodies to periodontal pathogens are a risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 8(3), 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.04.006>
- Spatafora, G., Li, Y., He, X., Cowan, A., & Tanner, A. C. R. (2024). The Evolving Microbiome of Dental Caries. *Microorganisms*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010121>

- Stewart, R., Stenman, U., Hakeberg, M., Hägglin, C., Gustafson, D., & Skoog, I. (2015). Associations between oral health and risk of dementia in a 37-year follow-up study: the prospective population study of women in Gothenburg. *Journal of the American Geriatrics Society*, 63(1), 100–105. <https://doi.org/10.1111/jgs.13194>
- Stingu, C. S., Jentsch, H., Eick, S., Schaumann, R., Knöfler, G., & Rodloff, A. (2012). Microbial profile of patients with periodontitis compared with healthy subjects. *Quintessence International* (Berlin, Germany : 1985), 43(2), e23-31.
- Stingu, C.-S., Schaumann, R., Jentsch, H., Eschrich, K., Brosteanu, O., & Rodloff, A. C. (2013). Association of periodontitis with increased colonization by *Prevotella nigrescens*. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 4(1), 20–25. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1626.2012.00129.x>
- Stoddard, S. F., Smith, B. J., Hein, R., Roller, B. R. K., & Schmidt, T. M. (2015). rrnDB: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Research*, 43(Database issue), D593-8. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1201>
- Sudhakara, P., Gupta, A., Bhardwaj, A., & Wilson, A. (2018). Oral Dysbiotic Communities and Their Implications in Systemic Diseases. *Dentistry Journal*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/dj6020010>
- Sulyanto, R. M., Beall, C. J., Ha, K., Montesano, J., Juang, J., Dickson, J. R., Hashmi, S. B., Bradbury, S., Leys, E. J., Edgerton, M., Ho, S. P., & Griffen, A. L. (2024). Fungi and bacteria occupy distinct spatial niches within carious dentin. *PLoS Pathogens*, 20(5), e1011865. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011865>
- Sun, B., Liu, B., Gao, X., Xing, K., Xie, L., & Guo, T. (2021). Metagenomic Analysis of Saliva Reveals Disease-Associated Microbiotas in Patients With Periodontitis and Crohn's Disease-Associated Periodontitis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 719411. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.719411>
- Sureda, A., Daglia, M., Argüelles Castilla, S., Sanadgol, N., Fazel Nabavi, S., Khan, H., Belwal, T., Jeandet, P., Marchese, A., Pistollato, F., Forbes-Hernandez, T., Battino, M., Berindan-Neagoe, I., D'Onofrio, G., & Nabavi, S. M. (2020). Oral microbiota and Alzheimer's disease: Do all roads lead to Rome?. *Pharmacological research*, 151, 104582. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104582>
- Svensäter, G., Borgström, M., Bowden, G. H. W., & Edwardsson, S. (2003). The acid-tolerant microbiota associated with plaque from initial caries and healthy tooth surfaces. *Caries Research*, 37(6), 395–403. <https://doi.org/10.1159/000073390>
- Szafrański, S. P., Deng, Z.-L., Tomasch, J., Jarek, M., Bhuju, S., Meisinger, C., Kühnisch, J., Sztajer, H., & Wagner-Döbler, I. (2015). Functional biomarkers for chronic periodontitis and insights into the roles of *Prevotella nigrescens* and *Fusobacterium nucleatum*; a metatranscriptome analysis. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 1, 15017. <https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2015.17>
- T. Martin Embley, Nazir Faquir, W. B. and M. D. C. (1989). *Lactobacillus vaginalis* sp. nov. from the Human Vagina. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39, 368–370. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/00207713-39-3-368>
- Taati Moghadam, M., Amirmozafari, N., Mojtahedi, A., Bakhshayesh, B., Shariati, A., & Masjedjan Jazi, F. (2022). Association of perturbation of oral bacterial with incident of Alzheimer's disease: A pilot study. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(7), e24483. <https://doi.org/10.1002/jcla.24483>
- Tadjoedin, F. M., Masulili, S. L. C., Rizal, M. I., Kusdhany, L. S., Turana, Y., Ismail, R. I., & Bachtiar, B. M. (2022). The Red and Orange Complex Subgingival Microbiome of Cognitive Impairment and Cognitively Normal Elderly with Periodontitis. *Geriatrics* (Basel, Switzerland), 7(1), 12. <https://doi.org/10.3390/geriatrics7010012>
- Takada, K., Hayashi, K., Sato, Y., & Hirasawa, M. (2010). *Prevotella dentasini* sp. nov., a black-pigmented species isolated from the oral cavity of donkeys. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(Pt 7), 1637–1639. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.017020-0>

- Takata, Y., Ansai, T., Soh, I., Sonoki, K., Awano, S., Hamasaki, T., Yoshida, A., Ohsumi, T., Toyoshima, K., Nishihara, T., & Takehara, T. (2009). Cognitive function and number of teeth in a community-dwelling elderly population without dementia. *Journal of oral rehabilitation*, 36(11), 808–813. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2009.01998.x>
- Takeuchi, K., Ohara, T., Furuta, M., Takeshita, T., Shibata, Y., Hata, J., Yoshida, D., Yamashita, Y., & Ninomiya, T. (2017). Tooth Loss and Risk of Dementia in the Community: the Hisayama Study. *Journal of the American Geriatrics Society*, 65(5), e95–e100. <https://doi.org/10.1111/jgs.14791>
- Takeuchi, Y., Umeda, M., Sakamoto, M., Benno, Y., Huang, Y., & Ishikawa, I. (2001). *Treponema socranskii*, *Treponema denticola*, and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severity of periodontal tissue destruction. *Journal of Periodontology*, 72(10), 1354–1363. <https://doi.org/10.1902/jop.2001.72.10.1354>
- Tanizawa, Y., Tada, I., Kobayashi, H., Endo, A., Maeno, S., Toyoda, A., Arita, M., Nakamura, Y., Sakamoto, M., Ohkuma, M., & Tohno, M. (2018). *Lactobacillus paragasseri* sp. nov., a sister taxon of *Lactobacillus gasseri*, based on whole-genome sequence analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(11), 3512–3517. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003020>
- Tanner, A. C. R., Mathney, J. M. J., Kent, R. L., Chalmers, N. I., Hughes, C. V., Loo, C. Y., Pradhan, N., Kanasi, E., Hwang, J., Dahlan, M. A., Papadopolou, E., & Dewhirst, F. E. (2011). Cultivable anaerobic microbiota of severe early childhood caries. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(4), 1464–1474. <https://doi.org/10.1128/JCM.02427-10>
- Tanner, A., Maiden, M. F., Macuch, P. J., Murray, L. L., & Kent, R. L. J. (1998). Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(2), 85–98. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1998.tb02414.x>
- Tavares, W. L. F., Neves de Brito, L. C., Teles, R. P., Massara, M. L. A., Ribeiro Sobrinho, A. P., Haffajee, A. D., Socransky, S. S., & Teles, F. R. (2011). Microbiota of deciduous endodontic infections analysed by MDA and Checkerboard DNA-DNA hybridization. *International Endodontic Journal*, 44(3), 225–235. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2010.01805.x>
- Teanpaisan, R., Piwat, S., & Dahlén, G. (2011). Inhibitory effect of oral *Lactobacillus* against oral pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 53(4), 452–459. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03132.x>
- Teixeira, F. B., Saito, M. T., Matheus, F. C., Prediger, R. D., Yamada, E. S., Maia, C. S. F., & Lima, R. R. (2017). Periodontitis and Alzheimer's Disease: A Possible Comorbidity between Oral Chronic Inflammatory Condition and Neuroinflammation. *Frontiers in aging neuroscience*, 9, 327. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00327>
- Tennert, C., Fuhrmann, M., Wittmer, A., Karygianni, L., Altenburger, M. J., Pelz, K., Hellwig, E., & Al-Ahmad, A. (2014). New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. *Journal of Endodontics*, 40(5), 670–677. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.10.005>
- ter Steeg, P. F., & van der Hoeven, J. S. (1990). Growth stimulation of *Treponema denticola* by periodontal microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek*, 57(2), 63–70. <https://doi.org/10.1007/BF00403156>
- Thomas, R. Z., Zijnge, V., Çiçek, A., de Soet, J. J., Harmsen, H. J. M., & Huysmans, M. C. D. N. J. M. (2012). Shifts in the microbial population in relation to in situ caries progression. *Caries Research*, 46(5), 427–431. <https://doi.org/10.1159/000339482>
- Thomson, C. A., Morgan, S. C., Ohland, C., & McCoy, K. D. (2022). From germ-free to wild: modulating microbiome complexity to understand mucosal immunology. *Mucosal Immunology*, 15(6), 1085–1094. <https://doi.org/10.1038/s41385-022-00562-3>

