

Aus der Klinik für Neurologie
(Direktorin: Prof. Dr. med. Daniela Berg)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Assoziation zwischen dem menschlichen Mikrobiom und
Gebrechlichkeit**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Katharina Frommhagen

aus Lüneburg

Kiel 2023

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Walter Maetzler, Klinik für Neurologie
2. Berichterstatter: Prof. Dr. André Franke,
Institut für Klinische Molekularbiologie

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2024

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 22.07.2024

gez.: Prof. Dr. Thorsten Bartsch, Klinik für Neurologie
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Einführung in das menschliche Mikrobiom	1
1.2 Aufbau der menschlichen Darm- und Mundhöhlen-Mikrobiota.....	5
1.3 Einfluss des Mikrobioms auf die Entstehung von Krankheiten	8
1.4 Das Mikrobiom geriatrischer Patient*innen.....	9
1.5 Gebrechlichkeit als geriatrisches Syndrom.....	11
1.6 Handhabung von Mikrobiomproben.....	12
2 Fragestellung	14
3 Methoden	15
3.1 Studiendesign	15
3.2 Aufbau der Biobank	16
3.3 Messinstrumente	17
3.3.1 Adaptation der Messinstrumente an das Gebrechlichkeits-Konzept.....	19
3.4 Durchführung	20
3.5 Statistische Analysen.....	21
4 Ergebnisse.....	24
4.1 Studienpopulation	24
4.2 Gruppeneinteilung	24
4.3 Alpha-Diversität	25
4.4 Beta-Diversität	29
4.5 Random Forest-Analyse	30
4.6 DESeq2-Analysen	33

5 Diskussion.....	35
5.1 Diversitätsunterschiede	35
5.2 Häufigkeitsunterschiede	39
5.3 Diskriminierungsfähigkeit von Stuhl- und Speichelproben.....	42
5.4 Herausforderungen im Umgang mit Bioproben	43
5.4.1 Patient*innen-bezogene Herausforderungen.....	44
5.4.2 Struktur-bedingte Herausforderungen.....	45
5.5 Limitationen der Studie	47
5.6 Ausblick	48
6 Zusammenfassung	50
Literaturverzeichnis	52
Anhang.....	60
Erklärung zum Eigenteil	62
Danksagung.....	63

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Bildliche Darstellung der Begriffe Mikrobiom, Mikrobiota Metagenom und Diversität	3
Abbildung 2	Ausschnitt aus dem Aufbau der menschlichen Darm- Mikrobiota	7
Abbildung 3	Entnahmezeitpunkte und Verarbeitungsschritte des Biomaterials zum Aufbau einer Biobank	17
Abbildung 4	Gruppeneinteilung	25
Abbildung 5	Darstellung von Richness (A), Chao-1-Index (B), Eveness (C) und Shannon-Index (D) der <i>frail</i> -Gruppe (türkis) und der <i>pre- frail</i> -Gruppe (rot) in a) Stuhlproben und b) Speichelproben	28
Abbildung 6	Die Verteilung der <i>frail</i> -Gruppe (rot) bzw. <i>pre-frail</i> -Gruppe (türkis) in der NMDS mit Bray-Curtis-Abstandsmaß	29
Abbildung 7	Die Verteilung von Speichelproben (rot) bzw. Stuhlproben (türkis) in der NMDS mit Bray-Curtis-Abstandsmaß	30
Abbildung 8	Die zehn wichtigsten Taxa zur Unterscheidung zwischen <i>frail</i> und <i>pre-frail</i> in a) Stuhlproben und b) Speichelproben	32
Abbildung 9	Darstellung der Ergebnisse der DESeq2-Analyse für die Betrachtung von Stuhlproben	34

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Einteilung von Bakterien in Taxa am Beispiel von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
Tabelle 2	Klinische und Demografische Daten	24
Tabelle 3	Indices der Alpha-Diversität für die Gruppen <i>frail</i> bzw. <i>pre-frail</i> in a) Stuhlproben und b) Speichelproben	27
Tabelle 4	Ergebnisse der DESeq2-Analyse aus Stuhlproben für die Testung <i>pre-frail</i> vs. <i>frail</i>	33

Abkürzungsverzeichnis

BMI	Body Mass Index
ComOn	COgnitive and Motor interactions in Older populatioNs
IKMB	Institute of Clinical Molecular Biology
IPAQ	International Physical Activity Questionnaire
LFC	LogFoldChange
MDG	Mean Decrease Gini
MNA	Mini Nutritional Assessment
MoCA	Montreal Cognitive Assessment
NMDS	Non Metric Multidimensional Scaling
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
padj	Adjustierter p-Wert
PERMANOVA	Permutational Analysis of Variance
SOP	Standard Operating Procedures
SPPB	Short Physical Performance Battery
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
UN	United Nations

1 Einleitung

1.1 Einführung in das menschliche Mikrobiom

Die heutige Weltbevölkerung lebt länger als ihre Vorfahren. Von 2015 bis 2050 wird sich der Anteil der über 60-jährigen Menschen auf der Erde nahezu verdoppelt haben (World Health Organization, 2022). Diese Veränderungen in der Alltagsstruktur bringen beachtliche Herausforderungen, vor allem für das Gesundheitswesen, mit sich. Die Sicherstellung der Versorgung älterer Patient*innen mit chronischen Erkrankungen bei gleichzeitigem Mangel an medizinischem Personal stellt eine große Aufgabe der heutigen Zeit dar (Robert Koch Institut, 2015). Gleichzeitig dürfen die Vorteile eines langen Lebens nicht unterschätzt werden. Die Älteren könnten sich auch nach dem Eintritt in das Rentenalter neuen Aufgaben widmen, sich beispielsweise in der Gemeinde engagieren oder in die eigene Weiterbildung investieren. Voraussetzung für ein engagiertes Altern ist eine gut erhaltene Gesundheit. Die Vereinten Nationen haben die Jahre 2021 bis 2030 als das „*UN Decade of Healthy Aging*“ deklariert. Es sollen Anreize auf unterschiedlichen Ebenen geschaffen werden, um das gesunde Leben älterer Menschen zu fördern (World Health Organization, 2022). Aber was führt dazu, dass Menschen unterschiedlich altern? Was oder wer entscheidet darüber, dass einige Ältere fit und gesund sind, währenddessen andere frühzeitig krank und gebrechlich werden? Alterungsprozesse sind abhängig von unterschiedlichen Einflüssen, wie zum Beispiel der Genetik, den Lebensgewohnheiten und vielerlei Umweltfaktoren, und nur bedingt durch das biologische Alter eines Menschen vorhersagbar. Zudem ist der Einfluss des menschlichen Mikrobioms auf die Entstehung von Erkrankungen Bestandteil aktueller wissenschaftlicher Forschung und soll auch hier näher betrachtet werden. Die Forschung vergangener Jahre hat gezeigt, dass offensichtlich enge Zusammenhänge zwischen dem Mikrobiom, dem Immunsystem und dem Stoffwechsel von Menschen bestehen. Veränderungen im Immunsystem und Stoffwechsel sind entscheidend am Alterungsprozess des Menschen beteiligt und lassen so auch eine Verbindung zwischen Veränderungen im Mikrobiom und der Entwicklung alterstypischer Erkrankungen naheliegend erscheinen. Wissenschaftler*innen sind sich einig, dass das Mikrobiom, neben den oben genannten Faktoren, als ein weiterer entscheidender Einflussfaktor auf den Alterungsprozess betrachtet werden muss (Larson et al., 2022; Nagpal et al., 2018).

Verallgemeinert beinhaltet das menschliche **Mikrobiom** die Mikroorganismen selbst (Bakterien, Viren, Pilze etc.), derer Genom und alle ergänzenden Umweltbedingungen wie beispielsweise der pH, in dem sie leben (Qian et al., 2020). Der Begriff **Mikrobiota** hingegen bezieht sich auf die Fülle von reinen Mikroorganismen in einem lokal abgegrenzten Gebiet. Beispielsweise beschreibt die Darm-Mikrobiota die Gesamtheit der Mikroorganismen im Darm und die Mundhöhlen-Mikrobiota die Mikroorganismen in der Mundhöhle (Ursell et al., 2012). Das **Metagenom** umfasst das Genom der Mikroorganismen (Qian et al., 2020). Einen bildlichen Überblick über die Begrifflichkeiten geben die Abbildungen 1A und 1B.

Hinsichtlich der taxonomischen Aufteilung von Bakterien gilt es folgendes festzuhalten: Im Jahre 1751 unternahm der schwedische Naturforscher Carl von Linné in seiner *Philosophia Botanica* einen ersten Versuch der systematischen Klassifizierung von Bakterien (Müller-Wille, 2001). Heute werden Lebewesen, u.a. Bakterien, nach den Regeln des „*International Code of Nomenclature of Prokaryotes*“ in folgende Gruppen eingeteilt: Stamm > Klasse > Ordnung > Familie > Gattung > Spezies. Ein Beispiel soll diese Einteilung verdeutlichen: *Proteobacteria* (Stamm) > *Gammaproteobacteria* (Klasse) > *Pseudomonadales* (Ordnung) > *Pseudomonadaceae* (Familie) > *Pseudomonas* (Gattung) > *Pseudomonas aeruginosa* (Spezies). Jede nach den Regeln eingeteilte Gruppe wird als Taxon (Plural: Taxa) bezeichnet (Parker et al., 2019). Tabelle 1 veranschaulicht dieses Prinzip.

Taxa

Stamm	<i>Proteobacteria</i>
Klasse	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordnung	<i>Pseudomonadales</i>
Familie	<i>Pseudomonadaceae</i>
Gattung	<i>Pseudomonas</i>
Spezies	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Tabelle 1: Einteilung von Bakterien in Taxa am Beispiel von *Pseudomonas aeruginosa*

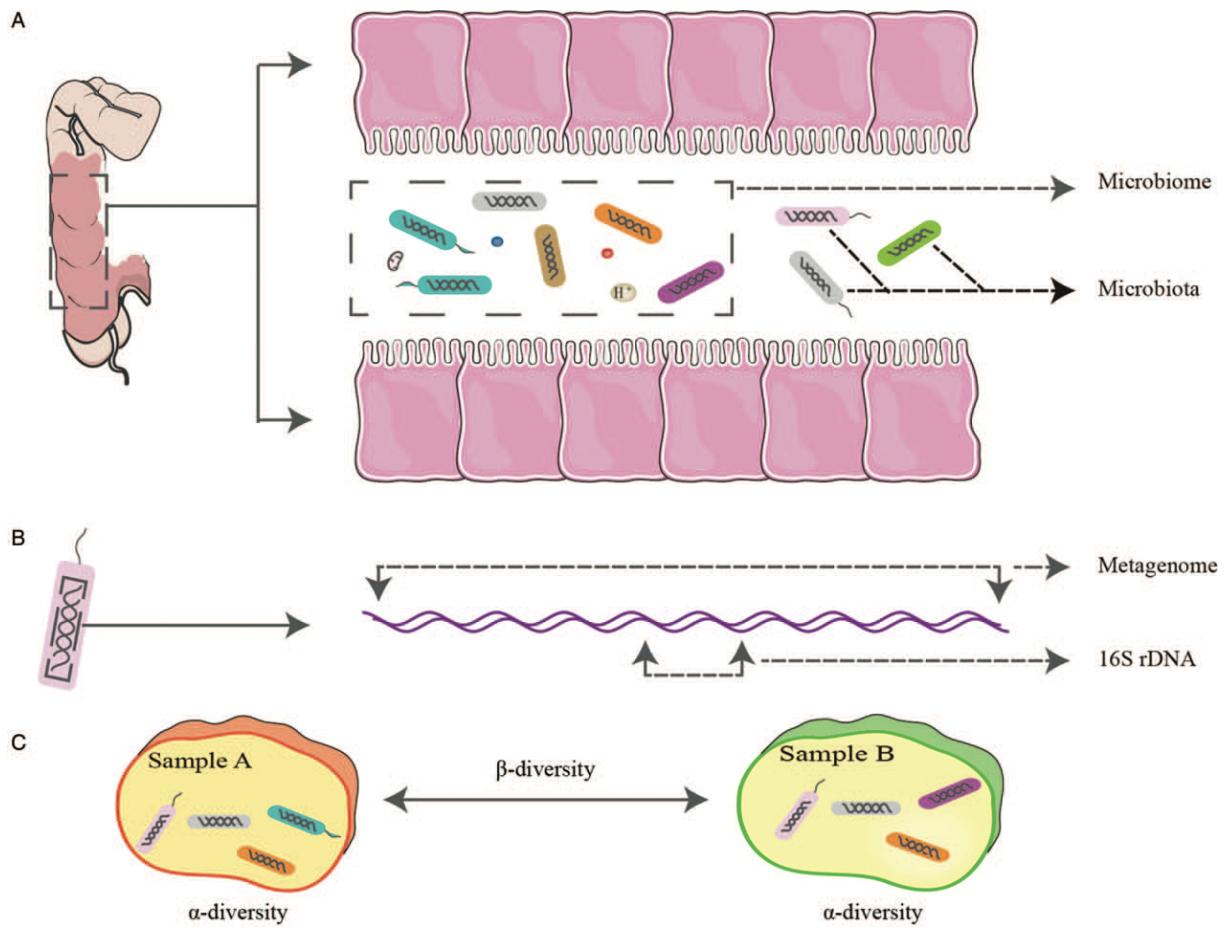


Abbildung 1: Bildliche Darstellung der Begriffe Mikrobiom, Mikrobiota, Metagenom und Diversität. A) Als Mikrobiom wird die Fülle an Mikroorganismen einschließlich deren Mikrobiom und umgebender Umweltbedingungen bezeichnetet (Qian et al., 2020). Die Mikrobiota umschreibt die Mikroorganismen in einem lokal abgegrenzten Bereich, hier Dickdarm-Mikrobiota (Ursell et al., 2012). B) Als Metagenom wird das Genom der Mikroorganismen bezeichnetet (Qian et al., 2020). Dieses kann z.B. mittels 16S rRNA-Sequenzierung analysiert werden (Woo et al., 2008). C) Darstellung der Alpha- und Beta-Diversität. Die Alpha-Diversität beschreibt die Fülle an Mikroorganismen in einer Probe (hier jeweils $\alpha=4$). Die Beta-Diversität spiegelt die Unterschiedlichkeit in der Zusammensetzung von Mikroorganismen mehrerer Proben wider (hier $\beta=2$, 2 Mikroorganismen (petrol und lila kommen nur in einer Probe vor) (Tijs et al., 2020).