- Tiwari, S., Atluri, V., Kaushik, A., Yndart, A., & Nair, M. (2019). Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 5541–5554. <https://doi.org/10.2147/IJN.S200490>
- Toh, H., Hayashi, J.-I., Oshima, K., Nakano, A., Takayama, Y., Takanashi, K., Morita, H., & Hattori, M. (2015). Complete Genome Sequence of *Bifidobacterium dentium* Strain JCM 1195T, Isolated from Human Dental Caries. *Genome Announcements*, 3(2). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00284-15>
- Troci, A., Philippen, S., Rausch, P., Rave, J., Weyland, G., Niemann, K., Jessen, K., Schmill, L.-P., Aludin, S., Franke, A., Berg, D., Bang, C., & Bartsch, T. (2024). Disease- and stage-specific alterations of the oral and fecal microbiota in Alzheimer's disease. *PNAS Nexus*, 3(1), pgad427. <https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgad427>
- Turp, J. C., & Alt, K. W. (1995). Designating teeth: the advantages of the FDI's two-digit system. *Quintessence International* (Berlin, Germany : 1985), 26(7), 501–504.
- Tyrrell, K. L., Citron, D. M., Warren, Y. A., Nachnani, S., & Goldstein, E. J. C. (2003). Anaerobic bacteria cultured from the tongue dorsum of subjects with oral malodor. *Anaerobe*, 9(5), 243–246. [https://doi.org/10.1016/S1075-9964\(03\)00109-4](https://doi.org/10.1016/S1075-9964(03)00109-4)
- Uchida, A. (1981). Isolation and enumeration of mycoplasmas in dental plaques. *The Bulletin of Tokyo Medical and Dental University*, 28(4), 117–123.
- Uchida, A., Horikawa, T., Matsuura, M., & Watanabe, T. (1981). A preliminary study on isolation and enumeration of mycoplasmas in dental plaques: the effect of sonication on viability of oral mycoplasmas. *The Bulletin of Tokyo Medical and Dental University*, 28(4), 111–116.
- Uranga, C. C., Arroyo, P. J., Duggan, B. M., Gerwick, W. H., & Edlund, A. (2020). Commensal Oral *Rothia mucilaginosa* Produces Enterobactin, a Metal-Chelating Siderophore. *MSystems*, 5(2). <https://doi.org/10.1128/mSystems.00161-20>
- Usuga-Vacca, M., Marquez-Ortiz, R. A., Castellanos, J. E., & Martignon, S. (2024). Association of Root Biofilm Bacteriome with Root Caries Lesion Severity and Activity. *Caries Research*, 58(1), 39–48. <https://doi.org/10.1159/000535923>
- Uzel, N. G., Teles, F. R., Teles, R. P., Song, X. Q., Torresyap, G., Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2011). Microbial shifts during dental biofilm re-development in the absence of oral hygiene in periodontal health and disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(7), 612–620. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2011.01730.x>
- Valdez, R. M. A., Dos Santos, V. R., Caiaffa, K. S., Danelon, M., Arthur, R. A., Negrini, T. de C., Delbem, A. C. B., & Duque, C. (2016). Comparative in vitro investigation of the cariogenic potential of bifidobacteria. *Archives of Oral Biology*, 71, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.07.005>
- van Dyck, C. H., Swanson, C. J., Aisen, P., Bateman, R. J., Chen, C., Gee, M., Kanekiyo, M., Li, D., Reyderman, L., Cohen, S., Froelich, L., Katayama, S., Sabbagh, M., Vellas, B., Watson, D., Dhadda, S., Irizarry, M., Kramer, L. D., & Iwatsubo, T. (2023). Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *The New England journal of medicine*, 388(1), 9–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2212948>
- van Gylswyk, N. O., Hippe, H., & Rainey, F. A. (1997). *Schwartzia succinivorans* gen. nov., sp. nov., another ruminal bacterium utilizing succinate as the sole energy source. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(1), 155–159. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-1-155>
- Varatharaj, A., & Galea, I. (2017). The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 60, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.03.010>
- Velsko, I. M., Harrison, P., Chalmers, N., Barb, J., Huang, H., Aukhil, I., & Shaddox, L. (2020). Grade C molar-incisor pattern periodontitis subgingival microbial profile before and after treatment. *Journal of Oral Microbiology*, 12(1), 1814674. <https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1814674>

- Veras, E. L., Castro Dos Santos, N., Souza, J. G. S., Figueiredo, L. C., Retamal-Valdes, B., Barão, V. A. R., Shibli, J., Bertolini, M., Faveri, M., Teles, F., Duarte, P., & Feres, M. (2023). Newly identified pathogens in periodontitis: evidence from an association and an elimination study. *Journal of Oral Microbiology*, 15(1), 2213111. <https://doi.org/10.1080/20002297.2023.2213111>
- Vianna, M. E., Horz, H.-P., Gomes, B. P. F. A., & Conrads, G. (2005). Microarrays complement culture methods for identification of bacteria in endodontic infections. *Oral Microbiology and Immunology*, 20(4), 253–258. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2005.00221.x>
- Vieira Colombo, A. P., Magalhães, C. B., Hartenbach, F. A. R. R., Martins do Souto, R., & Maciel da Silva-Boghossian, C. (2016). Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. *Microbial Pathogenesis*, 94, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.09.009>
- Vieira, A. R., Hiller, N. L., Powell, E., Kim, L. H.-J., Spirk, T., Modesto, A., & Kreft, R. (2019). Profiling microorganisms in whole saliva of children with and without dental caries. *Clinical and Experimental Dental Research*, 5(4), 438–446. <https://doi.org/10.1002/cre2.206>
- Visentin, D., Gobin, I., & Maglica, Ž. (2023). Periodontal Pathogens and Their Links to Neuroinflammation and Neurodegeneration. *Microorganisms*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071832>
- Wang, M., Chen, J., Wang, Z., Wang, Y., Zhang, Y., Feng, Q., & Wei, F. (2024). Salivary microbiomes vary among orthodontic appliances and associate with clinical periodontal parameters. *Orthodontics & Craniofacial Research*, 27(1), 174–184. <https://doi.org/10.1111/ocr.12733>
- Wang, Y., Wang, S., Wu, C., Chen, X., Duan, Z., Xu, Q., Jiang, W., Xu, L., Wang, T., Su, L., Wang, Y., Chen, Y., Zhang, J., Huang, Y., Tong, S., Zhou, C., Deng, S., & Qin, N. (2019). Oral Microbiome Alterations Associated with Early Childhood Caries Highlight the Importance of Carbohydrate Metabolic Activities. *MSystems*, 4(6). <https://doi.org/10.1128/mSystems.00450-19>
- Wang, Y., Zhang, J., Ling, Z.-X., & Deng, S.-L. (2022). [Dynamic Microbial Shifts and Functional Analysis of Saliva Microbial Communities with Caries Children]. *Sichuan da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Sichuan University. Medical science edition*, 53(2), 242–249. <https://doi.org/10.12182/20220360103>
- Weber, C., Diltthey, A., & Finzer, P. (2023). The role of microbiome-host interactions in the development of Alzheimer's disease. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 13, 1151021. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1151021>
- Wen, Z. T., Huang, X., Ellepola, K., Liao, S., & Li, Y. (2022). Lactobacilli and human dental caries: more than mechanical retention. *Microbiology (Reading, England)*, 168(6). <https://doi.org/10.1099/mic.0.001196>
- Wensel, C. R., Pluznick, J. L., Salzberg, S. L., & Sears, C. L. (2022). Next-generation sequencing: insights to advance clinical investigations of the microbiome. *The Journal of Clinical Investigation*, 132(7). <https://doi.org/10.1172/JCI154944>
- West, S. R., Suddaby, A. B., Lewin, G. R., & Ibberson, C. B. (2024). *Rothia*. *Trends in Microbiology*, 32(7), 720–721. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2024.03.009>
- Wilkins, H. M., & Swerdlow, R. H. (2016). Relationships Between Mitochondria and Neuroinflammation: Implications for Alzheimer's Disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(8), 849–857. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150827095102>
- Willcox, M. D., Zhu, H., & Knox, K. W. (2001). *Streptococcus australis* sp. nov., a novel oral streptococcus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(Pt 4), 1277–1281. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-4-1277>
- Willis, S. G., Smith, K. S., Dunn, V. L., Gapter, L. A., Riviere, K. H., & Riviere, G. R. (1999). Identification of seven *Treponema* species in health- and disease-associated dental plaque by nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(3), 867–869. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.3.867-869.1999>

- Wolff, D., Frese, C., Schoilew, K., Dalpke, A., Wolff, B., & Boutin, S. (2019). Amplicon-based microbiome study highlights the loss of diversity and the establishment of a set of species in patients with dentin caries. *PloS One*, 14(7), e0219714. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219714>
- Wood, D. E., Lu, J., & Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology*, 20(1), 257. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>
- Wood, D. E., & Salzberg, S. L. (2014). Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biology*, 15(3), R46. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r46>
- Wu, Y.-F., Lee, W.-F., Salamanca, E., Yao, W.-L., Su, J.-N., Wang, S.-Y., Hu, C.-J., & Chang, W.-J. (2021). Oral Microbiota Changes in Elderly Patients, an Indicator of Alzheimer's Disease. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(8). <https://doi.org/10.3390/ijerph18084211>
- Wu, Z., Ni, J., Liu, Y., Teeling, J. L., Takayama, F., Collcutt, A., Ibbett, P., & Nakanishi, H. (2017). Cathepsin B plays a critical role in inducing Alzheimer's disease-like phenotypes following chronic systemic exposure to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 65, 350–361. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.06.002>
- Wyss, C., Choi, B. K., Schüpbach, P., Guggenheim, B., & Göbel, U. B. (1997). *Treponema amylovorum* sp. nov., a saccharolytic spirochete of medium size isolated from an advanced human periodontal lesion. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(3), 842–845. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-3-842>
- Xia, Y., & Sun, J. (2023). Beta Diversity Metrics and Ordination. In *Bioinformatic and Statistical Analysis of Microbiome Data* (pp. 335–395, Springer, Cham). https://doi.org/10.1007/978-3-031-21391-5_10
- Xie, C. (2012). Weighted multiple testing correction for correlated tests. *Statistics in Medicine*, 31(4), 341–352. <https://doi.org/10.1002/sim.4434>
- Xu, F., Laguna, L., & Sarkar, A. (2019). Aging-related changes in quantity and quality of saliva: Where do we stand in our understanding? *Journal of Texture Studies*, 50(1), 27–35. <https://doi.org/10.1111/jtxs.12356>
- Yamamoto, T., Kondo, K., Hirai, H., Nakade, M., Aida, J., & Hirata, Y. (2012). Association between self-reported dental health status and onset of dementia: a 4-year prospective cohort study of older Japanese adults from the Aichi Gerontological Evaluation Study (AGES) Project. *Psychosomatic medicine*, 74(3), 241–248. <https://doi.org/10.1097/PSY.0b013e318246dffb>
- Yang, B., Tao, B., Yin, Q., Chai, Z., Xu, L., Zhao, Q., & Wang, J. (2021). Associations Between Oral Health Status, Perceived Stress, and Neuropsychiatric Symptoms Among Community Individuals With Alzheimer's Disease: A Mediation Analysis. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13, 801209. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.801209>
- Yang, X., He, L., Yan, S., Chen, X., & Que, G. (2021). The impact of caries status on supragingival plaque and salivary microbiome in children with mixed dentition: a cross-sectional survey. *BMC Oral Health*, 21(1), 319. <https://doi.org/10.1186/s12903-021-01683-0>
- Yang, Y., Lv, J., Bai, H., Ren, L., Yang, J., Ding, Y., Liu, C., & Chen, X. (2023). Periodontal Status and Saliva Metabolic Signature in Patients with Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 95(2), 603–613. <https://doi.org/10.3233/JAD-230291>
- Yay, E., Yilmaz, M., Toygar, H., Balci, N., Alvarez Rivas, C., Bolluk Kilic, B., Zirh, A., Paster, B., & Kantarci, A. (2023). Parkinson's disease alters the composition of subgingival microbiome. *Journal of Oral Microbiology*, 15(1), 2250650. <https://doi.org/10.1080/20002297.2023.2250650>
- Yeo, K., Connell, J., Bouras, G., Smith, E., Murphy, W., Hodge, J.-C., Krishnan, S., Wormald, P.-J., Valentine, R., Psaltis, A. J., Vreugde, S., & Fenix, K. A. (2024). A comparison between full-length 16S rRNA Oxford nanopore sequencing and Illumina V3-V4 16S rRNA sequencing in head and neck cancer tissues. *Archives of Microbiology*, 206(6), 248. <https://doi.org/10.1007/s00203-024-03985-7>

- Yoo, J. J., Yoon, J. H., Kang, M. J., Kim, M., & Oh, N. (2019). The effect of missing teeth on dementia in older people: a nationwide population-based cohort study in South Korea. *BMC oral health*, 19(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s12903-019-0750-4>
- Yost, S., Duran-Pinedo, A. E., Teles, R., Krishnan, K., & Frias-Lopez, J. (2015). Functional signatures of oral dysbiosis during periodontitis progression revealed by microbial metatranscriptome analysis. *Genome Medicine*, 7(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0153-3>
- You, M., Chan, Y., Lacap-Bugler, D. C., Huo, Y.-B., Gao, W., Leung, W. K., & Watt, R. M. (2017). Oral treponeme major surface protein: Sequence diversity and distributions within periodontal niches. *Molecular Oral Microbiology*, 32(6), 455–474. <https://doi.org/10.1111/omi.12185>
- Yu, P.-S., Tu, C.-C., Wara-Aswapati, N., Wang, C.-Y., Tu, Y.-K., Hou, H.-H., Ueno, T., Chen, I.-H., Fu, K.-L., Li, H.-Y., & Chen, Y.-W. (2024). Microbiome of periodontitis and peri-implantitis before and after therapy: Long-read 16S rRNA gene amplicon sequencing. *Journal of Periodontal Research*, 59(4), 657–668. <https://doi.org/10.1111/jre.13269>
- Yuan, C., Leng, W., & Lei, Z. (2016). [Correlation analysis of Filifactor alocis detection with periodontal status]. *Hua xi kou qiang yi xue za zhi = Huaxi kouqiang yixue zazhi = West China journal of stomatology*, 34(1), 41–46. <https://doi.org/10.7518/hxkq.2016.01.009>
- Yue, Q., Yin, F.-T., Zhang, Q., Yuan, C., Ye, M.-Y., Wang, X.-L., Li, J.-J., & Gan, Y.-H. (2018). Carious status and supragingival plaque microbiota in hemodialysis patients. *PloS One*, 13(10), e0204674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204674>
- Zacarias Mendoza, N. V., Gamarra Valverde, N. N., & Robles Velarde, V. J. (2023). Challenges and Insights in *Aggregatibacter aphrophilus* endocarditis: a review of literature. *Archivos Peruanos de Cardiologia y Cirugia Cardiovascular*, 4(3), 102–108. <https://doi.org/10.47487/apcyccv.v4i3.306>
- Zargar, N., Ashraf, H., Marashi, S. M. A., Sabeti, M., & Aziz, A. (2020). Identification of microorganisms in irreversible pulpitis and primary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. *Clinical Oral Investigations*, 24(6), 2099–2108. <https://doi.org/10.1007/s00784-019-03075-9>
- Zhai, J.-J., Zou, J., & Lu, L.-Y. (2009). [Distribution of *Bifidobacterium* in oral cavities of children and the relations with caries]. *Hua xi kou qiang yi xue za zhi = Huaxi kouqiang yixue zazhi = West China journal of stomatology*, 27(6), 618–621.
- Zhang, C., Hou, B., Zhao, H., & Sun, Z. (2012). Microbial diversity in failed endodontic root-filled teeth. *Chinese Medical Journal*, 125(6), 1163–1168.
- Zhang, F., He, S., Jin, J., Dong, G., & Wu, H. (2015). Exploring salivary microbiota in AIDS patients with different periodontal statuses using 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5, 55. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00055>
- Zhang, X.-X., Tian, Y., Wang, Z.-T., Ma, Y.-H., Tan, L., & Yu, J.-T. (2021). The Epidemiology of Alzheimer's Disease Modifiable Risk Factors and Prevention. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, 8(3), 313–321. <https://doi.org/10.14283/jpad.2021.15>
- Zhang, Y., Zhen, M., Zhan, Y., Song, Y., Zhang, Q., & Wang, J. (2017). Population-Genomic Insights into Variation in *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* Isolates and Its Association with Periodontal Disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 409. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00409>
- Zhang, Y., Shen, Y., Liufu, N., Liu, L., Li, W., Shi, Z., Zheng, H., Mei, X., Chen, C.-Y., Jiang, Z., Abtahi, S., Dong, Y., Liang, F., Shi, Y., Cheng, L. L., Yang, G., Kang, J. X., Wilkinson, J. E., & Xie, Z. (2023). Transmission of Alzheimer's disease-associated microbiota dysbiosis and its impact on cognitive function: evidence from mice and patients. *Molecular Psychiatry*, 28(10), 4421–4437. <https://doi.org/10.1038/s41380-023-02216-7>

8 Anhänge

8.1 Einwilligungsbogen



LVR-Klinikum Düsseldorf
Kliniken der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf



LVR-Klinikverbund

Studienstelle: LVR-Klinikum Düsseldorf – Kliniken der Heinrich-Heine-Universität, Bergische Landstr. 2, 40629 Düsseldorf

Studienarzt:
.....

Tel.:

Informationsblatt zur Studie:

„Der Einfluss des oralen Mikrobioms auf die Pathophysiologie der Alzheimer-Krankheit“

Sehr geehrte Damen und Herren,

mit der vorliegenden Studie soll ein möglicher Zusammenhang von Keimen im Mundraum und der Entstehung der Alzheimer-Krankheit untersucht werden. Als „orales Mikrobiom“ bezeichnet man die Gesamtheit des mikrobiellen Lebens im menschlichen Mundraum. Es handelt sich um viele verschiedene Keimarten und setzt sich nach heutigem Kenntnisstand aus ca. 770 verschiedenen Bakterien-, Pilzen- und Viren zusammen. Mehrere Untersuchungen konnten einen Zusammenhang zwischen einer Entzündung des Zahnfleisches und vor allem dem daraus resultierenden Zahnverlust und kognitiver Einschränkungen (wie zum Beispiel der Alzheimer-Krankheit) zeigen. Wir möchten daher das komplexe Zusammenspiel zwischen den verschiedenen Mikroorganismen und der Krankheitsentstehung der Alzheimer Krankheit näher untersuchen. Hierfür möchten wir das orale Mikrobiom gesunder Probandinnen/en gegenüber Patientinnen/en mit leichten kognitiven Störungen oder Alzheimer Krankheit vergleichen.

Untersuchung

Wir würden daher mit Hilfe eines Wattebauschs an zwei verschiedenen Stellen (Wangenschleimhaut, Zahnfleisch) zur mikrobiologischen Diagnostik einen Abstrich vornehmen und Speichel entnehmen. Bei geöffnetem Mund wird an der Wangeninnhaut und dem Zahnfleisch entlanggestrichen. Risiken entstehen Ihnen dabei nicht. Zudem würden wir eine körperliche Untersuchung (Untersuchung auf körperliche Erkrankungen, Ernährungszustand, Erhebung des Zahnstatus etc.)

durchführen. Hierbei wird zum Beispiel auf das Vorliegen einer Entzündung des Zahnfleisches oder einer einliegenden Prothese untersucht.

Die gewonnenen Abstriche werden dann mit mikrobiologischen Verfahren untersucht. Diese mikrobiologischen Untersuchungen erfolgen durch Priv.-Doz. Dr. med. Dr. phil. Patrick Finzer und Dr. phil. Alexander Dilthey am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene Universitätsstraße 1, Gebäude 22.21 Heinrich-Heine-Universität, 40225 Düsseldorf. Zunächst soll die Zusammensetzung der Bakterien im Mundraum bestimmt werden. Darüber hinaus sollen auch Daten zur möglichen Funktion des Mikrobioms gewonnen werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen dann in Relation zu Patientinnen/en mit leichten kognitiven Störungen oder einer Alzheimer Krankheit gesetzt werden.

Diese Untersuchungen dienen ausschließlich der Grundlagenforschung. Ein unmittelbarer Nutzen aus solchen Untersuchungen ist für Sie selbst oder für die behandelnden Ärzte nicht zu erwarten. Die erhaltenen Daten werden jedoch möglicherweise in Zukunft zu verbesserten Diagnose- und Behandlungsmethoden führen.