Quelle: Qian et al., 2020

Das menschliche Mikrobiom besteht aus mehreren Trillionen Genen von Mikroorganismen. Das menschliche Genom hingegen aus vergleichsweise wenigen (20.000) protein-kodierenden Genen und ist somit ähnlich groß wie das einer Fruchtfliege (Turnbaugh et al., 2007). Das Mikrobiom unterliegt im Leben eines Menschen vielerlei Einflüssen (Kim & Jazwinski, 2018). Erste Kontakte mit Mikroorganismen finden bereits in der Gebärmutter statt. Auch der sich anschließende Geburtsvorgang, ob spontan oder per sectio, und die spätere Ernährung des Säuglings und Kleinkindes spielen eine maßgebliche Rolle bei der Besiedelung des Menschen mit Mikroorganismen. Im Alter von drei Jahren hat das Mikrobiom eine gewisse

Stabilität erreicht und gleicht in seiner Zusammensetzung dem eines Erwachsenen. Ist diese stabile Zusammensetzung des Mikrobioms erreicht, bleibt sie über einen langen Zeitraum erhalten (Cresci & Bawden, 2016). Die Variabilität innerhalb des Mikrobioms eines einzelnen Menschen (Intra-Variabilität) ist demnach in diesem Zeitraum gering. Die Variabilität im Mikrobiom zwischen unterschiedlichen Menschen (Inter-Variabilität) hingegen kann groß sein (Cresci & Bawden, 2016; Turnbaugh et al., 2007).

Mit steigendem biologischem Alter einer Person verliert das Mikrobiom an Stabilität. Die Gesamtmenge an Mikroorganismen (*Richness*) nimmt ab, die Anzahl gesundheitsschädigender Mikroorganismen hingegen steigt, sodass es insgesamt zur *Dysbiosis*, einer Störung im Mikrobiom, kommen kann. Eine *Dysbiosis* wiederum wird in der Literatur mit der Entwicklung von Erkrankungen im Alter und sogar einer reduzierten Lebenserwartung in Verbindung gebracht (Kim & Jazwinski, 2018).

In allen Lebensphasen des Menschen, vom Säuglingsalter bis ins höhere Alter, nimmt das Mikrobiom eines Menschen in vielfältiger Weise Einfluss auf dessen Gesundheit. Mikroorganismen sind an Stoffwechselprozessen oder am Aufbau von wichtigen Proteinkomplexen im menschlichen Körper beteiligt. Ebenso wirken sie bei der Aufnahme von Zuckern aus unverdaulichen Pflanzenbestandteilen mit. Die Vergärung unverdaulicher und somit per se energieloser Pflanzenbestandteile durch saccharolytische Mikroorganismen im Darm führt zur Entstehung kurzkettiger Fettsäuren, welche sich antiinflammatorisch auf den Körper auswirken. Außerdem dienen die entstandenen kurzkettigen Fettsäuren dem Menschen als Energiequelle (Qin et al., 2010). Ebenso entstehen bei der Vergärung unverdaulicher Nahrungsbestandteile durch Mikroorganismen Buttersäure oder Butyrat. Die Fähigkeit der Butyratproduktion einiger Mikroorganismen rückte in den vergangenen Jahren weiter in den Fokus der Mikrobiomforschung (Bui et al., 2016). Mehrere Forschungsgruppen konnten zeigen, dass Butyrat förderliche Effekte auf die Gesundheit des Menschen hat. So wurden Butyrat antikanzerogene, antiinflammatorische und antioxidative Eigenschaften nachgewiesen (Hinnebusch et al., 2002; Klampfer et al., 2003). Zu den Butyratproduzenten gehören unter anderem die Taxa *Intestinimonas* (Bui et al., 2016), *Roseburia inulinivorans* (Scott et al., 2006), *Faecalibacterium prausnitzii* (Duncan et al., 2002), *Oscillospira* (Gophna et al., 2017) und *Ruminococcus* (Louis & Flint, 2017). Außerdem sind viele Mikroorganismen entscheidend an der Aufnahme bestimmter Vitamine, an der Bildung eines Schutzfilms

der intestinalen Mucosa zum Schutz gegenüber pathogenen Erregern, an der Stärkung des Immunsystems oder auch an den Mechanismen zur Entstehung von Insulin-Resistenz beteiligt (Gomaa, 2020; Qin et al., 2010).

1.2 Aufbau der menschlichen Darm- und Mundhöhlen-Mikrobiota

Durch die Einführung der 16S rRNA-Sequenzierungsmethode in den 1970er Jahren wurde es der Wissenschaft ermöglicht, Bakterien aus unterschiedlichem Probenmaterial zu sequenzieren und in Stämme, Klassen, Ordnungen, Familien, Gattungen und Spezies zu klassifizieren. Die Methode ermöglicht speziespezifische Regionen der 16S rRNA zu erkennen und diese nach Amplifikation und Sequenzierung bestimmten Bakterien zuordnen zu können (Fox et al., 1977; Woo et al., 2008).

So wurde es möglich, den Aufbau verschiedener Mikrobiota zu analysieren. Dieser Abschnitt soll sich mit dem Aufbau der Darm- und Mundhöhlen-Mikrobiota beschäftigen. Einen allgemeingültigen Aufbau zu formulieren ist aufgrund der oben erwähnten hohen Inter-Variabilität der Mikrobiota zwischen unterschiedlichen Individuen nicht sinnvoll (Kim & Jazwinski, 2018). Dennoch soll hier ein Überblick über den Aufbau der Darm- und Mundhöhlen-Mikrobiota des Menschen gegeben werden.

Zum besseren Verständnis des Aufbaus soll jedoch vorher auf die Erläuterung dreier für diese Arbeit wichtiger Begriffe eingegangen werden: Die **Alpha-Diversität** beschreibt die Vielfältigkeit von Mikroorganismen in einer Probe. Aus der Alpha-Diversität kann abgeleitet werden, welche Taxa in welchen Mengen in einer Probe enthalten sind. Dabei wird jede Probe einzeln betrachtet. Die **Beta-Diversität** hingegen betrachtet die Unterschiede in der Zusammensetzung von Mikroorganismen mehrerer Proben (Tijs et al., 2020). Abbildung 1C stellt die Begriffe bildlich dar.

Die **Darm-Mikrobiota** zeigt die höchste Alpha- und Beta-Diversität und zudem größte Anzahl an unterschiedlichen Mikroorganismen im menschlichen Körper (Eckburg et al., 2005; Rackaityte & Lynch, 2020). Der Begriff **Abundanz** gibt die Anzahl an Taxa in einem abgegrenzten Gebiet an. Taxa mit einer höheren Abundanz sind häufiger vorhanden (Lexikon der Biologie, 1999).

In der Arbeit von Eckburg et al. (2005) wurde erstmals der Versuch unternommen die menschliche Darm-Mikrobiota zu katalogisieren. Hierzu wurden aus

Schleimhautproben des Dickdarms sowie Stuhlproben von drei gesunden Erwachsenen insgesamt 13.355 RNA-Gen-Sequenzen mittels 16S rRNA-Sequenzierung analysiert. Es konnte schon hier gezeigt werden, dass ein Großteil der Mikroorganismen den Stämmen *Bakteroidetes* und *Firmicutes* angehörten (Eckburg et al., 2005). Spätere Arbeiten konnten bestätigen, dass durch die beiden Bakterienstämme *Bakteroidetes* und *Firmicutes* über 90% der menschlichen Darm-Mikrobiota repräsentiert werden. Zudem bestätigte eine Analyse von 18.348 RNA-Gensequenzen, gewonnen aus Stuhlproben von 14 Erwachsenen, eine hohe Inter-Variabilität des Mikrobioms bei zeitgleicher Stabilität jeder einzelnen Probe (Ley et al., 2006; Turnbaugh et al., 2007).

Die folgende Klassifizierung der Darm-Mikrobiota erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit und dient lediglich dem weiteren Verständnis dieser Arbeit. Ein Überblick bietet Abbildung 2.

Den größten Anteil des Bakterienstamms *Bakteroidetes* macht die Klasse der *Bakteroidia* aus. Für die menschliche Darm-Mikrobiota ist die weitere Aufteilung in die Ordnung *Bakteroidales*, die Bakterienfamilien *Prevotellaceae* und *Porphyromonadaceae* und die Genera *Prevotella* und *Porphyromonas* von Interesse.

Die Klasse der *Clostridia* machen mit 95% den größten Anteil der *Firmicutes* aus. Dazu gehört die Ordnung der *Clostridiales*, wozu die Familien *Lachnospiraceae* und *Ruminococcaceae* zählen. Zu den *Ruminococcaceae* gehören unter anderem die bereits erwähnten Taxa *Intestinimonas*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Oscillospira* und *Ruminococcus*. Viele Taxa der genannten Bakterienfamilien sind Butyratproduzenten, dessen Eigenschaften bereits weiter oben beschrieben worden sind. Ein wesentlicher Butyratproduzent ist das Bakterium *Intestinimonas*, welches die Aminosäure Lysin vollständig zu Butyrat abbauen kann (Bibbò et al., 2016; Bui et al., 2016; Chung, 2017; Eckburg et al., 2005; Gomaa, 2020).

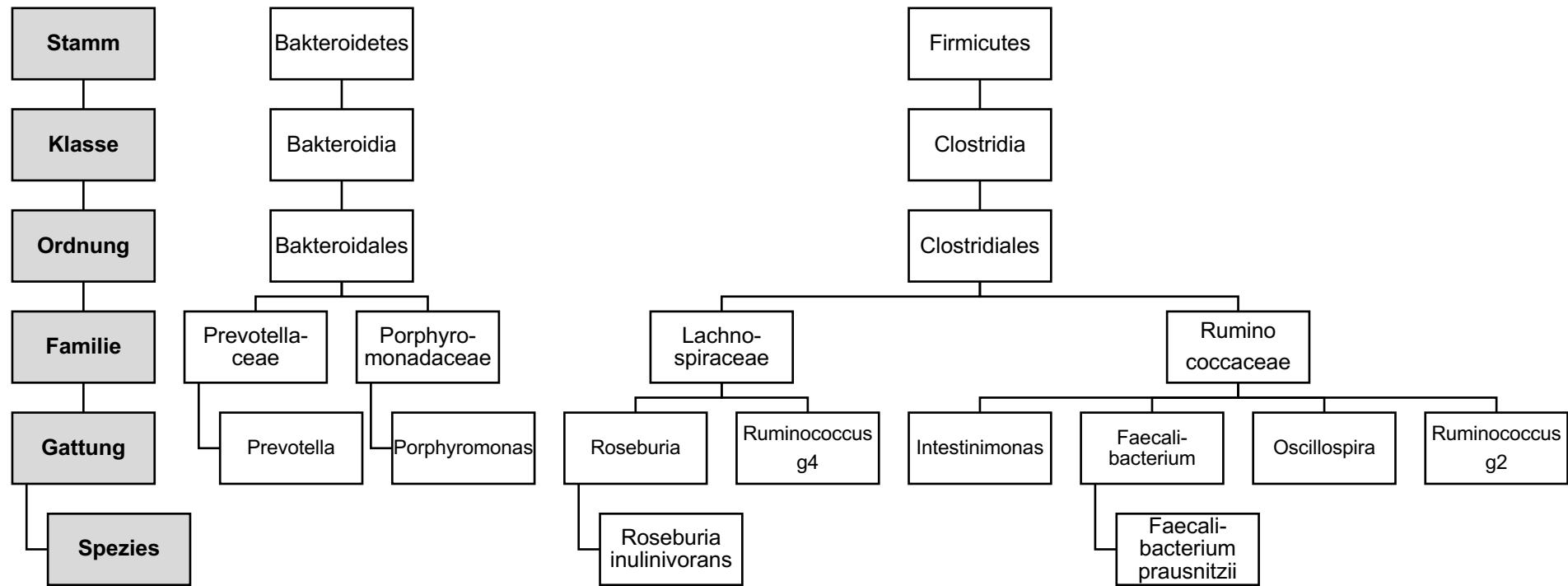


Abbildung 2: Ausschnitt aus dem Aufbau der menschlichen Darm-Mikrobiota (Abbildung adaptiert nach (Bibbò et al., 2016; Bui et al., 2016; Chung, 2017; Eckburg et al., 2005; Gomaa, 2020))

Die **Mundhöhlen-Mikrobiota** stellt, nach der Darm-Mikrobiota, die Mikrobiota mit den zweitmeisten Mikroorganismen im menschlichen Körper. Entgegen der Darm-Mikrobiota, welche zu über 90% aus den Stämmen *Bakteroidetes* und *Firmicutes* besteht, kann die Mundhöhlen-Mikrobiota in sechs wesentliche Bakterienstämme unterteilt werden. Zu diesen gehören, neben *Firmicutes* (38%) und *Bakteroidetes* (17%), die Stämme *Proteobacteria* (17%), *Actinobacteria* (12%), *Spirochaetes* (8%) und *Fusobacteria* (5%). Zu den häufigsten Vertretern des Bakterienstammes *Firmicutes* gehören die Taxa *Streptococcus* und *Veillonella* (Verma et al., 2018). Wie bereits bei der Darm-Mikrobiota gezeigt, zeigt auch die Mundhöhlen-Mikrobiota über einen langen Zeitraum eine gewisse Stabilität (Takeshita et al., 2016). Trotz dessen die Mundhöhlen-Mikrobiota täglichen wiederkehrenden „Störfaktoren“, wie der Mundpflege oder Nahrungsaufnahme, ausgesetzt ist, herrscht auch hier bei gesunden Menschen eine schützende Homöostase im Mundhöhlen-Mikrobiom. Bereits vier bis sechs Stunden nach der Mundpflege kann ein entstandener Biofilm aus Bakterien auf den Zähnen gezeigt werden. Angeführt wird diese Kolonisation von der Gattung *Streptococcus* (Verma et al., 2018).

1.3 Einfluss des Mikrobioms auf die Entstehung von Krankheiten

In Abschnitt 1.1 wurde dargestellt, dass sowohl die Darm- als auch die Mundhöhlen-Mikrobiota eine gewisse Beständigkeit zeigt. Die Forschung vergangener Jahre widmete sich zunehmend den Auswirkungen einer *Dysbiosis* im Darm und Mundraum auf den Menschen. Die Interaktion zwischen den Mikroorganismen und dem Menschen rückte in den Mittelpunkt der Mikrobiomforschung. Eine Reihe von Studien zeigen, dass eine Veränderung in den genannten Mikrobiota, und damit auch eine Veränderung der durch die Mikroorganismen produzierten Metaboliten, an der Entstehung von Erkrankungen beteiligt sind (Kataoka, 2016; Rackaityte & Lynch, 2020; Verma et al., 2018; Wang et al., 2011).