Teilnahme an der Untersuchung

Die Untersuchungen werden nur dann durchgeführt, wenn Sie dazu freiwillig und schriftlich Ihre Einwilligung erklären. Sofern Sie die Untersuchungen nicht erlauben oder Ihre Einwilligung später widerrufen möchten, erwachsen Ihnen daraus selbstverständlich keine Nachteile. **Falls Sie sich zur Teilnahme an der Studie entscheiden, können Sie ebenso jederzeit, auch ohne Angabe von Gründen, Ihre Teilnahme beenden, ohne dass Ihnen dadurch irgendwelche Nachteile entstehen. Bitte kontaktieren Sie in diesem Fall Ihren Studienarzt (Name, Adresse und Telefonnummer siehe Kopfteil auf Seite 1 dieser Information) oder die Studienleiterin (Dr. med. J. Christl, LVR-Klinikum Düsseldorf, Bergische Landstr. 2, 40629 Düsseldorf, Tel. 0211-922 4204. Email: julia.christl@lvr.de).** Im Falle des Widerrufs können Sie entscheiden, ob Ihre Proben vernichtet werden sollen oder in anonymisierter Form (also ohne die Möglichkeit für den Studienarzt, weiterhin einen Bezug zwischen der Probe und Ihrer Person herzustellen) für weitere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden darf.

Informationen zum Datenschutz

Während dieser Studie werden medizinische Befunde von Ihnen erhoben und in der Prüfstelle in Ihrer persönlichen Akte niedergeschrieben oder elektronisch gespeichert. Rechtsgrundlage für die Verarbeitung ist Ihre freiwillige und ausdrückliche Einwilligung im Sinne des Art. 6 Abs. 1 S.1 lit. a, 9 Abs. 2 lit. a DSGVO. Die für die Studie wichtigen Daten werden in pseudonymisierter Form gespeichert und ausgewertet. Pseudonymisierung bedeutet, dass Ihr Name oder andere Identifikationsmerkmale durch einen Code ersetzt werden, um die Feststellung Ihrer Identität auszuschließen oder wesentlich zu erschweren. Dieser „Schlüssel“ (Verbindung zwischen Ihrem Namen bzw. Ihren Identifikationsmerkmalen und dem Code) wird getrennt von Ihren übrigen Befunden oder Informationen aufbewahrt. Zugang zu dem Schlüssel hat ausschließlich die Studienleiterin Dr. med. Julia Christl. Die ärztliche Schweigepflicht und datenschutzrechtliche Bestimmungen werden eingehalten.

Die Studienleitung wird alle angemessenen Schritte unternehmen, um den Schutz Ihrer Daten gemäß den Datenschutzstandards der Europäischen Union zu gewährleisten. Die Daten sind gegen unbefugten Zugriff gesichert. Eine Entschlüsselung erfolgt nur bei Rücktritt von der Studie Ihrerseits zum Zweck der Datenvernichtung. Sobald es nach dem Forschungszweck möglich ist, werden die personenbezogenen Daten anonymisiert, d.h. in der Weise verändert, dass eine Identifizierung Ihrer Person nicht mehr oder nur mit unverhältnismäßig großem Aufwand möglich sein wird.

Die während der Studie erhobenen Daten werden nach Studienabschluss für weitere 10 Jahre aufbewahrt. Die Proben werden 18 Monate nach Abschluss der Studie vernichtet. Die Daten werden ausschließlich zu Zwecken dieser Studie verwendet. Wir weisen darauf hin, dass bereits anonymisierte Daten/Proben und Daten, die in wissenschaftliche Auswertungen eingeflossen sind, nicht mehr auf Wunsch gelöscht bzw. vernichtet werden können.

Die Verantwortliche für die studienbedingte Erhebung personenbezogener Daten ist die Studienleiterin Dr. med. Julia Christl, LVR-Klinikum Düsseldorf, Bergische Landstr. 2, 40629 Düsseldorf, Tel. 0211-922 4205. Email: julia.christl@lvr.de.

Sie können als betroffene Person jederzeit die Ihnen durch die EU-DSGVO gewährten Rechte geltend machen:

- das Recht auf Auskunft, ob und welche Daten von Ihnen verarbeitet werden (Art. 15 EU-DSGVO),
- das Recht, die Berichtigung oder Vervollständigung der Sie betreffenden Daten zu verlangen (Art. 16 EU-DSGVO),
- das Recht auf Löschung der Sie betreffenden Daten nach Maßgabe des Art. 17 EU-DSGVO,
- das Recht, nach Maßgabe des Art. 18 EU-DSGVO eine Einschränkung der Verarbeitung der Daten zu verlangen,
- das Recht, eine erteilte Einwilligung jederzeit zu widerrufen. Die Rechtmäßigkeit der aufgrund der Einwilligung bis zum Widerruf erfolgten Verarbeitung wird dadurch nicht berührt (Art. 7 Abs. 3 EU-DSGVO),
- das Recht auf Widerspruch gegen eine künftige Verarbeitung der Sie betreffenden Daten nach Maßgabe des Art. 21 EU-DSGVO.

Bei Anliegen, Fragen oder Beschwerden zur Datenverarbeitung und zur Einhaltung der datenschutzrechtlichen Anforderungen wenden Sie sich bitte zunächst an die Studienleiterin des Prüfzentrums (Dr. med. Julia Christl, siehe oben).

Für weiterführende Fragen oder bei Problemen bzgl. des Datenschutzes können Sie sich an folgende Stellen wenden:

Datenschutzbeauftragte/r des Universitätsklinikums Düsseldorf

Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf

datenschutz@med.uni-duesseldorf.de

Im Falle einer rechtswidrigen Datenverarbeitung haben Sie das Recht, sich bei folgender Aufsichtsbehörde zu beschweren:

Landesbeauftragte für Datenschutz und Informationsfreiheit Nordrhein-Westfalen

Postfach 20 04 44, 40102 Düsseldorf

E-Mail: poststelle@ldi.nrw.de

Weitere Fragen?

Sollten Sie noch weitere Fragen haben, wenden Sie sich bitte an Ihren Studienarzt. Stellen Sie alle Fragen, die Ihnen wichtig erscheinen und lassen Sie sich ausreichend Zeit für Ihre Entscheidung zur Teilnahme an dieser zusätzlichen wissenschaftlichen Untersuchung.

Einwilligungserklärung zur Studie:

„Der Einfluss des oralen Mikrobioms auf die Pathophysiologie der Alzheimer-Krankheit“

Studienteilnehmer: _____ Teilnehmer-Nr.: _____
(Name, Vorname)

Geb.-Datum: _____

Hiermit willige ich zur Teilnahme an der wissenschaftlichen Untersuchung gemäß der vorstehenden Information ein. Durch meine Unterschrift bestätige ich, dass ich den Inhalt der Information gelesen und verstanden habe. Ich hatte Gelegenheit, Fragen zu stellen, die mir zufriedenstellend beantwortet wurden. Ich weiß, dass meine Teilnahme freiwillig ist und ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen kann. Im Falle des Widerrufs kann ich entscheiden, ob meine Proben vernichtet werden sollen oder in anonymisierter Form (also ohne die Möglichkeit für den Studienarzt, weiterhin einen Bezug zwischen der Probe und meiner Person herzustellen) für weitere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden dürfen. Im Fall eines Widerrufs entstehen mir keine Nachteile (Die Rechtmäßigkeit der Verarbeitung bis zum Widerruf bleibt unberührt).

Datenschutz:

Mir ist bekannt, dass bei diesem Forschungsvorhaben personenbezogene Daten, insbesondere medizinische Befunde über mich erhoben, gespeichert und ausgewertet werden sollen. Die Verwendung der Angaben über meine Gesundheit erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen und setzt vor der Teilnahme an dem Forschungsvorhaben folgende freiwillig abgegebene Einwilligungserklärung voraus, das heißt ohne die nachfolgende Einwilligung kann ich nicht an dem Forschungsvorhaben teilnehmen.

1. Ich willige ein, dass im Rahmen dieses Forschungsvorhabens personenbezogene Daten, insbesondere Angaben über meine Gesundheit, über mich erhoben und in Papierform sowie auf elektronischen Datenträgern im LVR-Klinikum Düsseldorf (in pseudonymisierter Form, siehe Informationsblatt) aufgezeichnet werden.
2. Ich bin darüber aufgeklärt worden, dass ich jederzeit die Teilnahme an dem Forschungsvorhaben beenden kann. Beim Widerruf meiner Einwilligung, an dem Forschungsvorhaben teilzunehmen, werden meine personenbezogenen Daten unverzüglich gelöscht.
3. Ich willige ein, dass meine Daten nach Beendigung oder Abbruch des Forschungsvorhabens 10 Jahre lang aufbewahrt werden. Danach werden meine personenbezogenen Daten gelöscht, soweit nicht gesetzliche, satzungsmäßige oder vertragliche Aufbewahrungsfristen entgegenstehen.

Eine Kopie dieser Information und Einwilligungserklärung habe ich erhalten. Das Original verbleibt in der Studienstelle.

Name des Studienteilnehmers / der Studienteilnehmerin in Druckbuchstaben

Ort, Datum (vom Teilnehmer/in einzutragen) Unterschrift Teilnehmer/in

Ich habe das Aufklärungsgespräch geführt und die Einwilligung des Studienteilnehmers / der Studienteilnehmerin eingeholt.

Name des Arztes / der Ärztin in Druckbuchstaben

Ort, Datum

Unterschrift des Arztes / der Ärztin

8.2. Merkblatt

Merkblatt für Teilnehmer der Studie „Der Einfluss des oralen Mikrobioms auf die Pathophysiologie der Alzheimer-Krankheit“

Sehr geehrte/r Teilnehmer/in

Viele Dank für Ihre Bereitschaft an der Studie „Der Einfluss des oralen Mikrobioms auf die Pathophysiologie der Alzheimer-Krankheit“ teilzunehmen.

Für die geplanten Untersuchungen und die Probenentnahme vereinbaren Sie einen Termin in der Tagesklinik (TAZ = Tagesklinik und Ambulanz Zentrum) am Universitätsklinikum Düsseldorf:

LVR Klinikum Düsseldorf
Kliniken der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Institutsambulanz Gerontopsychiatrie im TAZ
Gebäude 14.99 am Universitätsklinikum
Moorenstr. 5
40225 Düsseldorf
Tel. : 0211 - 922 4254
Fax : 0211 - 922 4264

Um einen reibungslosen Ablauf und eine aussagekräftige Probenentnahme zu ermöglichen, bitten wir Sie dabei, folgende Punkte zu beachten:

- Erscheinen Sie bitte pünktlich zu dem für Sie vereinbarten Termin. Sollten Sie Ihren Termin nicht wahrnehmen können, melden Sie dies bitte rechtzeitig per Telefon unter der oben aufgeführten Telefonnummer.
- Sollten Sie sich am Tag Ihres Termins krank, oder unwohl fühlen, oder falls Sie sich aus anderen Gründen nicht dazu im Stande sehen, zu Ihrem Termin zu erscheinen, bitten wir Sie darum, auch dies zeitnah telefonisch zu melden.
- Wir bitten Sie darum, **spätestens zwei Stunden vor Ihrem Termin** folgende Dinge zu beachten:
 - Nichts mehr essen und außer Wasser auch nichts mehr trinken
 - Keine Maßnahmen der Zahn- und Mundhygiene mehr vornehmen (darunter fallen Zähneputzen, die Verwendung von Zahnseide, das Ausspülen des Mundes mit Mundwasser, oder auch der Verzehr von (Zahnpflege-)Kaugummis oder Halsbonbons)

Die geplante Untersuchung wird im Detail wie folgt ablaufen:

- Zunächst werden Ihnen einige grundlegende Fragen zu bekannten Erkrankungen im Mundraum, sowie zur Zahn- und Mundhygiene gestellt.

- Anschließend findet eine einfache Untersuchung Ihres Mundraums statt. Dafür sitzen sie aufrecht auf einem Untersuchungsstuhl und müssen lediglich den Mund weit öffnen. Die Untersuchung umfasst
 - Eine Zählung der Zähne
 - Die Erhebung eines einfachen Tests auf Anzeichen einer Parodontitis. Für diesen Test wird mit einer sogenannten Parodontalsonde, einem dünnen Gerät mit stumpfer Spitze, einmal entlang Ihres Zahnfleisches am Zahn entlanggefahren. Liegt eine Parodontitis vor, kann das ein leichtes Zahnfleischbluten auslösen, ähnlich wie man es manchmal beim Putzen der Zähne beobachten kann. Die Untersuchung dauert nur wenige Minuten und verursacht keine wirklichen Schmerzen.



Parodontalsonde



Stumpfe Spitze

- Im Anschluss werden aus Ihrem Mund noch Proben entnommen: Ein Abstrich von den Zähnen, einer von der Wangeninnenseite und die Entnahme von Speichel.
 - Die Abstriche erfolgen mit Hilfe von Tupfern, die anschließend in ein Aufbewahrungsgefäß kommen. Für die Entnahme werden die Tupfer lediglich an Wange/Zahn gerieben.
 - Für das Entnehmen des Speichels müssen Sie diesen lediglich im Mund sammeln und anschließend mit Hilfe eines "Mundstücks" in ein Röhrchen gleiten lassen.



Tupfer



Speichelsammelhilfe

Für die Teilnahme an dieser Studie erhalten Sie als Entschädigung für Ihre Mühen ein Honorar von 40€ pro Teilnehmer, dass Ihnen als Bargeld unmittelbar nach der Untersuchung und Probenentnahme ausgezahlt wird. Dazu erhalten Sie außerdem eine entsprechende Quittung.

Wir bedanken uns vielmals für Ihre Unterstützung.

Bei weiteren Fragen zum Ablauf können Sie sich ebenfalls telefonisch in der Geronto-Ambulanz melden.

8.3 Checkliste

Checkliste Probandinnen/Probanden

Pseudonymisierte Probandennummer:

MMST > 27	☐ Ja	☐ Nein
Infekt der oberen Atemwege	☐ Ja	☐ Nein
Infekt des Mundraumes	☐ Ja	☐ Nein
Prothese	☐ Ja	☐ Nein
Körpergewicht		
Größe		
BMI		
Ausbildungsjahre		
Alter		
Neurologische/psychiatrische Erkrankungen:	☐ Ja	☐ Nein
Schlaganfall		
Multiple Sklerose		
Epilepsie		
Parkinson-Erkrankung		
Abhängigkeitserkrankung		
Schizophrenie		
Schwere körperliche Erkrankungen	☐ Ja	☐ Nein
Nikotinkonsum	☐ Ja	☐ Nein
Alkoholkonsum: Wie oft trinken Sie Alkohol?	Täglich	☐
	3-4/Woche	☐
	1-2/Woche	☐
	Seltener	☐

Medikation

8.4 Dokumentationsbogen

Dokumentationsbogen

Pseudonymisierte Probandennummer:

	ja	nein
2h vorher nicht gegessen/getrunken/ Zähne geputzt/Zahnseide, Mundwasser, Kaugummi, Halsbonbons genutzt?		
Checkliste erneut vollständig abgefragt?		
Bekannte Parodontitis-Problematik aktuell (beobachtetes Zahnfleischbluten)?		
Bekannte Parodontitis-Problematik in den letzten 10 Jahren (beobachtetes Zahnfleischbluten)?		
Professionelle Parodontitis-Behandlung in den letzten 10 Jahren?		
Bekannte Karies-Problematik aktuell?		
Bekannte Karies-Problematik in den letzten 10 Jahren?		
Professionelle Karies-Behandlung in den letzten 10 Jahren?		
Zahn-Extraktion in den letzten 10 Jahren?		
Prothese vorhanden?		
Falls ja, seit wie viel Jahren?		
Vorhandensein von mehr als vier Füllungen/Kronen?		
Wahrnehmung von Zahnarzt-Kontroll-Untersuchungen alle 6 Monate?		
Tägliches Zähne-Putzen/Zahnseide/Prothesen-Pflege?		
Vorhandensein von subjektiver Mundtrockenheit?		
Mund 10s mit Wasser ausgespült?		
Abstrich buccal entnommen?		
Abstrich supragingival entnommen?		
Saliva Zymo entnommen?		
Saliva nicht-Zymo entnommen?		

Zahnanzahl nach FDI-Schema (max. 28, ohne Weisheitszähne):

Sulkus-Blutungs-Index (siehe SBI-Bogen).

- Grad 1: Unter 10%
- Grad 2: 10 - 20%
- Grad 3: 21 - 50%
- Grad 4: Über 50%

8.5 Weitere Tabellen

Tabelle 22 Vergleich der Alpha-Diversität als Simpson-Index zwischen Patienten (Pat.) und Kontrollen (Kon.), getestet mit Mann-Whitney-U-Test ($\alpha = 0,05$).

Sequenzierung/Probenmaterial	Pat. (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)	Kon. (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)	p-Wert
Whole-Genome-Sequenzierung (n=44)	0,95 ($\pm$ 0,02)	0,95 ($\pm$ 0,03)	0,93
Short-Read-16S-Sequenzierung/Saliva (n=50)	0,97 ($\pm$ 0,01)	0,96 ($\pm$ 0,02)	0,20
Short-Read-16S-Sequenzierung/Supragingival (n=51)	0,93 ($\pm$ 0,04)	0,93 ($\pm$ 0,04)	0,88
Full-Length-16S-Sequenzierung/Saliva (n=50)	0,90 ($\pm$ 0,07)	0,90 ($\pm$ 0,04)	0,08
Full-Length-16S-Sequenzierung/Supragingival (n=51)	0,79 ($\pm$ 0,13)	0,82 ($\pm$ 0,12)	0,16

Tabelle 23 Vergleich der Alpha-Diversität als Shannon-Index zwischen Patienten (Pat.) und Kontrollen (Kon.), getestet mit T-Test für unabhängige Stichproben ($\alpha = 0,05$; signifikante Ergebnisse mit *)

Sequenzierung/Probenmaterial	Pat. (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)	Kon. (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung)	p-Wert	95%-KI
Whole-Genome-Sequenzierung (n=44)	3,74 ($\pm$ 0,25)	3,61 ($\pm$ 0,35)	0,15	-0,05; 0,33
Short-Read-16S-Sequenzierung/Saliva (n=50)	4,04 ($\pm$ 0,28)	3,85 ($\pm$ 0,32)	0,03*	0,02; 0,36
Short-Read-16S-Sequenzierung/Supragingival (n=51)	3,65 ($\pm$ 0,41)	3,65 ($\pm$ 0,49)	0,47	-0,26; 0,25
Full-Length-16S-Sequenzierung/Saliva (n=50)	3,27 ($\pm$ 0,52)	3,10 ($\pm$ 0,38)	0,07	-0,06; 0,45
Full-Length-16S-Sequenzierung/Supragingival (n=51)	2,38 ($\pm$ 0,58)	2,53 ($\pm$ 0,57)	0,18	-0,47; 0,17

Tabelle 24 Mit LEfSe identifizierte Taxa höherer phylogenetischer Ebenen der Full-Length-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben geordnet nach LDA-Score, Gruppenzugehörigkeit und Phylogenetik..