Veränderungen in der **Darm-Mikrobiota** entstehen auf vielfältige Art und Weise. Eine veränderte Darmmotilität, Verdauungsbeschwerden, Stress, die Einnahme von Medikamenten, besonders Antibiotika, oder eine verminderte Nahrungsaufnahme stellen nur eine kleine Auswahl von Gründen für eine veränderte Darm-Mikrobiota dar. Diese Faktoren treten insbesondere bei älteren Menschen auf. Tendenziell ist daher die Variabilität im Mikrobiom bei älteren Menschen größer. Zudem kann es zu einer

Abnahme der Diversität, bis hin zur *Dysbiosis* kommen, welche mit weiteren Folgen auf den gesamten Organismus einhergehen kann (Zhang et al., 2019). Diese altersbedingten Veränderungen im Mikrobiom können bei der Entstehung von Krankheiten maßgeblich beteiligt sein. In der Literatur werden Zusammenhänge zwischen der veränderten mikrobiellen Komposition im Darm eines Menschen und unterschiedlichsten Diagnosen wie Übergewicht, Diabetes mellitus, Allergien bis hin zu Tumorerkrankungen und komplexen klinischen Syndromen wie *Gebrechlichkeit* beschrieben (Cresci & Bawden, 2016; Zhang et al., 2019).

Die **Mundhöhlen-Mikrobiota** eines Menschen ist noch weiteren äußeren Faktoren ausgesetzt. Neben den bereits oben genannten Einflussfaktoren wie Stress und Medikamenteneinnahme (Zhang et al., 2019), können außergewöhnliche Nahrungsgewohnheiten, der Genuss von Alkohol und Nikotin oder eine vernachlässigte Mundpflege und damit einhergehende Plaquebildung, Zahnverlust, Zahnfleischbluten oder die Bildung von Zahnfleischtaschen einen direkten Einfluss auf die Zusammensetzung von Mikroorganismen im Mundraum nehmen (Takeshita et al., 2016; Verma et al., 2018). Eine Reihe von Wissenschaftler*innen haben einen Zusammenhang zwischen einer veränderten Mundhöhlen-Mikrobiota und der Entwicklung verschiedenster Tumorerkrankungen in der Mundhöhle zeigen können (Mager et al., 2005; Pushalkar et al., 2012; Verma et al., 2018). Aber auch die Entstehung von beispielsweise Diabetes mellitus, Übergewichtigkeit, kardiovaskulärer Erkrankungen, gastrointestinaler Ulzera oder der Entwicklung der Alzheimer-Demenz können durch eine Veränderung der Mundhöhlen-Mikrobiota begünstigt werden (Ahn et al., 2012; Casarin et al., 2013; Dominy et al., 2019; Takeshita et al., 2016; Verma et al., 2018; Willis & Gabaldón, 2020).

Die vielfältigen Zusammenhänge zwischen Veränderungen im Mikrobiom und der Entwicklung von Erkrankungen unterstreicht die Wichtigkeit der Sammlung von Biomaterial für die Mikrobiomforschung, vor allem bei älteren Patient*innen.

1.4 Das Mikrobiom geriatrischer Patient*innen

Abschnitt 1.3 hat an Beispielen gezeigt, dass das Mikrobiom eines Menschen vielerlei Einflüssen unterliegt. Während es sich in jungen Lebensjahren meist als stabil erweist, sind bei älteren Menschen häufig Veränderungen im Mikrobiom zu beobachten (Kim

& Jazwinski, 2018; Nagpal et al., 2018). Zum Verständnis dieser Arbeit soll an dieser Stelle eine Definition des Begriffs „geriatrische*r Patient*in“ erfolgen. Laut Definition zählen zu den geriatrischen Patient*innen entweder jene mit einer für den älteren Menschen typischen Multimorbidität und einem erhöhten Lebensalter (meist 70 Jahre und älter) oder Patient*innen mit einem Lebensalter ab 80 Jahren und einer erhöhten *Gebrechlichkeit* aufgrund unterschiedlichster Umstände wie Auftreten von Komplikationen nach einer Erkrankung (Sieber, 2007). Das klinische Syndrom *Gebrechlichkeit* stellt ein häufiges Syndrom innerhalb dieser Kohorte dar. Patient*innen mit erhöhter *Gebrechlichkeit* sind vulnerabler und zeigen sich insgesamt weniger widerstandsfähig gegenüber Krankheiten und Umgebungs faktoren. Insgesamt steigt bei Patient*innen mit erhöhter *Gebrechlichkeit* das Risiko, Selbstständigkeit einzubüßen oder zu sterben (Maetzler et al., 2016). Exakte Definitionskriterien des geriatrischen Syndroms *Gebrechlichkeit* finden sich in Abschnitt 1.5.

Weiter oben (siehe Abschnitt 1.3) wurde bereits beschrieben, dass alterstypische Veränderungen im Mikrobiom, wie die Abnahme der Diversität, zur Entwicklung von Erkrankungen beitragen können (Cresci & Bawden, 2016; Nagpal et al., 2018; Zhang et al., 2019). Auch die Begünstigung der Entstehung von *Gebrechlichkeit* bei älteren Menschen durch die veränderte Zusammensetzung des Mikrobioms wird diskutiert. Studien konnten Unterschiede in der Diversität zwischen Patient*innen mit *Gebrechlichkeit* und Kontrollpersonen zeigen (Jackson et al., 2016; Larson et al., 2022; Ogawa et al., 2018; Picca et al., 2020; Zhang et al., 2019). Auch Abundanzunterschiede in den Mikrobiota von Personen mit und ohne *Gebrechlichkeit* oder anderen geriatrischen Syndromen waren in der Vergangenheit Gegenstand medizinischer Forschung (Jackson et al., 2016; Larson et al., 2022; Picca et al., 2020; Van Tongeren et al., 2005; Zhang et al., 2019).

Insgesamt existieren jedoch unseres Wissens nach wenige Untersuchungen, welche sich standardisiert mit der Darm- und Mundhöhlen-Mikrobiota geriatrischer Patient*innen, vor allem in Bezug auf das klinische Syndrom *Gebrechlichkeit*, beschäftigen. Insbesondere der vergleichenden Analyse beider Mikrobiota von Patient*innen im stationären Setting ist bisher nach unserem Wissen wenig nachgegangen worden. Uns ist bisher nur eine Studie bekannt, welche sich mit der Darm-Mikrobiota von hospitalisierten Patient*innen beschäftigte (Zhang et al., 2019),

allerdings bleibt hier der Vergleich zur Mundhöhlen-Mikrobiota aus, wie es in unserer Untersuchung stattgefunden hat.

1.5 Gebrechlichkeit als geriatrisches Syndrom

Dieser Abschnitt soll exakte Diagnosekriterien für das geriatrische Syndrom *Gebrechlichkeit* liefern. Fried et al. (2001) beschrieben *Gebrechlichkeit* erstmals als ein geriatrisches Syndrom mit definierten Kriterien, was sehr wahrscheinlich immer noch die meist-verwendete Definition des Syndroms in der wissenschaftlichen Literatur ist. Laut derer Definition gilt jene Person als *frail* (dt. gebrechlich), die drei oder mehr der folgenden Kriterien erfüllt: unbeabsichtigter Gewichtsverlust, verstärkter subjektiver Erschöpfungsgrad, geringe körperliche Aktivität, verlängerte Gehdauer, geringe Handgreifkraft (Schwäche). Personen, die ein oder zwei der genannten Kriterien erfüllen, werden als *pre-frail* (dt. prä-gebrechlich) eingestuft. Diese Personen haben ein erhöhtes Risiko, innerhalb der nächsten drei bis vier Jahre *frail* zu werden (Fried et al., 2001). Die exakte Definition der Kriterien erfolgt in Abschnitt 3.3.1. Die Einteilung in die Gruppen *frail*, *pre-frail* und *nicht frail* wird auch für diese Arbeit im späteren Verlauf genutzt werden. Die Nutzung der Begriffe *frail*, *pre-frail* und *nicht frail*, ohne Übersetzung in die deutsche Sprache, bleibt erhalten.

Die Prävalenz für *Gebrechlichkeit* steigt mit dem Alter. Eine Meta-Analyse aus 57 Studien zeigt, dass die Prävalenz für *Gebrechlichkeit* im Allgemeinen bei älteren Personen (hier im Mittel 78.6 Jahre) bei 27% liegt. Frauen sind dabei etwas häufiger betroffen als Männer. Zudem gelten bei der Betrachtung von Personen in Pflegeheimen deutlich mehr als *frail* (52%) als bei der Betrachtung Älterer in der Gesamtbevölkerung. Außerdem werden Daten für die Prävalenz von Personen mit *Prä-Gebrechlichkeit* geliefert. 36% der Personen gelten als *pre-frail*. In Krankenhäusern sind es ca. 40% der Patient*innen, in Pflegeheimen kann jede fünfte Person als *pre-frail* eingestuft werden (Veronese et al., 2021). Diese Zahlen unterstützen die Notwendigkeit von Untersuchungen des Mikrobioms vor allem von hospitalisierten Patient*innen. Untersuchungen zeigen, dass sowohl Neuaufnahmen in Pflegeheimen und Krankenhäuser als auch die Sterblichkeitsrate mit einer erhöhten *Gebrechlichkeit* der entsprechenden Patient*innen verbunden sind (Fried et al., 2001; Rockwood et al., 1999). Zudem konnte schon früh gezeigt werden, dass die

Gebrechlichkeit einer Person den Gesundheitsstatus und sogar die Mortalität besser voraussagen kann als das tatsächliche Alter der Person (Mitnitski et al., 2001).

Das frühzeitige Erkennen von potentiell gefährdeten Patient*innen hinsichtlich ihrer *Gebrechlichkeit* ist somit von hoher Relevanz, um Hospitalisierungen, klinische Ereignisse wie Stürze oder eine eingeschränkte Mobilität im Alter möglicherweise verhindern zu können (Clegg et al., 2013; Speechley & Tinetti, 1991).

Anhand oben genannter Kriterien kann bereits ein Screening der Patient*innen auf *Gebrechlichkeit* durchgeführt werden, auch zu einem Zeitpunkt, wenn diese noch wenige oder keine funktionellen Einschränkungen zeigen (Fried et al., 2001). Auch eine ergänzende Untersuchung des Mikrobioms von Patient*innen könnte zum frühzeitigen Erkennen von *Gebrechlichkeit* beitragen. Weiter kann eine Untersuchung der Assoziationen zwischen Mikrobiom und *Gebrechlichkeit* potentiell helfen, Ursachen von *Gebrechlichkeit* besser zu verstehen.

1.6 Handhabung von Mikrobiomproben

Da es sich bei Mikrobiomproben um zeitkritisches Material handelt, sollte eine Probensammlung fokussiert und strukturiert, zum Beispiel in Zusammenarbeit mit einer Biobank, erfolgen. In der Literatur finden sich unterschiedliche Definitionen des Begriffs „Biobank“. Die *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) beschrieb eine Biobank 2006 als “eine Sammlung von Biomaterial und den dazugehörigen Meta-Daten, welche für eine Gesellschaft in einem organisierten System gelagert sind“ (Annaratone et al., 2021). Durch die Zusammenarbeit mit Biobanken kann ein Umgang mit Bioproben nach *Standard Operating Procedures* (SOP) erreicht werden. Solche SOP's enthalten unter anderem Informationen zur Akquise von Patient*innen, zur Gewinnung, zum Transport und zur Aufbewahrung des Biomaterials, sowie zum Personal zur technischen Weiterverarbeitung oder der Anonymisierung der Proben. SOP's sind für den Aufbau von Biobanken von entscheidender Bedeutung und ermöglichen den Aufbau eines organisierten Systems (Paskal et al., 2018).

Am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel, bestehen mehrere Biobanken, wobei eine strukturierte Sammlung von Bioproben insbesondere durch den seit 2017 bestehenden *Broad Consent* (dt. breites Einwilligungsverfahren), der allen

Patient*innen des UKSH vorgelegt (und im hohen Maße auch unterschrieben) wird, erfolgt. Dies macht z.B. die Speicherung von zeitkritischen Materialien bis zur Weiterverarbeitung möglich (Richter et al., 2018). Dieses Modell des *Healthcare Embedded Biobankings* (dt. in das Gesundheitswesen integrierte Biobanking) ist in seiner Form als revolutionär zu bezeichnen, da es ermöglicht, im Rahmen von stationärer Behandlung und Routineuntersuchungen gewonnene Proben, ohne weitere Einholung von Einwilligungen für Forschungszwecke, zu verwenden. Das UKSH ist in dieser Art der Probensammlung deutschlandweit deutlich führend. Die Speicherung von Biomaterialien in einer Biobank bringt immense Vorteile für die anschließende Forschung mit sich. Durch die strukturierte Arbeit mit Biobanken wird ermöglicht, bei sich entwickelnden Fragestellungen, insbesondere im longitudinalen Studiendesign, zu einem späteren Zeitpunkt auf gespeichertes Biomaterial zurückgreifen zu können (Paskal et al., 2018). Zudem ergibt sich durch die Zusammenarbeit mit Biobanken die Möglichkeit, Bioproben nach und nach einzuspeisen und zu einem späteren Zeitpunkt gebündelt zu analysieren.

Diese Studie war nach unserem Wissen die erste, welche nicht-genetisches Material, d.h. Blut, Speichel- oder Stuhlproben, in die oben erwähnte *Healthcare Embedded* Biobank des UKSH eingespeist hat.

2 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit untersucht Assoziationen zwischen dem menschlichen Mikrobiom und *Gebrechlichkeit* als geriatrisches Syndrom in einer Kohorte von stationären geriatrischen Patient*innen.

Ziel dieser Arbeit soll es sein, ein besseres Verständnis für Alterungs- und Krankheitsprozesse bei geriatrischen Patient*innen zu entwickeln. Dabei soll ein besonderes Augenmerk auf das geriatrische Syndrom *Gebrechlichkeit* gelegt werden. Diversitätsanalysen sollen Auskunft über die Artenvielfalt der Proben und deren Unterschiedlichkeit untereinander liefern. Weiter sollen mittels Klassifikationsverfahren und Analysen zur Abundanz bestimmter Taxa, Einblicke in die tatsächliche Zusammensetzung der Darm- und Mundhöhlen-Mikrobiota der Patient*innen gegeben werden. Zudem soll diese Arbeit betrachten, ob der *Gebrechlichkeits*-Status einer Person an der Darm-Mikrobiota besser abgebildet werden kann als an der Mundhöhlen-Mikrobiota. Sollte die Diskriminierungsfähigkeit aus Stuhlproben größer sein, so ist diese Erkenntnis vor allem für die weitere Sammlung von Biomaterialen von Bedeutung. Ergänzend soll sich diese Arbeit mit dem Aufbau einer Biobank beschäftigen. Es soll beleuchtet werden, ob und wie die Gewinnung und Speicherung von Biomaterialen älterer Patient*innen in den stationären Kontext integrierbar sind.