Taxon	Phylogenetik	Gruppe mit erhöhtem Vorkommen	LDA-Score (log10)
Leptotrichia	Genus	Patienten	3,80
Caphnocytophaga	Genus	Patienten	3,26
Ottowia	Genus	Patienten	2,80
Anaeroglobus	Genus	Patienten	2,80
Shuttleworthia	Genus	Patienten	2,05
Peptoniphilus	Genus	Patienten	2,04
Leptotrichiaceae	Familie	Patienten	3,87
Flavobacteriaceae	Familie	Patienten	3,19
Bifidobacteriaceae	Familie	Patienten	2,18
Flavobacteriales	Ordnung	Patienten	3,20
Bifidobacteriales	Ordnung	Patienten	2,12
Corynebacteriales	Ordnung	Patienten	2,10
Flavobacteriia	Klasse	Patienten	3,52

Tabelle 25 Mit LEfSe identifizierte Taxa höherer phylogenetischer Ebenen der Full-Length-16S-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben geordnet nach LDA-Score, Gruppenzugehörigkeit und Phylogenetik..

Taxon	Phylogenetik	Gruppe mit erhöhtem Vorkommen	LDA-Score (log10)
Schwartzia	Genus	Patienten	3,27
Anaeroglobus	Genus	Patienten	3,13
Lancefieldella	Genus	Patienten	2,42
Solobacterium	Genus	Patienten	2,36
Aggregatibacter	Genus	Kontrollen	-4,06
Hungateiclostridium	Genus	Kontrollen	-2,18
Atopobiaceae	Familie	Patienten	2,41
Erysipelotrichaceae	Familie	Patienten	2,38
Coriobacteriales	Ordnung	Patienten	2,41
Erysipelotrichales	Ordnung	Patienten	2,38
Coriobacteriia	Klasse	Patienten	2,41
Erysipelotrichia	Klasse	Patienten	2,38

Tabelle 26 Mit LEfSe identifizierte Taxa höherer phylogenetischer Ebenen der Short-Read-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben geordnet nach LDA-Score, Gruppenzugehörigkeit und Phylogenetik..

Taxon	Phylogenetik	Gruppe mit erhöhtem Vorkommen	LDA-Score (log10)
Leptotrichia	Genus	Patienten	4,03
Selenomonas	Genus	Patienten	3,54
Caphnocytophaga	Genus	Patienten	3,34
Dialister	Genus	Patienten	3,21
Olsenella	Genus	Patienten	2,88
Eikenella	Genus	Patienten	2,71
Anaeroglobus	Genus	Patienten	2,56
Schwartzia	Genus	Patienten	2,14
Filifactor	Genus	Kontrollen	-2,24
Haemophilus	Genus	Kontrollen	-3,78
Leptotrichiaceae	Familie	Patienten	4,01
Selenomonadaceae	Familie	Patienten	3,54
Flavobacteriaceae	Familie	Patienten	3,34
Selenomonadales	Ordnung	Patienten	3,54
Flavobacteriales	Ordnung	Patienten	3,35
Flavobacteriia	Klasse	Patienten	3,68

Tabelle 27 Mit LEfSe identifizierte Taxa höherer phylogenetischer Ebenen der Short-Read-16S-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben geordnet nach LDA-Score, Gruppenzugehörigkeit und Phylogenetik..

Taxon	Phylogenetik	Gruppe mit erhöhtem Vorkommen	LDA-Score (log10)
Bifidobacterium	Genus	Patienten	3,45
Lancefieldella	Genus	Patienten	3,43
Scardovia	Genus	Patienten	3,06
Schwartzia	Genus	Patienten	2,85
Aggregatibacter	Genus	Kontrollen	-3,44
Kingella	Genus	Kontrollen	-3,28
Lachnoanaerobaculum	Genus	Kontrollen	-3,03
Bifidobacteriaceae	Familie	Patienten	3,71
Atopobiaceae	Familie	Patienten	3,65
Bifidobacteriales	Ordnung	Patienten	3,74
Coriobacteriales	Ordnung	Patienten	3,61
Coriobacteriia	Klasse	Patienten	3,91

Tabelle 28 Mit ANCOM-BC2 identifizierte Taxa höherer phylogenetischer Ebenen der metagenomischen Sequenzierung von 50 salivaren Proben geordnet nach Log-fold-change. Aufgeführt sind außerdem die phylogenetische Ebene, der adjustierte p-Wert und das Ergebnis der Sensitivitätsanalyse mit aufsteigenden Pseudo-Counts.

Taxon	Phylogenetik	Log-fold-change	Standardfehler	p-Wert	Robust nach Sensitivitätsanalyse
Enterobacter	Genus	-5,28	0,31	0,01	FALSE
Luteimonas	Genus	-4,74	0,29	0,01	FALSE
Parascardovia	Genus	-1,73	0,25	0,01	FALSE
Ottowia	Genus	-1,31	0,22	0,03	FALSE
Filifactor	Genus	1,25	0,21	0,02	TRUE
Enterobacteriaceae	Familie	-2,73	0,36	<0,01	FALSE
Xanthomonadaceae	Familie	-1,74	0,28	0,01	FALSE
Enterococcaceae	Familie	1,18	0,28	0,02	TRUE
Xanthomonadales	Ordnung	-1,95	0,25	<0,01	FALSE

Tabelle 29 Mit ANCOM-BC2 identifizierte Taxa höherer phylogenetischer Ebenen der Full-Length-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben geordnet nach Log-fold-change. Aufgeführt sind außerdem die phylogenetische Ebene, der adjustierte p-Wert und das Ergebnis der Sensitivitätsanalyse mit aufsteigenden Pseudo-Counts.

Taxon	Phylogenetik	Log-fold-change	Standardfehler	p-Wert	Robust nach Sensitivitätsanalyse
Lactobacillus	Genus	-1,87	0,39	<0,01	FALSE
Limosilactobacillus	Genus	-1,26	0,26	0,01	FALSE
Schwartzia	Genus	-0,99	0,23	0,01	FALSE
Fretibacterium	Genus	-0,95	0,27	0,03	FALSE
Paludibacter	Genus	-0,85	0,18	0,01	FALSE
Candidatus Saccharimonas	Genus	0,77	0,17	0,03	FALSE
Pseudopropionibacterium	Genus	0,83	0,18	0,02	FALSE
Stomatobaculum	Genus	1,01	0,34	<0,05 (0,046)	FALSE
Pseudobutyrvibrio	Genus	1,41	0,22	<0,01	FALSE
Pseudoramibacter	Genus	1,97	0,17	0,02	FALSE
Lactobacillaceae	Familie	-2,33	0,41	<0,01	FALSE
Paludibacteraceae	Familie	-1,30	0,20	<0,01	FALSE
Spirochaetaceae	Familie	-1,15	0,31	0,01	FALSE
Ruminococcaceae	Familie	-1,13	0,19	0,04	FALSE
Synergistaceae	Familie	-1,10	0,30	0,01	FALSE
Spirochaetales	Ordnung	-1,20	0,32	0,02	FALSE
Synergistales	Ordnung	-1,07	0,31	0,03	FALSE

Spirochaetia	Klasse	-1,16	0,33	0,03	FALSE
Synergistia	Klasse	-1,01	0,33	<0,05 (0,047)	FALSE

Tabelle 30 Mit ANCOM-BC2 identifizierte Taxa höherer phylogenetischer Ebenen der Full-Length-16S-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben geordnet nach Log-fold-change. Aufgeführt sind außerdem die phylogenetische Ebene, der adjustierte p-Wert und das Ergebnis der Sensitivitätsanalyse mit aufsteigenden Pseudo-Counts.

Taxon	Phylogenetik	Log-fold-change	Standardfehler	p-Wert	Robust nach Sensitivitätsanalyse
Lactobacillus	Genus	-2,14	0,29	<0,01	FALSE
Limosilactobacillus	Genus	-1,50	0,31	0,03	FALSE
Hungateiclostridium	Genus	-0,94	0,20	0,03	TRUE
Tannerella	Genus	0,94	0,25	0,03	FALSE
Lachnoanaerobaculum	Genus	1,05	0,28	0,02	FALSE
Aggregatibacter	Genus	1,71	0,50	0,03	FALSE
Lactobacillaceae	Familie	-2,36	0,30	<0,01	FALSE
Synergistia	Klasse	-1,19	0,25	0,04	FALSE
Mollicutes	Klasse	-1,15	0,27	<0,05 (0,047)	FALSE
Erysipelotrichia	Klasse	-1,00	0,27	0,04	TRUE
Synergistetes	Phylum	-1,41	0,23	0,01	FALSE
Tenericutes	Phylum	-1,34	0,24	0,01	FALSE

Tabelle 31 Mit ANCOM-BC2 identifizierte Taxa höherer phylogenetischer Ebenen der Short-Read-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben geordnet nach Log-fold-change. Aufgeführt sind außerdem die phylogenetische Ebene, der adjustierte p-Wert und das Ergebnis der Sensitivitätsanalyse mit aufsteigenden Pseudo-Counts.

Taxon	Phylogenetik	Log-fold-change	Standardfehler	p-Wert	Robust nach Sensitivitätsanalyse
Bergeyella	Genus	-1,67	0,18	0,02	FALSE
Peptoniphilus	Genus	-0,92	0,21	0,04	TRUE
Marinilabilia	Genus	-0,80	0,17	0,02	FALSE
Gimesia	Genus	0,89	0,18	0,02	FALSE
Campylobacteraceae (genus-level)	Genus	1,10	0,28	0,02	FALSE
Microtholunatus	Genus	1,30	0,19	0,02	FALSE
Moraxella	Genus	1,32	0,25	0,02	FALSE
Sneathia	Genus	1,58	0,23	0,01	FALSE
Mannheimia	Genus	1,60	0,19	0,01	FALSE

Planctomycetales	Ordnung	0,94	0,19	0,02	FALSE
Sphingobacteriales	Ordnung	1,15	0,21	0,01	FALSE
Alphaproteobacteria	Klasse	-1,40	0,18	0,02	FALSE
Planctomycetia	Klasse	0,79	0,19	0,03	FALSE
Sphingobacteriia	Klasse	0,83	0,20	0,03	FALSE

Tabelle 32 Mit ANCOM-BC2 identifizierte Taxa höherer phylogenetischer Ebenen der Short-Read-16S-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben geordnet nach Log-fold-change. Aufgeführt sind außerdem die phylogenetische Ebene, der adjustierte p-Wert und das Ergebnis der Sensitivitätsanalyse mit aufsteigenden Pseudo-Counts.

Taxon	Phylogenetik	Log-fold-change	Standardfehler	p-Wert	Robust nach Sensitivitätsanalyse
Pyramidobacter	Genus	-2,74	0,20	<0,01	FALSE
Bacillus	Genus	-1,42	0,19	0,03	FALSE
Flavobacterium	Genus	-1,34	0,20	0,02	FALSE
Tissierellaceae (genus-level)	Genus	-1,23	0,18	0,03	FALSE
Peptoniphilus	Genus	-1,23	0,25	0,03	FALSE
Bergeriella	Genus	-1,09	0,20	0,02	TRUE
Howardella	Genus	-1,04	0,26	0,02	TRUE
Saccharicrinis	Genus	-0,91	0,19	0,04	FALSE
Propionivibrio	Genus	-0,89	0,22	0,03	FALSE
Lacrimispora	Genus	-0,86	0,22	0,02	FALSE
Flaviflexus	Genus	0,89	0,26	0,03	FALSE
Stenotrophomonas	Genus	0,91	0,17	0,02	FALSE
Bergeyella	Genus	0,99	0,24	0,03	FALSE
Mannheimia	Genus	1,03	0,22	0,02	FALSE
Syntrophococcus	Genus	1,14	0,35	0,03	FALSE
Cupriavidus	Genus	1,30	0,19	<0,01	FALSE
Kingella	Genus	1,34	0,44	0,03	TRUE
Faecalimonas	Genus	1,37	0,25	<0,01	FALSE
Desulfovibrio	Genus	1,48	0,30	0,01	FALSE
Parabacteroides	Genus	1,51	0,19	0,02	FALSE
Clostridiales (family-level)	Familie	-1,10	0,27	0,03	TRUE
Desulfovibrionaceae	Familie	1,52	0,30	0,02	FALSE
Chroococcidiopsidales	Ordnung	-1,48	0,20	0,03	TRUE
Rhodocyclales	Ordnung	-1,22	0,24	0,01	FALSE
Anaerolineales	Ordnung	-1,17	0,27	0,01	FALSE
Coriobacteriales	Ordnung	-1,13	0,34	0,03	TRUE
Legionellales	Ordnung	-0,92	0,25	0,04	FALSE

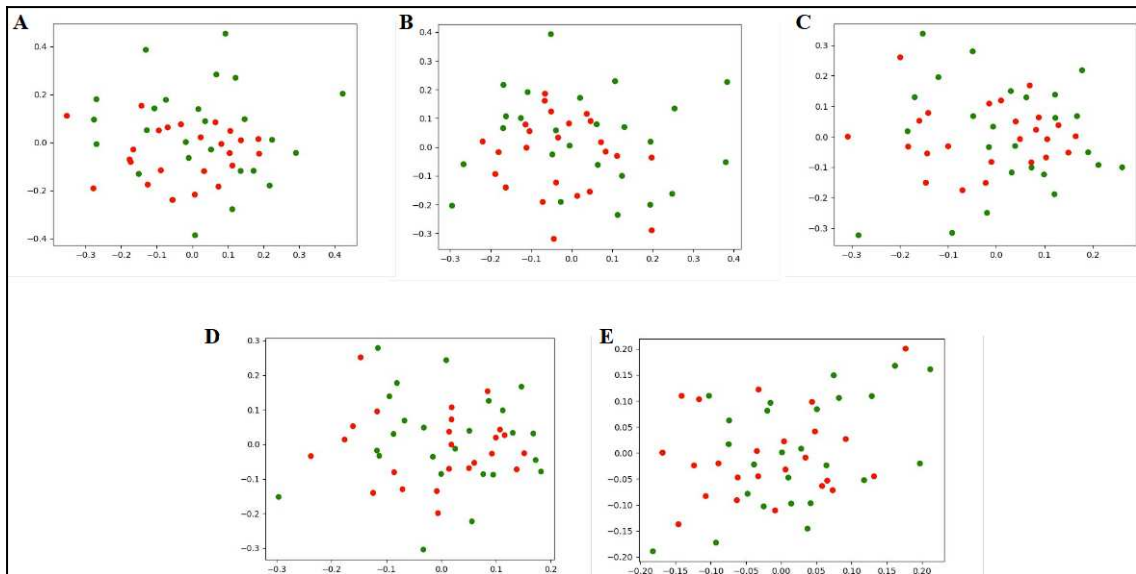
Thiotrichales	Ordnung	-0,79	0,19	0,03	FALSE
Desulfovibrionales	Ordnung	1,02	0,32	0,04	FALSE
Anaerolineae	Klasse	-1,02	0,28	0,04	FALSE

Tabelle 33 Taxa höherer phylogenetischer Ebenen aus salivaren und supragingivalen Proben der Full-Length- und Short-Read-16S-Sequenzierung, die mittels ANCOM-BC2 als strukturelle Nullen identifiziert wurden. Dargestellt sind Taxa, die in mindestens drei Proben identifiziert wurden. Aufgeführt sind die Gruppe, in der ein höheres Vorkommen identifiziert wurde, sowie die Anzahl an Probanden bei denen die Spezies identifiziert werden konnte.

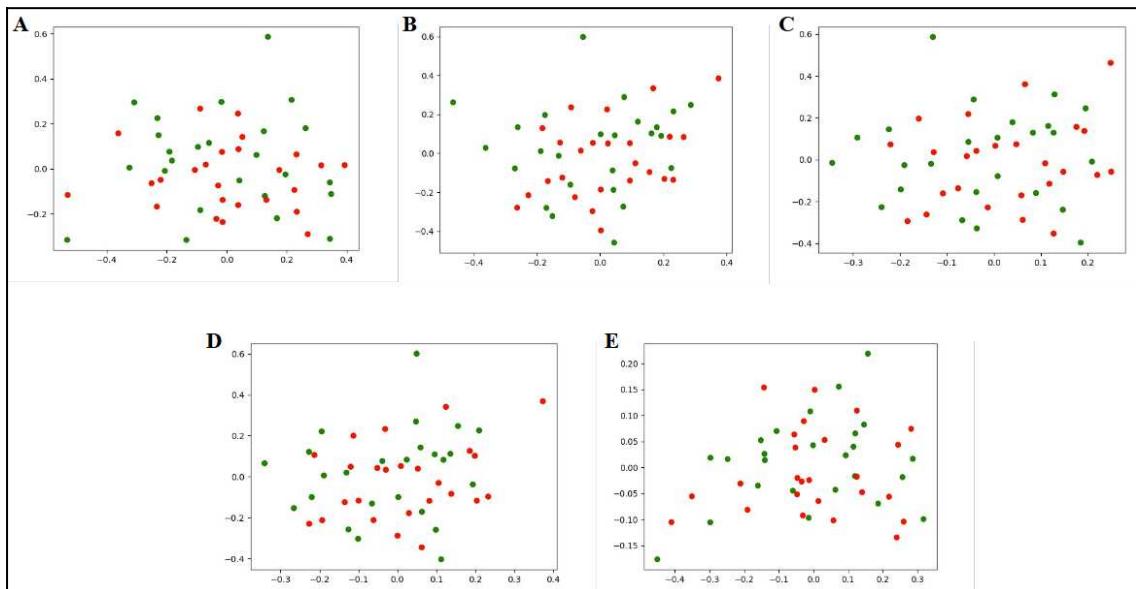
Taxon	Sequenzierung	Probenart	Phylogenetik	Gruppe mit erhöhtem Vorkommen	Anzahl Treffer
Peptoniphilus	Full-Length	Saliva	Genus	Patienten	4
Acidovorax	Full-Length	Saliva	Genus	Patienten	3
Propionibacterium	Full-Length	Saliva	Genus	Patienten	3
Alloscardovia	Full-Length	Saliva	Genus	Patienten	3
Ihubacter	Full-Length	Saliva	Genus	Patienten	3
Moryella	Full-Length	Saliva	Genus	Kontrollen	3
Arthrobacter	Full-Length	Saliva	Genus	Kontrollen	3
Lancefieldella	Full-Length	Supra	Genus	Patienten	5
Shuttleworthia	Full-Length	Supra	Genus	Patienten	3
Ottowia	Full-Length	Supra	Genus	Patienten	3
Atopobiaceae	Full-Length	Supra	Familie	Patienten	5
Coriobacteriales	Full-Length	Supra	Ordnung	Patienten	5
Coriobacteriia	Full-Length	Supra	Klasse	Patienten	5
Herbaspirillum	Short-Read	Saliva	Genus	Patienten	4
Lactiplantibacillus	Short-Read	Saliva	Genus	Patienten	4
Parapedobacter	Short-Read	Saliva	Genus	Patienten	3
Acidovorax	Short-Read	Saliva	Genus	Patienten	3
Cloacibacterium	Short-Read	Saliva	Genus	Patienten	3
Chroococcidiopsis	Short-Read	Saliva	Genus	Patienten	3
Fannyhessea	Short-Read	Saliva	Genus	Kontrollen	3
Oxalobacteraceae	Short-Read	Saliva	Familie	Patienten	4
Chroococcidiopsidaceae	Short-Read	Saliva	Familie	Patienten	3
Chroococcidiopsidales	Short-Read	Saliva	Ordnung	Patienten	3