Daraus ergeben sich folgende Hypothesen:

- 1) Die Darm- und Mundhöhlen-Mikrobiota von geriatrischen Patient*innen mit (*Prä-*)*Gebrechlichkeit* unterscheidet sich von jenen ohne *Gebrechlichkeit*
 - a) in der Alpha- und Beta-Diversität.
 - b) in der Häufigkeit bestimmter Taxa.
- 2) Die Diskriminierungsfähigkeit bezüglich der *Gebrechlichkeit* von Personen ist aus der Darm-Mikrobiota größer als aus der Mundhöhlen-Mikrobiota.
- 3) Die Gewinnung von Biomaterial von hospitalisierten geriatrischen Patient*innen, derer Speicherung in einer Biobank und die sich anschließende Mikrobiom-Aufarbeitung ist möglich.

3 Methoden

3.1 Studiendesign

Die Datenerhebung erfolgte von September 2018 bis April 2019 bei Patient*innen, die im Rahmen einer frührehabilitativen geriatrischen Komplexbehandlung am UKSH, Campus Kiel behandelt wurden. Im Zuge ihres 14- bis 20-tägigen Aufenthaltes nahmen die Patient*innen an der explorativen, prospektiven multizentrischen Studie „*Cognitive and Motor Interactions in the Older Population*“ (ComOn, (Geritz et al., 2020)) teil. Im Kern erfasst die observationale ComOn Studie quantitative Daten von Gang, Gleichgewicht und Kognition von Patient*innen mit unterschiedlichen geriatrischen Krankheitsbildern. Ziele der Studie sind es zum einen, eine Verbindung zwischen kognitiven Einschränkungen und Defiziten in Gang und Gleichgewicht herstellen zu können. Zum anderen soll anhand der Daten der Therapieerfolg der geriatrischen Komplexbehandlung untersucht werden. Mit der Absicht, einen möglichst umfangreichen Einblick in Körperfunktionen und -struktur von geriatrischen Patient*innen im Sinne eines ganzheitlichen Ansatzes gewinnen zu können, wurden von einer Subgruppe zusätzliche Daten (u.a. Bioproben, Bilddaten, Daten zur Ernährungssituation) erhoben.

Die Datenerhebung erfolgt in der ComOn Studie zu definierten Zeitpunkten. Die ersten Untersuchungen erfolgen innerhalb der ersten beiden Tage nach stationärer Aufnahme auf die geriatrische Station (T1). Der zweite Untersuchungszeitraum liegt in den letzten beiden Tagen vor Entlassung (T2).

Für die Teilnahme an der ComOn Studie mussten die Einschlusskriterien erfüllt sein. Die Patient*innen waren entweder >70 Jahre alt oder litten bei einem Alter zwischen 50 und 69 Jahren unter mindestens zwei chronischen Erkrankungen. Weitere Einschlusskriterien umfassten die Fähigkeit ohne fremde Hilfe für mindestens zehn Sekunden stehen und eine Strecke von mindestens drei Meter zurücklegen zu können. Dafür durften auch Gehhilfen verwendet werden. Ausschlusskriterien für die Teilnahme waren weniger als fünf Punkte im *Montreal Cognitive Assessment* (MoCA), chronischer oder akuter Medikamenten-Abusus, eine Sehschärfe <60%, schwere Bewusstseinsstörungen oder mehr als zwei Stürze innerhalb der letzten Woche (Geritz et al., 2020).

Die Eignung der Patient*innen für die erweiterte Teilnahme am Projekt „Bioproben“ wurde individuell durch das Untersucherteam geprüft. Die Patient*innen mussten in der Lage sein, selbstständig eine Stuhlprobe in den zur Verfügung gestellten Toilettenstuhl abzugeben. Zudem war es wichtig, dass die Abgabe der Stuhlprobe in den ersten beiden Tagen des stationären Aufenthaltes erfolgte, um eine Veränderung des intestinalen Mikrobioms durch eine etwaige verlängerte Transitzeit auszuschließen. Mit Hilfe eines Fragebogens zu den Ernährungsgewohnheiten der Personen wurde zudem die Einnahme von Antibiotika in den letzten sechs Monaten und in den letzten sechs Wochen abgefragt. Patient*innen, welche die Einnahme von Antibiotika in den vergangenen sechs Wochen angaben, wurden aus weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

3.2 Aufbau der Biobank

Mit Beginn der Datenerhebung für diese Arbeit begann der Aufbau der in Abschnitt 1.6 erwähnten Biobank am UKSH, Campus Kiel. Das Material für die Biobank wurde zunächst ausschließlich von den Teilnehmer*innen der ComOn Studie gewonnen. Zusätzlich zur Einwilligung in die ComOn Studie mussten die teilnehmenden Personen einer Entnahme von Biomaterial in Form des *Broad Consent* schriftlich zustimmen (Richter et al., 2018). Das entnommene Biomaterial umfasste zwei Stuhl- und zwei Speichelproben, zwei EDTA-K-Monovetten (Plasma) und eine S-Monovette (Serum), zusätzlich eine EDTA-Monovette (Plasma). Abbildung 3 zeigt die der ComOn Studie angepassten Entnahmepunkte und die sich anschließenden Verarbeitungsschritte der Bioproben. Die Stuhl- und Speichelproben sowie das EDTA-Blut sollten möglichst zeitnah zur Entnahme bei -80°C tiefgefroren werden. Die weiteren Blutproben wurden zentrifugiert und als Aliquots bis zur weiteren Verarbeitung ebenso tiefgefroren. Dabei entstanden zwei Aliquots pro EDTA-K-Monovette, vier Aliquots pro S-Monovette und ein Aliquot mit Buffy Coat. Durch die gesonderte Aufbewahrung in Aliquots sollte die Möglichkeit der Nutzung der Proben für unterschiedliche Fragestellungen gegeben werden. Zur Anonymisierung wurden alle Proben mit Nummern versehen und digital den ComOn-Pseudonymen zugeordnet, sodass die Möglichkeit einer anschließenden Rückverfolgbarkeit und der Zuordnung der Proben zu weiteren Patienteninformationen unter Berücksichtigung der Datenschutzverordnung gegeben war. Alle Datenschutzregeln wurden im *Broad Consent* geregelt.

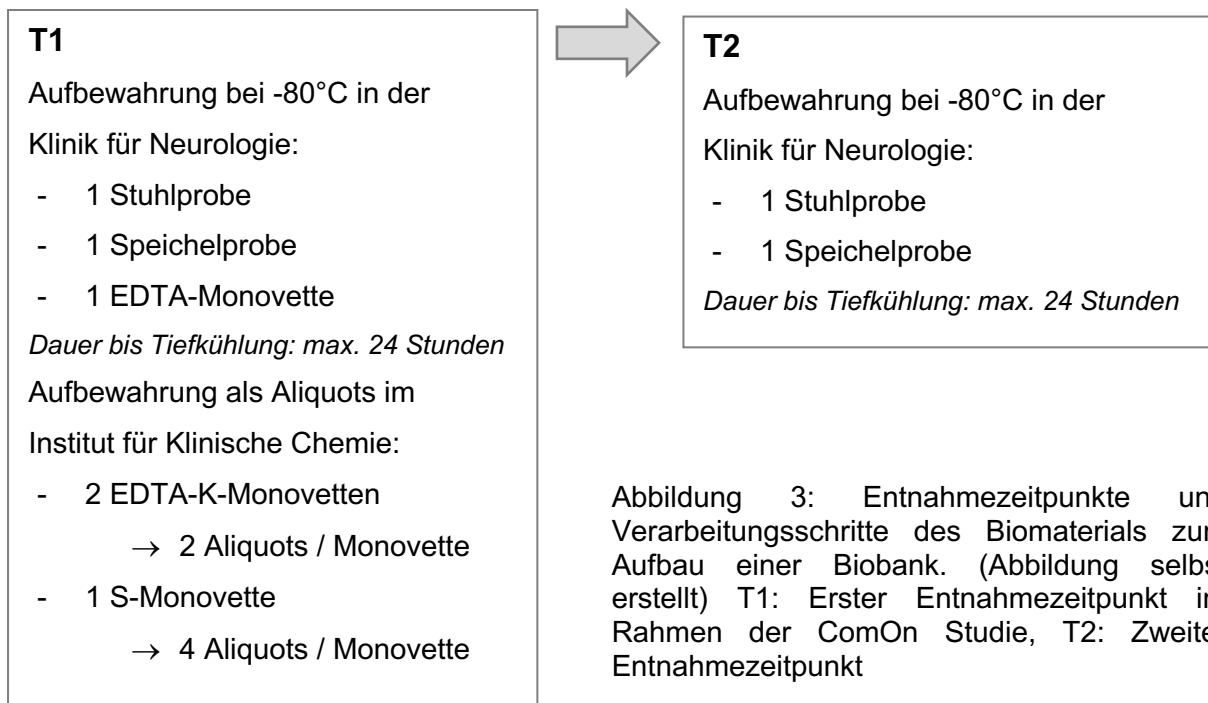


Abbildung 3: Entnahmepunkte und Verarbeitungsschritte des Biomaterials zum Aufbau einer Biobank. (Abbildung selbst erstellt) T1: Erster Entnahmepunkt im Rahmen der ComOn Studie, T2: Zweiter Entnahmepunkt

3.3 Messinstrumente

Alle verwendeten Messinstrumente waren Teil der ComOn-Messbatterie, deren ausführliches Protokoll an anderer Stelle veröffentlicht wurde (Geritz et al., 2020). Für die Einteilung der Patient*innen in die Gruppen *frail*, *pre-frail* und *nicht frail* wurden das *Mini Nutritional Assessment (MNA)*, die *FRAIL-Skala*, der *International Physical Activity Questionnaire (IPAQ)*, die *Short Physical Performance Battery (SPPB)* und das Jamar *hydraulic hand dynamometer* zur Messung der **Handgreifkraft** verwendet.

Der **MNA** (Guigoz et al., 1996) misst den Ernährungsstatus von älteren Patient*innen. Er ist aufgeteilt in eine Short Form (MNA-SF, Screening) mit sechs Items und eine Long Form (MNA-LF), welche aus der Short Form und 12 weiteren Items, dem Assessment, besteht. Der Test beinhaltet anthropometrische Messungen, Fragen zu Lebensstil, Medikation und Mobilität, diätetische Fragen, sowie Fragen zur gesundheitlichen Selbsteinschätzung der Person. Insgesamt können 30 Punkte erreicht werden. Bei ≥ 24 Punkten wird der Ernährungszustand der Person als normal eingestuft, bei 17 bis 23.5 Punkten besteht ein Risiko für Mangelernährung, ein Ergebnis von <17 Punkten spricht für das Vorliegen einer Mangelernährung. Mit einer Testdauer von ca. 15 Minuten ist der MNA relativ gut in den klinischen Alltag der Patient*innen integrierbar. Studien haben gezeigt, dass das Ergebnis des MNAs in 92% der Fälle mit dem rein klinischen Status der Patient*innen übereinstimmt. Wird

der klinische Status durch anthropometrische und biochemische Daten, wie Albumin und Cholesterin, ergänzt, so stimmt das Ergebnis des MNAs in 98% der Fälle mit diesem Status überein (Guigoz et al., 1994). Der Fragebogen kann selbstständig von der Testperson beantwortet werden. In dieser Arbeit haben die Patient*innen, soweit nötig, Hilfestellung beim Ausfüllen des Fragebogens erhalten.

Die **FRAIL-Skala** (Morley et al., 2012) beinhaltet fünf Fragen zu *Fatigue*, *Resistance*, *Aerobic*, *Illnesses* und *Loss of Weight*. Für jede Frage kann ein Punkt vergeben werden. Anhand der erreichten Punktzahl werden die Patient*innen in *frail* (3-5 Punkte), *pre-frail* (1-2 Punkte) und *robust* (0 Punkte) eingeteilt. Die Autor*innen der **FRAIL-Skala** heben hervor, dass diese sogar durch die zu testende Person oder Angehörige selbst ausgefüllt werden kann und die Ermittlung des Punktwertes somit keine Hürde im Klinikalltag darstellt.

Der **IPAQ** (Craig et al., 2003) misst die physische Aktivität der Testpersonen in den letzten sieben Tage in Stunden und Minuten. Der Test unterscheidet zwischen anstrengenden und moderaten körperlichen Aktivitäten. Außerdem wird die Zeit abgefragt, die man mit Gehen bzw. Sitzen verbracht hat. Die Auswertung des IPAQ's orientierte sich an den Regeln des *IPAQ Scoring Protocols* (IPAQ Research Committee, 2005). Das Manual unterscheidet drei Kategorien (nicht ausreichende Aktivität, ausreichende Aktivität und hochaktive Aktivität), in welche die Personen anhand ihrer Angaben eingeordnet werden können.

Die **SPPB** (Guralnik et al., 1994) beinhaltet Balance-, Gang-, Stärke- und Ausdauer-Tests und kann so Aussagen über den funktionellen Status einer Person geben. Für diese Arbeit ist die Messung der Gehdauer für eine Strecke von 4m von Interesse. Zur Ermittlung wird die Person gebeten, auf Kommando eine Strecke von 4m so zügig, aber gleichzeitig sicher wie möglich, zurückzulegen.

Zur Messung der **Handgreifkraft** wurde das Jamar *hydraulic hand dynamometer* (AFH, Lügde, Germany) verwendet (Roberts et al., 2011). Die Testperson wird gebeten, das Hand-Dynamometer auf Kommando so fest wie möglich zusammenzudrücken. Jede Seite wird zweimal im Wechsel getestet und das Ergebnis in kg angegeben. Über das Ergebnis der Handgreifkrafts-Messung können Rückschlüsse auf die Muskelkraft der Person gezogen werden.

3.3.1 Adaptation der Messinstrumente an das Gebrechlichkeits-Konzept

Im *Gebrechlichkeits-Konzept* von Fried et al. (2001) werden exakte Regeln definiert, wonach die Personen in die Gruppen *frail*, *pre-frail* und *nicht frail* eingeordnet werden (Fried et al., 2001). Da es sich bei der ComOn Studie um eine multizentrische und vor allem explorative Studie handelt und die Instrumentenauswahl allen Teilespekten der Studie gerecht werden muss, konnten diese exakten Definitionskriterien nicht in allen Punkten unverändert für unsere Gruppe an Patient*innen übernommen werden. Trotz dieser Einschränkung kann nach Angabe der Studienleitung davon ausgegangen werden, dass die teils alternativ gewählten Messinstrumente in ihrer Bedeutung derer von Fried et al. (2001) derartig ähneln, dass bei praktisch allen Studienteilnehmer*innen die gleiche Gruppenzuordnung erfolgt, wie sie bei einer exakten Umsetzung der Definitionskriterien erfolgen würde. Dies ist im Folgenden genauer dargestellt.

Der **unbeabsichtigte Gewichtsverlust** wird im *Gebrechlichkeits-Konzept* definiert als *ungewollte Abnahme von 10 Pfund (=4.53 kg) innerhalb des letzten Jahres*. Sobald dieses auf eine Person zutrifft, wird ein Punkt vergeben. In der vorgelegten Arbeit erhält die Person einen Punkt, sobald die Variable B des MNAs (Gewichtsverlust in den letzten 3 Monaten) mit *Gewichtsverlust > 3kg* oder *Gewichtsverlust zwischen 1 und 3 kg* beantwortet wird.

Zur Einordnung des **verstärkten subjektiven Erschöpfungsgrades** einer Person nutzt das *Gebrechlichkeits-Konzept* die *CES-D Depression Scale*, welche nicht Teil der ComOn-Messbatterie ist. Stattdessen wird in dieser Arbeit das Fatigue-Item (Erschöpfungs-Item) der *FRAIL*-Skala genutzt und ein Punkt vergeben, sobald dieses bejaht wird.

Zur Messung der **körperlichen Aktivität** orientiert sich das *Gebrechlichkeits-Konzept* an der *short version of the Minnesota Leisure Time Activity questionnaire*. Hier erfolgt die Punktvergabe anhand der durch körperliche Aktivität verbrauchten Kilokalorien pro Woche. Die hier vorgelegte Arbeit orientiert sich bei Vergabe von Punkten an den Ergebnissen des IPAQs. Ein Punkt wird vergeben bei der Zuordnung der Person zur Kategorie *nicht ausreichende Aktivität*.

Für die Bewertung der **Gehdauer** sind im *Gebrechlichkeits-Konzept* *cut-off*-Werte für eine Gehstrecke von 15 Fuß (=4.572m) festgelegt. Die *cut-off*-Werte orientieren sich

am Geschlecht und der Körpergröße der Person. Frauen \leq 1.59m und Männer \leq 1.73m Körpergröße bekommen einen Punkt, wenn sie \geq 7 Sekunden für das Zurücklegen der Strecke benötigen. Frauen $>$ 1.59m und Männer $>$ 1.73m Körpergröße bekommen den Punkt bei einer Gehzeit von \geq 6 Sekunden. Für diese Untersuchung wurde die Gehstrecke aus der SPPB (4m) an das *Gebrechlichkeits*-Konzept von Fried et al. (2001) adaptiert und die Zeiten auf eine Strecke von 15 Fuß (=4.572m) kalkuliert.

Die Definitionskriterien zur Messung der **Handgreifkraft** konnten in dieser Arbeit nach dem *Gebrechlichkeits*-Konzept umgesetzt werden.

3.4 Durchführung

Neben der Aufklärung über die ComOn Studie, erfolgte die Aufklärung über die zusätzliche Entnahme von Bioproben (Stuhl, Speichel, Blut) und somit über die Teilnahme am Projekt „Bioproben“ der ComOn Studie im Laufe ihres Aufenthaltes. Erst nach schriftlicher Einwilligung der Patient*innen in sowohl die ComOn Studie als auch in das Projekt „Bioproben“, begannen die Untersuchungen innerhalb der ersten beiden stationären Tage. Für das Projekt liegt ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität Kiel vor (Prüfantragsnummer: 427/17). Diese Arbeit betrachtet Daten zum Untersuchungszeitraum T1.

Zu Beginn des Aufenthaltes wurde eine ausführliche Anamnese durchgeführt. Im Zuge einer Befragung zu den Ernährungsgewohnheiten der Person wurde der MNA, die Körpergröße, das Körpergewicht sowie der *Body Mass Index* (BMI) erhoben. Die Gehdauer und die Handgreifkraft wurden als Teil der motorischen Untersuchung der ComOn Studie erhoben. Die *FRAIL*-Skala und der IPAQ wurden von den Patient*innen selbstständig im Verlauf des Aufenthaltes ausgefüllt. Bei Bedarf wurde hier Unterstützung angeboten. In Zusammenschau der Daten wurden die Patient*innen in die drei Gruppen *frail*, *pre-frail* und *nicht frail* eingeteilt. Details zur Einteilung werden in Abschnitt 4.2 erläutert. Die Stuhlprobe wurde aus dem ersten auf Station abgesetzten Stuhlgang entnommen. Den Patient*innen wurde dafür ein Toilettensitz zur Verfügung gestellt, aus welchem im Anschluss die Probe gewonnen werden konnte. Die Speichelprobe konnte mittels Speichelwap an der Mundschleimhaut abgenommen werden. Die Entnahme erfolgte zeitnah zur Abgabe der Stuhlprobe.

Auch die Blutproben für den Aufbau der Biobank wurden in den ersten beiden stationären Tagen abgenommen. Stuhl- und Speichelproben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C tiefgefroren. Die Mikrobiomanalysen aus Stuhl und Speichel erfolgten in Zusammenarbeit mit dem *Institute of Clinical Molecular Biology* (IKMB) der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Das Mikrobiom wurde mittels 16S rRNA-Sequenzierung analysiert und die Rohdaten zur weiteren Analyse zur Verfügung gestellt. Die Analysen wurden auf Gattungs-Ebene durchgeführt. Die Blutproben wurden im Institut für klinische Chemie des UKSH, Campus Kiel eingelagert.

3.5 Statistische Analysen

Für die statistischen Analysen wurden die Statistik Programme R (Version 4.1.3) und SPSS (Version 21) genutzt. Insgesamt wurde für die Analysen von einem Signifikanzniveau von $p=0.05$ ausgegangen.

Als personenbezogene Daten wurde das Geschlecht, das Alter, der BMI und die Primärdiagnose verwendet. Die Beschreibung der klinischen und demografischen Daten (MNA, *FRAIL*-Skala, IPAQ, Gehdauer und Handgreifkraft) erfolgte mittels deskriptiver Statistik (Anzahl der Daten, Mittelwert, Standardabweichung, Median und Spannweite der Daten).

Für die Mikrobiomanalysen wurde das Statistik Programm R (Version 4.1.3) genutzt.

Zur Überprüfung der **Hypothese 1a)** wurde das vegan-Package verwendet. Dieses enthält Methoden zur Analyse von sowohl Alpha- als auch Beta-Diversitäten (Oksanen, 2020).

Für die Analyse der **Alpha-Diversität** wurden *Richness*, *Evenness*, der Chao-1-Index und der Shannon-Index berechnet. Die Anzahl an beobachteten (nicht unbedingt tatsächlichen) Taxa in einer Probe wird durch die *Richness* ausgedrückt. Die *Evenness* trifft Aussagen über die Gleichheit von Proben. Aus der *Evenness* kann demnach abgeleitet werden, ob alle beobachteten Taxa in einer Probe gleich häufig vorkommen und somit die gleiche Abundanz haben, oder ob ein Taxon häufiger vorliegt und somit abundantier ist als andere (Tijs et al., 2020). Der Chao-1-Index versucht die tatsächliche totale *Richness* abzuschätzen, er gibt also die Anzahl der Taxa in einer Probe an. Dabei wird nicht betrachtet, wie abundant das einzelne Taxon in einer Probe

ist. Der Shannon-Index misst *Richness* und *Evenness* und kann dadurch auch Aussagen über die Abundanz treffen. Der Wert des Shannon-Index steigt, je größer die Abundanz ist und kann maximal 5.0 betragen (Qian et al., 2020; Tijs et al., 2020). Anschließend wurden die Werte mit Hilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests auf statistische Signifikanz überprüft.

Für die **Korrelationsanalysen** wurde der Spearman's Korrelationskoeffizient (Spearman's rho) berechnet, da die Voraussetzung der Normalverteilung für Pearson nach Prüfung der Daten mittels Shapiro-Wilk-Test verletzt war. In die Analysen wurden der Chao-1-Index als Index für die Alpha-Diversität, sowohl für Stuhl- als auch für Speichelproben, das Gesamtergebnis des MNAs, die Variable B des MNAs (Gewichtsverlust), die *FRAIL*-Skala, der IPAQ, die Gehdauer, die Handgreifkraft, der BMI, das Alter, das Geschlecht und die Länge der Schulausbildung eingeschlossen. Die Korrelationsanalysen dienten dazu, etwaige Zusammenhänge zwischen der Alpha-Diversität und den einzelnen Parametern des *Gebrechlichkeit*-Konzeptes von Fried et al. (2001) zu erkennen.

Die **Beta-Diversitäten** wurden zunächst als *Non Metric Multidimensional Scaling* (NMDS) (Kruskal, 1964) dargestellt. Während die Alpha-Diversität ein Maß für die Bakterienvielfalt innerhalb einer Probe ist, gilt die Beta-Diversität als ein Maß für die Unterschiedlichkeit der Proben untereinander. Je weiter zwei Proben in der NMDS voneinander entfernt liegen, desto unterschiedlicher sind sich diese Proben (Kruskal, 1964). Als Abstandsmaß wurde Bray-Curtis gewählt. Bei Bray-Curtis handelt es sich um ein quantitatives Abstandsmaß, welches sich auf Abundanzunterschiede in den Proben bezieht (Tijs et al., 2020).

Zur statistischen Überprüfung dieser visualisierten Unterschiedlichkeit von Proben wurde eine PERMANOVA (*Permutational Analysis of Variance*) gerechnet. Hier werden nicht die einzelnen Proben, sondern Gruppen von Proben, im Falle dieser Arbeit die Proben der Gruppen *frail*, *pre-frail* und *nicht frail*, betrachtet. Der Test vergleicht die Verteilung dieser Gruppen in einem multidimensionalen Raum. Lägen die Proben exakt aufeinander, so könnte davon ausgegangen werden, dass diese identisch seien. Unter Angabe des p-Wertes kann auf die statistische Signifikanz geschlossen werden (Anderson, 2001).

Zur Überprüfung der **Hypothese 1b)** wurde zunächst das randomForest-Package genutzt, welches Möglichkeiten zur Klassifikation bietet. Ein *Random Forest* ist ein Klassifikationsverfahren, das aus mehreren Entscheidungsbäumen besteht. Jeder „Baum im Wald“ fällt eine Entscheidung, in diesem Fall über das Taxon, welches für die Unterscheidung *frail*, *pre-frail* und *nicht frail* am wichtigsten ist. Am Ende werden die Entscheidungen aller Bäume betrachtet und die Taxa mit den meisten Stimmen als die wichtigsten erkannt (Breiman, 2001). Als Index hierfür wird der *Mean Decrease Gini* (MDG) genutzt. Dieser gibt die Wichtigkeit des eingeordneten Taxons an (Han et al., 2016).

Anschließend wurde das DESeq2-package genutzt. DESeq2 erlaubt es, eine Aussage über die tatsächliche Anzahl an Genen eines Mikroorganismus‘ in einer Probe treffen zu können. Es können somit Aussagen über die Abundanz getroffen werden (Love et al., 2014). Ziel der DESeq2-Analyse ist die Identifikation von unterschiedlich exprimierten Genen zwischen Gruppen, hier den Gruppen *frail*, *pre-frail* und *nicht frail*. Dafür werden *negative binomial generalized linear models* genutzt. Die DESeq2-Analyse berechnet Verhältnisse zwischen den durchschnittlichen Häufigkeiten von Taxa in den Gruppen. Die Verhältnisse werden in logarithmischer Schreibweise angegeben und als *LogFoldChange* (LFC) benannt. Ein positiver bzw. negativer LFC gibt die Richtung des unterschiedlich exprimierten Genmaterials in den Gruppen an (Love et al., 2014). Zur Testung der unterschiedlichen Expression von Genen in den Gruppen auf statistische Signifikanz wird der Wald Test angewandt und der p-Wert auf multiples Testen korrigiert und als padj. angegeben (Love et al., 2014).

Zur Überprüfung der **Hypothese 2)** wurden die Ergebnisse der statistischen Analysen aus 1a) und 1b) betrachtet und hinsichtlich der größeren Diskriminierungsfähigkeit eines Biomaterials interpretiert.

Zur Überprüfung der **Hypothese 3)** wurden keine statistischen Verfahren angewendet. Die Frage wurde auf einer rein beobachtenden Grundlage beantwortet.

4 Ergebnisse

4.1 Studienpopulation

In die Untersuchung wurden n=32 Patient*innen eingeschlossen. Von diesen waren 19 (60%) Frauen und 13 (40%) Männer. Im Mittel waren die Patient*innen 79 Jahre alt (Spannweite: 9 Jahre). Die Daten wurden von geriatrischen Patient*innen sowohl mit neurologischer (n=25, 78%), als auch mit internistischer Primärdiagnose (n=7, 22%) erhoben.

Einen Überblick über die klinischen und demografischen Daten, welche für die Einteilung der Patient*innen in die Gruppen *frail*, *pre-frail* und *nicht frail* genutzt worden sind, liefert Tabelle 2. Zudem wurde das Erschöpfungs-Item der *FRAIL*-Skala abgefragt. Hier gaben 13 Personen an, sich erschöpft oder müde zu fühlen.

Parameter	N	M (SD)	Median	[Min; Max]
MNA-Gesamt	30	23.3 (3.8)	24	[13; 29]
IPAQ	19	2.1 (0.8)	2	[1; 3]
Gehdauer für eine Strecke von 4m [sek]	30	9.1 (4.4)	8	[5; 27]
Handgreifkraft [kg]	32	21.5 (10.1)	20	[9; 48]
BMI [kg/m ²]	31	26.1 (4.6)	26	[18; 37]
Alter [Jahre]	32	78.9 (9.3)	81	[56; 96]

Tabelle 2: Klinische und Demografische Daten. N: Anzahl; M: Mittelwert; SD: Standardabweichung; MNA: Mini Nutritional Index, IPAQ: *International Physical Activity Questionnaire*, BMI: *Body Mass Index*

4.2 Gruppeneinteilung

Zur Überprüfung der Hypothesen wurden die 32 Patient*innen anhand der genannten Kriterien in die Gruppen *frail*, *pre-frail* und *nicht frail* eingeteilt.

Sieben Personen konnten aufgrund unvollständiger Datensätze keiner Gruppe zugeordnet werden. Lediglich ein Patient galt der Definition nach als *nicht frail*, auch dieser wurde aus weiteren Analysen ausgeschlossen. 13 Patient*innen konnten als *frail* und elf Patient*innen als *pre-frail* klassifiziert werden.