Eubacterium	Short-Read	Supra	Genus	Patienten	5
Chroococcidiopsis	Short-Read	Supra	Genus	Patienten	5
Salmonella	Short-Read	Supra	Genus	Kontrollen	4
Longicatena	Short-Read	Supra	Genus	Patienten	3
Snodgrassella	Short-Read	Supra	Genus	Patienten	3

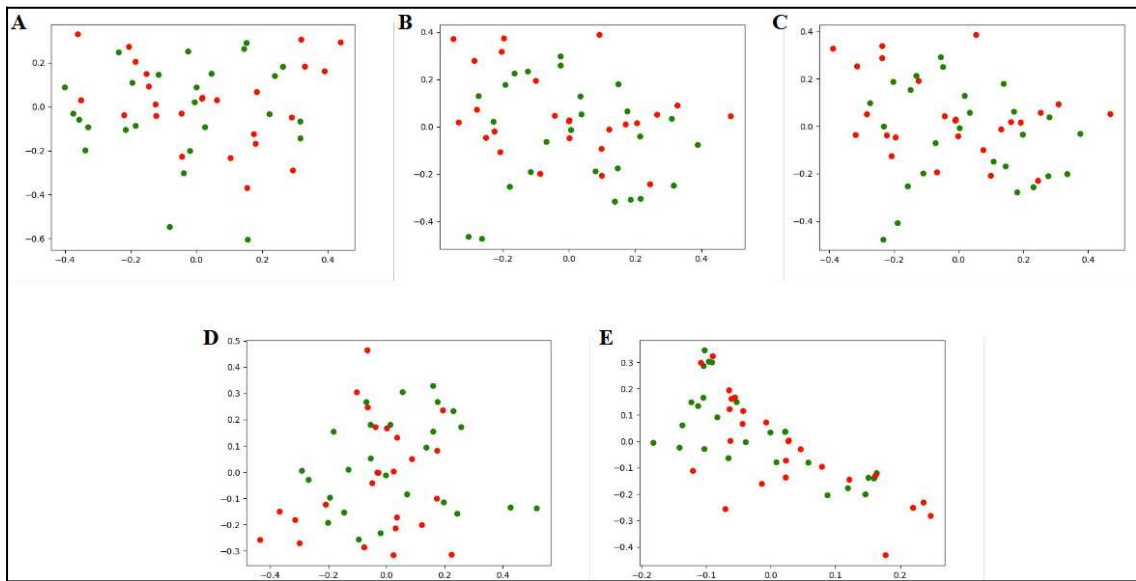
8.6 Weitere Graphen



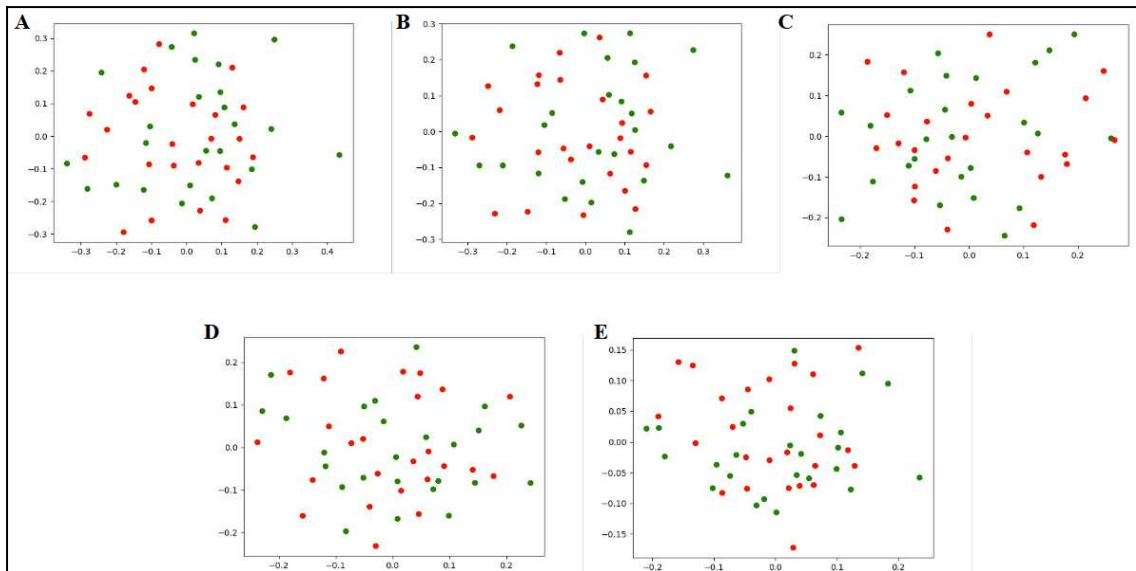
Figur 42 PCoAs basierend auf der Bray-Curtis-Dissimilarität der metagenomischen Sequenzierung von 50 salivaren Proben. Patienten sind in grün und Kontrollen in rot dargestellt. Von A-E sind die höheren phylogenetischen Ebenen Genus, Familie, Ordnung, Klasse und Phylum dargestellt.



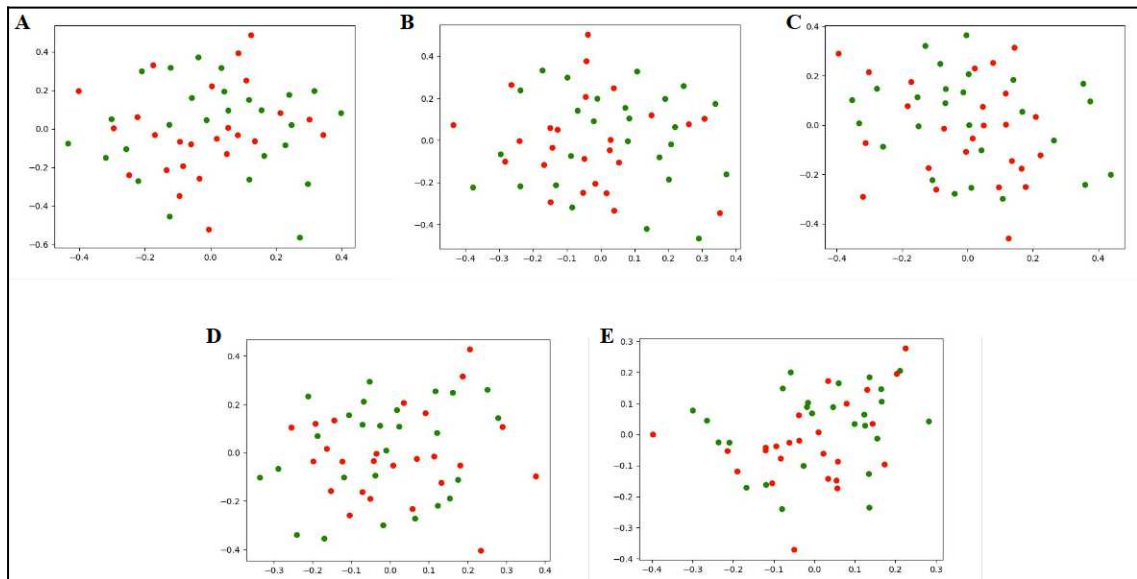
Figur 43 PCoAs basierend auf der Bray-Curtis-Dissimilarität der Full-Length-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben. Patienten sind in grün und Kontrollen in rot dargestellt. Von A-E sind die höheren phylogenetischen Ebenen Genus, Familie, Ordnung, Klasse und Phylum dargestellt.



Figur 44 PCoAs basierend auf der Bray-Curtis-Dissimilarität der Full-Length-16S-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben. Patienten sind in grün und Kontrollen in rot dargestellt. Von A-E sind die höheren phylogenetischen Ebenen Genus, Familie, Ordnung, Klasse und Phylum dargestellt.



Figur 45 PCoAs basierend auf der Bray-Curtis-Dissimilarität der Short-Read-16S-Sequenzierung von 50 salivaren Proben. Patienten sind in grün und Kontrollen in rot dargestellt. Von A-E sind die höheren phylogenetischen Ebenen Genus, Familie, Ordnung, Klasse und Phylum dargestellt.



Figur 46 PCoAs basierend auf der Bray-Curtis-Dissimilarität der 16S -Short-Read-Sequenzierung von 51 supragingivalen Proben. Patienten sind in grün und Kontrollen in rot dargestellt. Von A-E sind die höheren phylogenetischen Ebenen Genus, Familie, Ordnung, Klasse und Phylum dargestellt.

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Herrn Privatdozent Dr. Dr. Patrick Finzer, mit dem gemeinsam ich dieses Projekt planen durfte, der mich vom ersten Moment an gefördert und mir die Freiheit gegeben hat, meinen eigenen wissenschaftlichen Weg zu gehen.

Darüber hinaus bedanke ich mich herzlichst bei Frau Bettina Rhode, die maßgeblich die Patientenrekrutierung verantwortet hat und ohne die es kaum möglich gewesen wäre, eine ausreichende Probandenzahl zu gewinnen. In diesem Zug möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Daniel Wind und Frau Lisanna Hülse bedanken, die mich im Rahmen der Laborarbeit geschult und tatkräftig unterstützt werden. Genauso soll Frau Vasiliki Liakakou bedankt sein, die stets unkompliziert und hilfsbereit bei der Vorbereitung des zahnärztlichen Untersuchungsmaterial war. Auch Herr Dr.med.dent. Richard Hilger soll an dieser Stelle für seine Unterstützung beim Erlernen der zahnmedizinischen Untersuchung gedankt sein.

Großer Dank geht außerdem an Frau Dr.med Julia Christl und Herrn Prof. Dr.med Tillmann Supprian, sowie Herrn Prof. Dr. Alexander Diltthey, ohne deren Unterstützung die Umsetzung dieses Projektes nicht möglich gewesen wäre.

Abschließend gilt mein Dank der Deutschen Alzheimer Gesellschaft e.V. für die großzügige, finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.