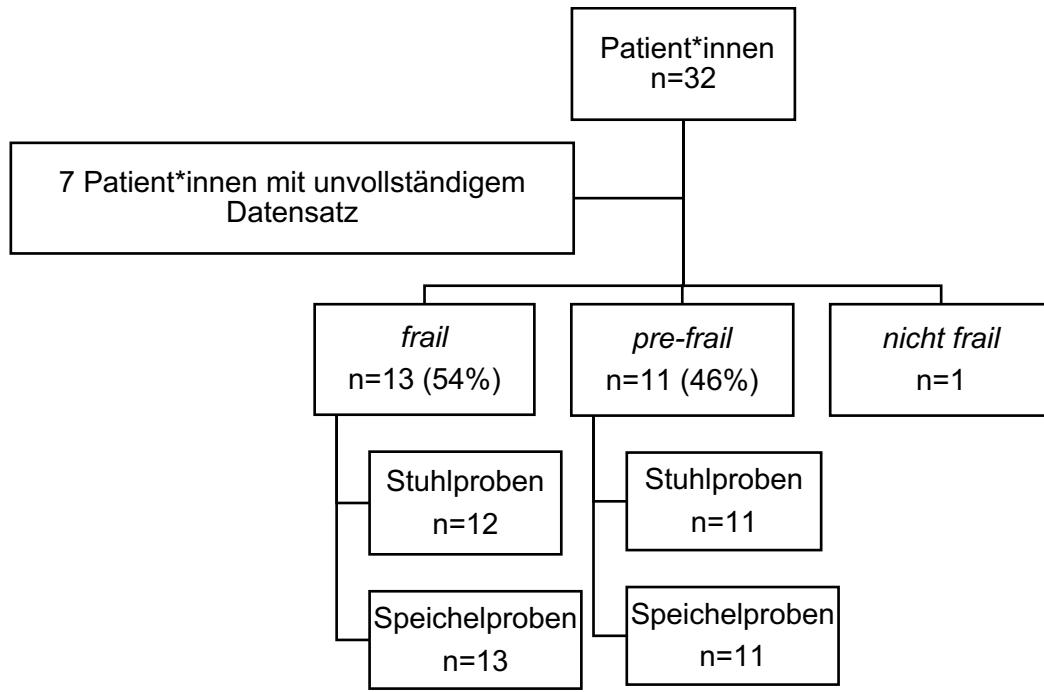


Abbildung 4: Gruppeneinteilung (Abbildung selbst erstellt)

4.3 Alpha-Diversität

Für die Darstellung der Alpha-Diversität wurden die *Richness*, die *Evenness*, der Chao-1-Index und der Shannon-Index für sowohl Stuhl- als auch Speichelproben berechnet und die Werte anschließend mit Hilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-Test auf statistische Signifikanz untersucht.

Zunächst wurden die **Stuhlproben** der Personen betrachtet. Die Mittelwerte für die *Richness* an Arten in den Gruppen *frail* und *pre-frail* betrugen 63.08 bzw. 63.00 ($p=0.8293$). In den Stuhlproben sowohl von *frail*-Patient*innen als auch von *pre-frail*-Patient*innen wurden demnach im Mittel 63 unterschiedliche Taxa gefunden. Die Mittelwerte für den Chao-1-Index für die *frail*- bzw. die *pre-frail*-Gruppe betrugen 72.38 und 71.01 ($p=0.6665$). Im Mittel waren die Werte für den Chao-1-Index höher als die *Richness*. Es existierte demnach eine Anzahl an Taxa, welche in den Proben vorhanden, aber in der *Richness* aufgrund einer nicht ausreichenden Sequenzierungstiefe nicht erfasst werden konnte. Die *Evenness*, als Maß für die Gleichheit, für die Gruppen *frail* und *pre-frail* lag bei 0.61 bzw. 0.62 ($p=0.9264$). Die Mittelwerte für den Shannon-Index in den Gruppen *frail* bzw. *pre-frail* betrugen 2.52 bzw. 2.55 ($p=0.6891$). Insgesamt ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Alpha-Diversität zwischen den beiden Gruppen erkennen.

Es zeigten sich positive Korrelationen zwischen dem Chao-1-Index in Stuhlproben und der Gehdauer der Personen als ein Parameter der Einteilung in die beiden Gruppen (spearman's $\rho=0.390$, $p=0.037$). Darüber hinaus zeigten sich keine signifikanten Korrelationen.

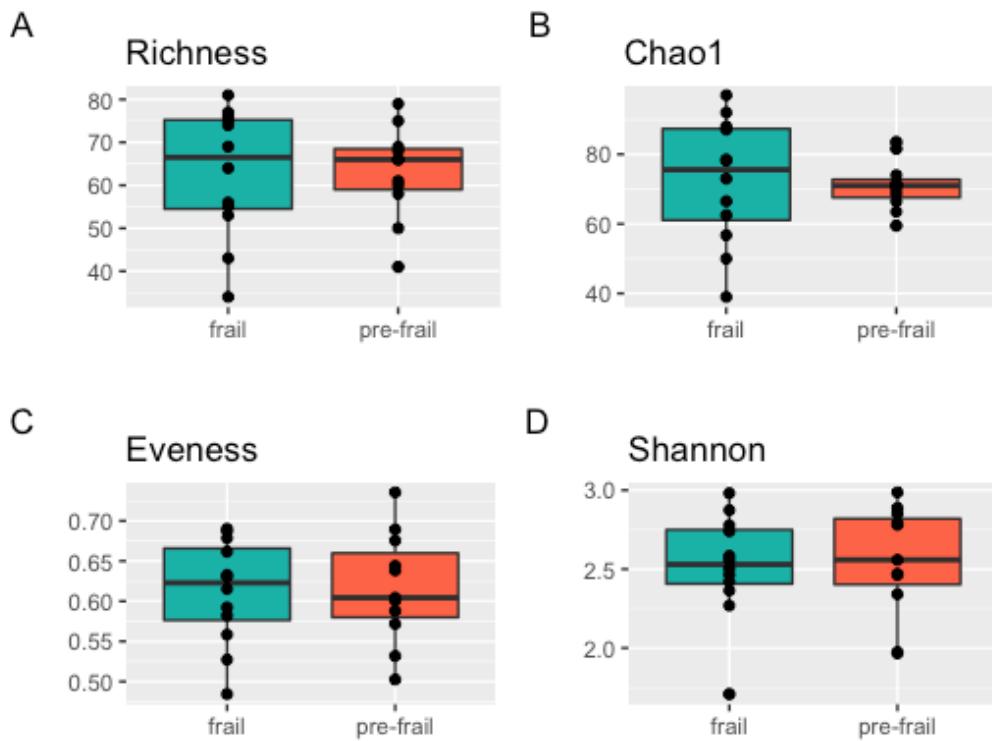
Auch bei Betrachtung der **Speichelproben** zeigten sich in den Indices der Alpha-Diversität keine statistisch signifikanten Unterschiede. Im Mittel fanden sich in den Speichelproben von *frail*-Patient*innen 56 verschiedene Taxa und in den Proben der Patient*innen in der *pre-frail*-Gruppe 63 ($p=0.3841$). Auch der Shannon-Index gab keinen Hinweis auf eine Unterschiedlichkeit in der Alpha-Diversität. Die Werte betrugen für die *frail* bzw. für die *pre-frail*-Gruppe 2.24 bzw. 2.38 ($p=0.862$).

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Indices. Abbildung 5 illustriert diese grafisch als Box-Plots.

a) Stuhlproben							b) Speichelproben						
	N	M (SD)	Median	[Min; Max]	W-Wert	p-Wert		N	M (SD)	Median	[Min; Max]	W-Wert	p-Wert
Richness					70	0.8293						56	0.3841
<i>Frail</i>	12	63.08 (14.91)	67	34; 81			<i>Frail</i>	13	56.31 (16.17)	54	16; 78		
<i>Pre-frail</i>	11	63.00 (10.82)	66	41; 79			<i>Pre-frail</i>	11	63.18 (15.32)	60	33; 88		
Chao-1-Index					74	0.6665						50	0.2237
<i>Frail</i>	12	72.38 (17.88)	76	39.0; 97.0			<i>Frail</i>	13	66.73 (21.21)	73	16; 100		
<i>Pre-frail</i>	11	71.01 (7.02)	71	59.5; 83.5			<i>Pre-frail</i>	11	79.7 (20.92)	85	42; 111		
Eveness					64	0.9264						80	0.643
<i>Frail</i>	12	0.61 (0.07)	0.62	0.48; 0.69			<i>Frail</i>	13	0.55 (0.16)	0.6	0.2; 0.72		
<i>Pre-frail</i>	11	0.62 (0.07)	0.6	0.50; 0.74			<i>Pre-frail</i>	11	0.57 (0.07)	0.58	0.48; 0.71		
Shannon-Index					59	0.6891						75	0.862
<i>Frail</i>	12	2.52 (0.33)	2.53	1.71; 2.98			<i>Frail</i>	13	2.24 (0.73)	2.44	0.55; 3.15		
<i>Pre-frail</i>	11	2.55 (0.35)	2.56	1.97; 2.99			<i>Pre-frail</i>	11	2.38 (0.4)	2.35	1.71; 3.11		

Tabelle 3: Indices der Alpha-Diversität für die Gruppen *frail* bzw. *pre-frail* in a) Stuhlproben und b) Speichelproben. N: Anzahl, M: Mittelwert, SD: Standardabweichung

a) Stuhlproben



b) Speichelproben

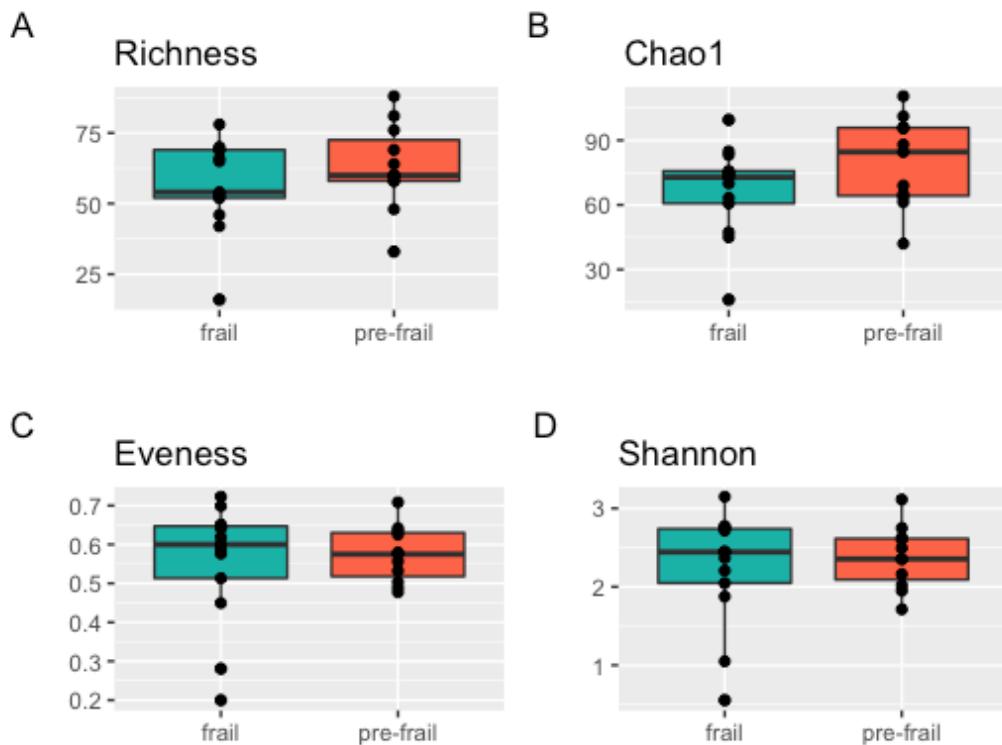


Abbildung 5: Darstellung von Richness (A), Chao-1-Index (B), Evenness (C) und Shannon-Index (D) der *frail*-Gruppe (türkis) und der *pre-frail*-Gruppe (rot) in a) Stuhlproben und b) Speichelproben. Die Indices werden ohne Einheit ausgedrückt.

4.4 Beta-Diversität

Zur Darstellung der Beta-Diversität der beiden Gruppen *frail* bzw. *pre-frail* in Stuhl- und Speichelproben wurde eine NMDS durchgeführt und die Ergebnisse teilweise in einem Spiderdiagramm verbildlicht. Als Abstandsmaß wurde *Bray-Curtis* verwendet. Anschließend folgte eine Prüfung der Ergebnisse auf statistische Signifikanz. Hierfür wurde eine PERMANOVA gerechnet.

Zunächst folgt die Betrachtung der **Stuhlproben**. Die Ergebnisse der NMDS sind in Abbildung 6 dargestellt. In diesem Spiderdiagramm wird jede Probe als Punkt abgebildet. Stuhlproben von *frail*-Patient*innen sind rot, Stuhlproben von *pre-frail*-Patient*innen türkis eingefärbt. Es war erkennbar, dass sich die Proben weder in ihrer Intra-Variabilität, also in der Unterschiedlichkeit in der Zusammensetzung des Mikrobioms innerhalb einer Gruppe, noch in der Inter-Variabilität, der Unterschiedlichkeit zwischen den beiden Gruppen, unterschieden.

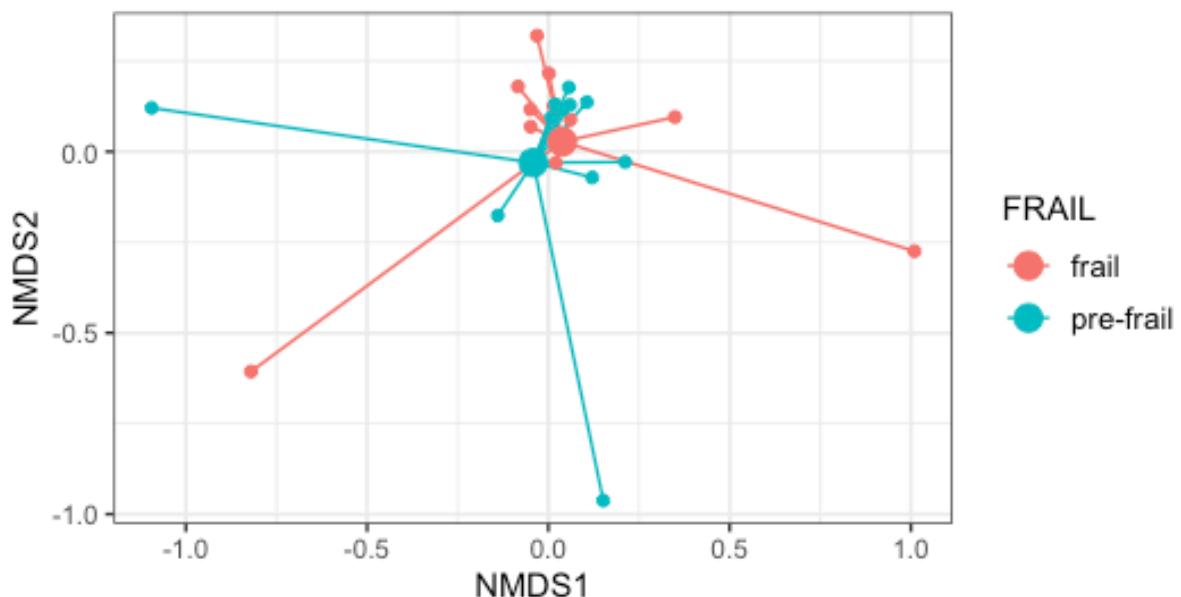


Abbildung 6: Die Verteilung der *frail*-Gruppe (rot) bzw. *pre-frail*-Gruppe (türkis) in der NMDS mit *Bray-Curtis*-Abstandsmaß

Zur statistischen Überprüfung wurde, neben der Veranschaulichung der Daten im Spiderdiagramm, eine PERMANOVA gerechnet. Als Abstandsmaß wurde, wie auch bei der NMDS, *Bray-Curtis* genutzt. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Ergebnisse ($p=0.77$).

Auch für die **Speichelproben** wurde eine PERMANOVA gerechnet. Genauso wie bei der Analyse der Stuhlproben zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p=0.849$).

Ergänzend wurde an dieser Stelle die Beta-Diversität der **Stuhl- und Speichelproben** der Patient*innen verglichen. Dazu wurden alle Bioproben betrachtet und in die Gruppen Stuhl (türkis) bzw. Speichel (rot) unterteilt. Schon in der NMDS war ersichtlich, dass sich die Stuhl- bzw. Speichelproben untereinander ähnlich waren, jedoch die Inter-Variabilität der beiden Gruppen optisch groß erschien. Zur Prüfung auf statistische Signifikanz folgte eine PERMANOVA. Hier bestätigte sich die hohe Beta-Diversität zwischen den Gruppen ($p=0.001$).

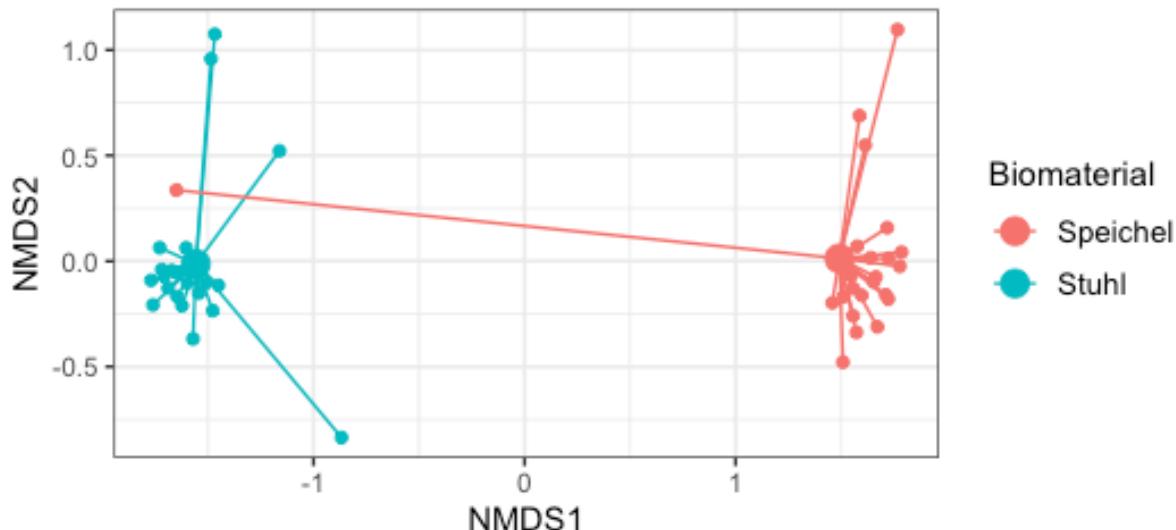


Abbildung 7: Die Verteilung von Speichelproben (rot) bzw. Stuhlproben (türkis) in der NMDS mit Bray-Curtis-Abstandsmaß

4.5 Random Forest-Analyse

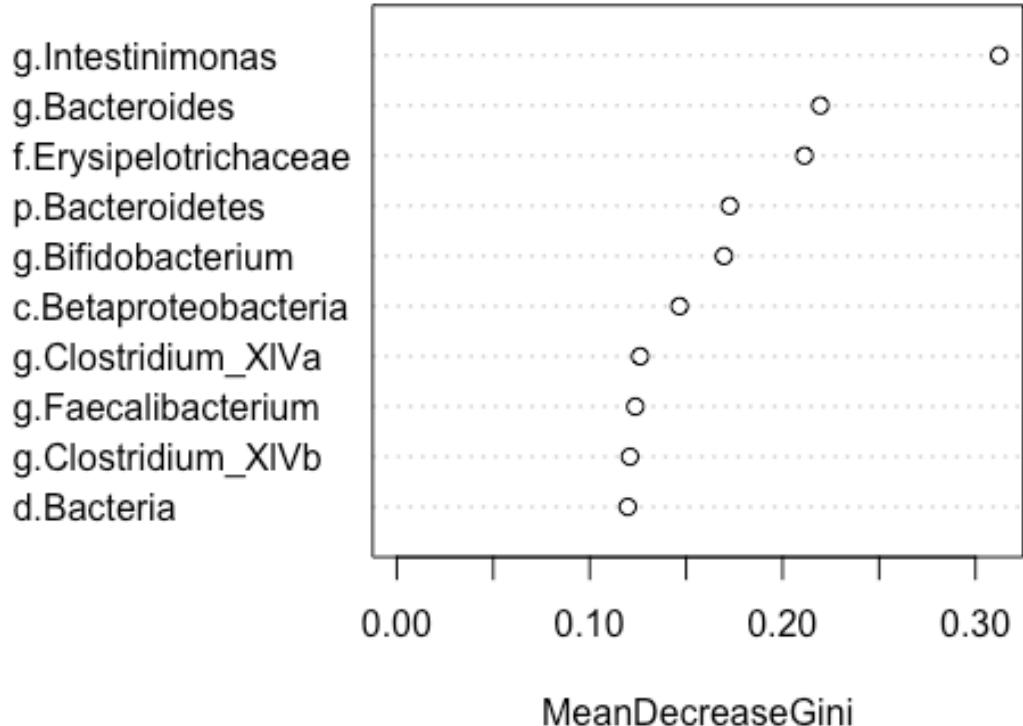
Mittels des *Random Forest*-Algorithmus‘ wurde eine Klassifikation durchgeführt. Hiermit soll gezeigt werden, welche Taxa bei der Unterscheidung zwischen *frail* und *pre-frail* in Stuhl- und Speichelproben am wichtigsten sind. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 gezeigt. Hier werden die jeweils zehn wichtigsten Taxa abgebildet. Je höher der MDG, desto wichtiger ist die Variable für die Unterscheidung.

In Bezug auf die Unterscheidung zwischen *frail* und *pre-frail* in **Stuhlproben** stellte die Bakteriengattung *Intestinimonas* mit einem MDG von 0.31 und einer Fehlerrate von 33% das bedeutendste Unterscheidungskriterium dar. Bei der Betrachtung von

Stuhlproben ausschließlich weiblicher oder männlicher Patient*innen ließ sich die Gattung *Intestinimonas* wiederum nicht als Unterscheidungsmerkmal ausmachen. Mit einem MDG von 0.15 stellte die Gattung *Dialister* bei Frauen das wichtigste Kriterium dar, bei Männern war es mit einem MDG von 0.06 die Gattung *Parasutterella*. Die Fehlerrate lag jeweils bei 67%.

In den **Speichelproben** stellten sich die Gattungen *Streptococcus* (MDG=0.31) und *Lachnoanaerobaculum* (MDG=0.28) als die wichtigsten Unterscheidungsmerkmale zwischen den Gruppen *frail* und *pre-frail* heraus. Die Fehlerrate lag hier allerdings bei 73%. Auch bei der Betrachtung der Speichelproben nur von weiblichen Patientinnen konnte die Gattung *Lachnoanaerobaculum* als eines der zehn wichtigsten Unterscheidungsmerkmale herausgearbeitet werden (MDG=0.12). Bei den Proben männlicher Patienten war die Gattung *Campylobacter* mit einem MDG von 0.16 das wichtigste Kriterium zur Unterscheidung. Allerdings lag die Fehlerrate bei der nach Geschlechtern getrennten Betrachtung von Stuhl- und Speichelproben jeweils bei über 50% (89% bei Frauen und 83% bei Männern).

a) Stuhlproben



b) Speichelproben

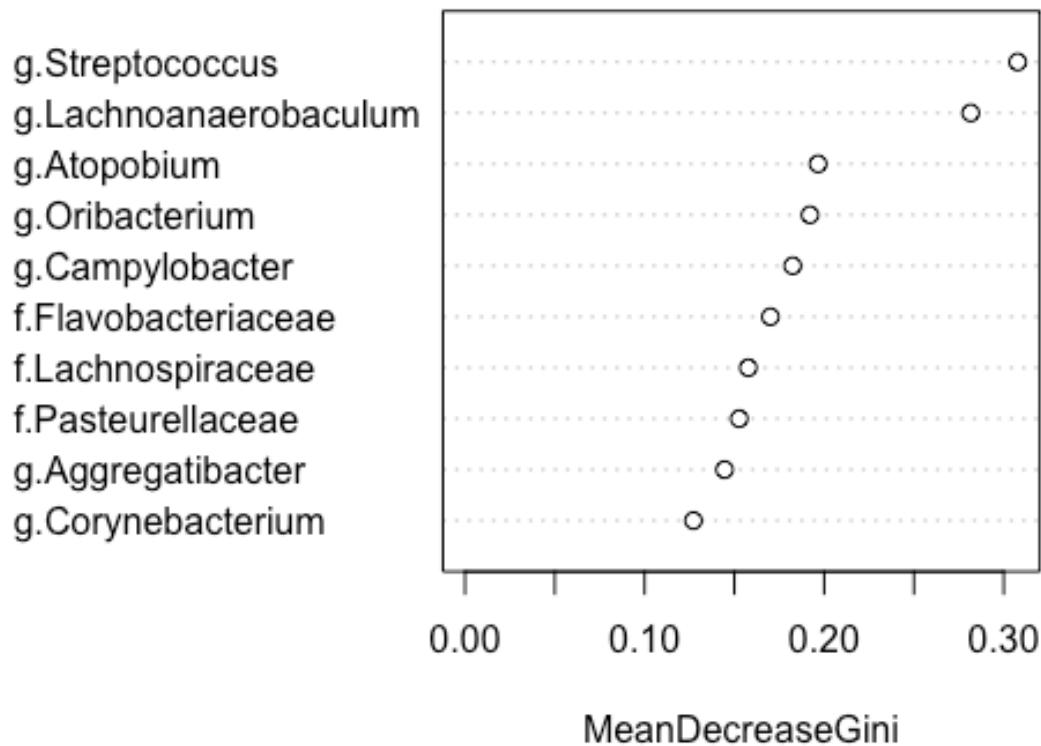


Abbildung 8: Die zehn wichtigsten Taxa zur Unterscheidung zwischen *frail* und *pre-frail* bei Frauen und Männern in a) Stuhlproben und b) Speichelproben. Der *Mean Decrease Gini* wird als Index einheitslos angegeben.

4.6 DESeq2-Analysen

Zur quantitativen Analyse von Abundanzen in den jeweiligen Stuhl- und Speichelproben wurde eine DESeq2-Analyse via *negative binomial generalized linear models* durchgeführt.

In der DESeq2-Analyse aus **Stuhlproben** fanden sich fünf Taxa, welche statistisch signifikant unterschiedlich abundant zwischen den Gruppen *frail* und *pre-frail* waren. Darunter waren die Bakteriengattungen *Intestinimonas* und *Anaerotruncus*. Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der Analyse. Der *BaseMean* gibt die durchschnittliche Anzahl an Genen für die jeweils aufgelisteten Taxa in der Probe an. Am LFC ist erkennbar, in welcher Gruppe die jeweiligen Taxa höher abundant sind. Negative Werte zeigen eine höhere Abundanz der Taxa in der *frail*-Gruppe an. So war beispielsweise die Gattung *Intestinimonas* mit einem adjustierten p-Wert von 0.0001 in der *frail*-Gruppe höher abundant als in der *pre-frail*-Gruppe (LFC=- 6.17).

Taxa	BaseMean	LFC	Wald Test	p-Wert	padj
f.Erysipelotrichaceae	36.34	2.64	4.12	0.00004	0.003
p.Firmicutes	6.68	- 3.35	- 3.34	0.0008	0.03
o.Bacteroidales	161.35	- 7.26	- 3.62	0.0003	0.015
g.Anaerotruncus	6.63	- 4.00	- 3.32	0.0009	0.029
g.Intestinimonas	33.8	- 6.17	- 4.94	0.0000008	0.0001
g. Faecalibacterium	207.87	- 1.44	- 1.86	0.06	0.45

Tabelle 4: Ergebnisse der DESeq2-Analyse aus Stuhlproben für die Testung *pre-frail* vs. *frail*. BaseMean: durchschnittliche Anzahl an Bakterien in den Proben, Wald Test: Statistik des Wald Testes, padj: p-Wert adjustiert für multiples Testen. Ergebnisse ohne statistische Signifikanz, aber mit inhaltlicher Bedeutung, sind grau hinterlegt.

Abbildung 9 veranschaulicht die Ergebnisse der DESeq2-Analyse. Jeder Punkt entspricht einem Taxon. Die blauen Punkte zeigen unterschiedlich abundante Taxa in den getesteten Gruppen an. Von besonderem Interesse sind die blauen Punkte im rechten Randbereich der Abbildung, da diese sowohl eine hohe Anzahl an

nachgewiesenen Taxa in der Probe als auch einen hohen bzw. niedrigen LFC anzeigen und demnach unterschiedlich abundant in den beiden Gruppen sind.

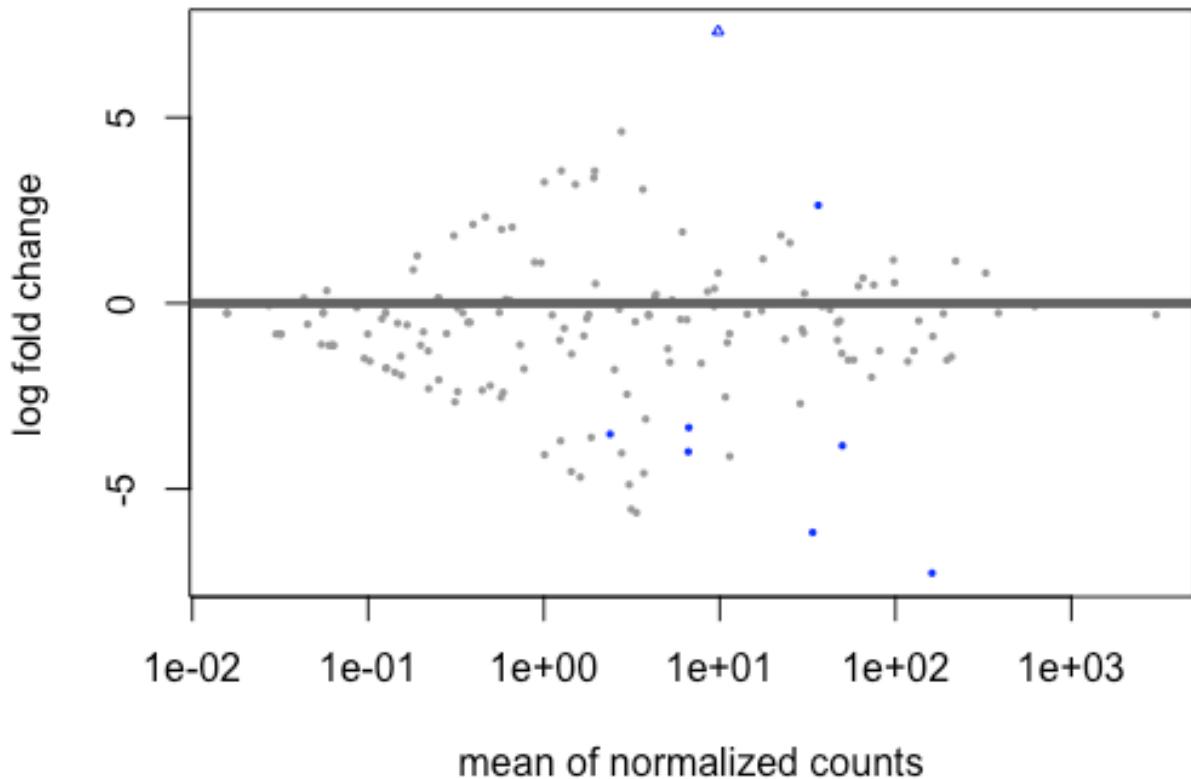


Abbildung 9: Darstellung der Ergebnisse der DESeq2-Analyse für die Betrachtung von Stuhlproben. Die blauen Punkte zeigen unterschiedlich abundant Taxa in den Gruppen *frail* und *pre-frail*. Das blaue Dreieck symbolisiert einen Punkt, dessen LFC außerhalb der Achsenbeschriftung liegt.

Anschließend wurden die Ergebnisse der DESeq2-Analyse getrennt für beide Geschlechter betrachtet. Bei der Untersuchung der Stuhlproben von weiblichen Patientinnen ergaben sich statistisch erkennbare Trends. Die Familie *Erysipelotrichaceae* und die Ordnung *Bacteroidales* zeigten sich mit einem adjustierten p-Wert von 0.06 und 0.09 unterschiedlich abundant in den Gruppen *frail* und *pre-frail* bei weiblichen Patientinnen. Bei der Betrachtung der Stuhlproben männlicher Patienten ergaben sich keine nennenswerten Ergebnisse.

Bei Betrachtung der **Speichelproben** zeigten sich in der DESeq2-Analyse keine Taxa, welche in den Gruppen *frail* bzw. *pre-frail* statistisch signifikant unterschiedlich exprimiert waren.

5 Diskussion

Die Entwicklung geriatrischer Syndrome ist multifaktoriell bedingt. Wissenschaftler*innen gehen davon aus, dass neben dem chronologischen Alter gewisse Umweltbedingungen, Lebensgewohnheiten und andere Faktoren die Entstehung geriatrischer Syndrome begünstigen. Mögliche Präventionsmodelle oder Therapieoptionen zu entwickeln stellt daher eine aktuelle Aufgabe der Forschung dar, um einer ohnehin alternden Bevölkerung eine bestmögliche Lebenserwartung und Lebensqualität bieten zu können (Inouye et al., 2007). Wie bereits dargestellt, stellt die Betrachtung des menschlichen Mikrobioms eine weitere Achse im multifaktoriellen Entstehungskonzept geriatrischer Syndrome dar.

Diese Arbeit beschäftigt sich zum einen mit der Frage, ob sich die Darm- und Mundhöhlen-Mikrobiota von geriatrischen Patient*innen hinsichtlich ihrer *Gebrechlichkeit* unterscheiden. Ziel ist es dabei, Unterschiede in den Mikrobiota zwischen *frail*- und *pre-frail*-Patient*innen herauszuarbeiten. Abschließen soll dieser Teil mit der Frage, ob die Diskriminierungsfähigkeit bezüglich der *Gebrechlichkeit* einer Person aus Stuhlproben größer ist als aus Speichelproben. Dieser Abschnitt dient einer kurzen Zusammenfassung der Ergebnisse und der Einbettung dieser in den aktuellen Forschungsstand.

Zum anderen soll diese Arbeit darstellen, wie die fokussierte und strukturierte Sammlung von Bioproben durch den Aufbau von Biobanken erleichtert werden kann. Dafür sollen entstandene Probleme diskutiert und konkrete Verbesserungsvorschläge angeboten werden.

5.1 Diversitätsunterschiede

Trotz der eingangs beschriebenen Veränderungen im Mikrobiom älterer Patient*innen, konnten in unserer Untersuchung keine Unterschiede in der Diversität der Darm- und Mundhöhlen-Mikrobiota zwischen *frail*- und *pre-frail*-Patient*innen gefunden werden. In der Vergangenheit konnte hingegen von mehreren Forschungsgruppen gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen der Diversität in Stuhlproben und der Entwicklung von Krankheiten, insbesondere dem hier dargestellten geriatrischen Syndrom *Gebrechlichkeit*, besteht (Jackson et al., 2016; Larson et al., 2022; le Chatelier et al., 2013; Zhang et al., 2019). Eine Studie mit 292 Proband*innen konnte

beispielsweise zeigen, dass jene mit einer geringeren *Richness* in der Darm-Mikrobiota häufiger an metabolischen Erkrankungen, wie Diabetes mellitus, Adipositas oder Fettstoffwechselstörungen, litten als Proband*innen mit höherer *Richness* (le Chatelier et al., 2013). In einer weiteren Studie wurden Stuhlproben von 728 Frauen aus der *TwinsUK cohort* analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die *Gebrechlichkeit* der Personen und die Alpha-Diversität, hier gemessen via Shannon- und Simpson-Index, negativ assoziiert waren. Je höher die *Gebrechlichkeit* einer Person, desto geringer die Alpha-Diversität. Einschränkend muss allerdings erwähnt werden, dass die Frauen im Mittel jünger waren (Alter: 63 Jahre, Spannweite: 42 bis 86 Jahre) und die *Gebrechlichkeit* der Personen anhand eines anderen Indexes bestimmt worden war (Jackson et al., 2016). Eine im Studiendesign zu unserer Untersuchung ähnlichen Studie an 27 hospitalisierten geriatrischen Patient*innen (15 Patient*innen in der *Gebrechlichkeits*-Gruppe und 12 Patient*innen in der Kontroll-Gruppe) konnte zeigen, dass sich die Alpha-Diversität in Stuhlproben zwischen der *Gebrechlichkeits*-Gruppe und einer Kontroll-Gruppe nicht unterschied, während die Beta-Diversität in Stuhlproben der *Gebrechlichkeits*-Gruppe größer war, also die Proben eine größere Unterschiedlichkeit in der Zusammensetzung zeigten als die Proben der Kontroll-Gruppe (Zhang et al., 2019). Auch eine weitere Untersuchung mit einer vergleichsweise kleinen Stichprobe an älteren Personen mit *Gebrechlichkeit* und Sarkopenie (n=18, Alter: 76 Jahre, Spannweite: 4 Jahre) und einer Kontroll-Gruppe (n=17, Alter: 74 Jahre, Spannweite: 3 Jahre) konnte keinen Unterschied in der Alpha-Diversität in den Stuhlproben der beiden Gruppen herausarbeiten (Picca et al., 2020). Eine jüngst veröffentlichte Studie untersuchte die Darm-, Mundhöhlen- und Haut-Mikrobiota von Bewohner*innen von Pflegeheimen (n=22, Alter: 65 - 97 Jahre) und von älteren Menschen in der Umgebung (n=25, Alter: 65 - 91 Jahre) und verglich diese mit den Daten einer jüngeren Kontroll-Gruppe (n=95, Alter: 18 - 55 Jahre). Auch wurde die *Gebrechlichkeit* der Personen unter anderem anhand des Konzeptes nach Fried et al. (2001) gemessen. Es zeigte sich eine höhere *Gebrechlichkeit* der Pflegeheimbewohner*innen gegenüber der Kontroll-Gruppe. Zudem konnte eine höhere Diversität in der Darm-Mikrobiota und eine niedrigere Diversität in der Mundhöhlen-Mikrobiota von älteren Pflegeheimbewohner*innen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe gezeigt werden (Larson et al., 2022).

Die Datenlage in Bezug auf die Alpha-Diversität in der Darm-Mikrobiota von Patient*innen mit und ohne *Gebrechlichkeit* zeigt sich also insgesamt noch

uneinheitlich. Tendenziell zeigt die Studienlage, dass das Auftreten des geriatrischen Syndroms *Gebrechlichkeit* mit einer Abnahme der Alpha-Diversität in der Darm-Mikrobiota einhergeht. Eine Abnahme der Alpha-Diversität wird auch insgesamt für die ältere Bevölkerung postuliert (Cresci & Bawden, 2016; Nagpal et al., 2018; Zhang et al., 2019). Hingegen finden sich auch Studien, welche, wie unsere Untersuchung, keinen Zusammenhang zwischen der Alpha-Diversität und dem Auftreten von *Gebrechlichkeit* nachweisen können (Picca et al., 2020; Zhang et al., 2019). Die Stichproben dieser Studien sind mit n=27 und n=35 klein, womit die Stichprobengröße eine mögliche Erklärung für die fehlende Nachweisbarkeit von Diversitätsunterschieden darstellen könnte.

Die Diversität der Mundhöhlen-Mikrobiota in Bezug auf das Auftreten von *Gebrechlichkeit* ist bisher wenig untersucht. Neben der oben erwähnten Untersuchung an Pflegeheimbewohner*innen und einer jüngeren Kontroll-Gruppe, in welcher die Mundhöhlen-Mikrobiota von Personen in der Pflegeeinrichtung eine geringere Alpha-Diversität aufzeigte als die der Kontroll-Gruppe (Larson et al., 2022), ist uns noch eine weitere Untersuchung zu diesem Zusammenhang bekannt. Hier wurde auch die Mundhöhlen-Mikrobiota von Personen in einer Pflegeeinrichtung (n=15, Alter: 84.2 Jahre, Spannweite: 8 Jahre) mit der von selbstständig lebenden (n=16, Alter: 87.0 Jahre, Spannweite: 5 Jahre) verglichen. Die Bewohner*innen der Pflegeeinrichtung wurden von den Autor*innen der Studie als *frail* eingestuft. Auf Gattungs-Ebene, auf welcher auch in unserer Studie die Vergleiche angestellt worden sind, konnte kein signifikanter Unterschied in der Alpha-Diversität der Mundhöhlen-Mikrobiota zwischen den beiden Gruppen detektiert werden. Auf Stammes-Ebene hingegen zeigte sich eine geringere Alpha-Diversität in der Pflegeheim-Gruppe (Ogawa et al., 2018).

Die wenigen Ergebnisse in der Literatur deuten auch hier darauf hin, dass die Entwicklung von *Gebrechlichkeit* mit einer geringeren Alpha-Diversität in der Mundhöhlen-Mikrobiota verbunden sein könnte. Um diese Aussage zu verifizieren, sind definitiv weitere Untersuchungen notwendig. Dank der einfacheren Zugänglichkeit der Mundhöhlen-Mikrobiota für die Probengewinnung ist davon auszugehen, dass der Erkenntnisgewinn bald zunehmen wird (Willis & Gabaldón, 2020).

Wie erwähnt konnten in unserer Untersuchung keine direkten Zusammenhänge zwischen der *Gebrechlichkeit* und der Diversität in Stuhlproben gefunden werden. Allerdings ergab sich eine positive Korrelation zwischen dem Chao-1-Index, einem

Index der Alpha-Diversität, und der Gehdauer, einem Element des *Gebrechlichkeit*-Konzeptes nach Fried et al. (2001). Je höher der Chao-1-Index, desto langsamer war das Gehtempo der untersuchten Personen. Wenn man davon ausgehen darf, dass ein verlangsamtes Gehtempo auch mit einer erhöhten *Gebrechlichkeit* einhergeht, unterscheidet sich diese Erkenntnis der negativen Korrelation von denen in der Literatur. Dort deuten die Mehrzahl der Untersuchungen auf einen negativen Zusammenhang zwischen *Gebrechlichkeit* und Diversität hin (Jackson et al., 2016). Wissenschaftler*innen haben auch schon postuliert, dass ein verlangsamtes Gehtempo durch eine eingeschränkte Mobilität begünstigt werden könnte. Diese wiederum vermag unter anderem zur Obstipation führen, welche Auswirkungen auf die Darm-Mikrobiota zeigen könnte (Van Tongeren et al., 2005).

Eine abschließende Aussage darüber, ob eine höhere *Gebrechlichkeit* als Konsequenz aus der geringeren Alpha-Diversität zu werten ist, oder ob die höhere *Gebrechlichkeit*, auch auf Umwegen, eine geringe Alpha-Diversität begünstigt, kann zu diesem Zeitpunkt, vor allem aufgrund des Studiendesigns (Querschnitt), nicht getroffen werden. Weitere Untersuchungen, vor allem auch im longitudinalen Studiendesign, werden zur Beantwortung dieser Frage benötigt.

Die dargelegte Studienlage kann die Hypothese 1a), dass sich die Darm- und Mundhöhlen-Mikrobiota von Patient*innen mit und ohne *Gebrechlichkeit* hinsichtlich ihrer Diversität unterscheiden, nicht bestätigen. Zudem bleibt unklar, in welche Richtung ein etwaiger Zusammenhang bestehen könnte. Ob eine erhöhte *Gebrechlichkeit* mit einer höheren und verminderter Diversität im Mikrobiom einhergeht, kann zu diesem Zeitpunkt nicht abschließend beurteilt werden. In dieser Untersuchung konnte aufgrund der Zusammensetzung der Studienpopulation keine Kontroll-Gruppe (*nicht-frail*-Patient*innen) betrachtet werden. Es ist denkbar, dass sich die Gruppen *frail* und *pre-frail* nicht in ihrer Diversität unterscheiden und erst ein Vergleich mit Patient*innen ohne *Gebrechlichkeit* Diversitätsunterschiede aufdecken könnte.

Bei der gleichzeitigen Betrachtung der Stuhl- und Speichelproben der Patient*innen wurde die hohe Beta-Diversität zwischen den Stuhl- und Speichelproben deutlich. Die Stuhl- und Speichelproben der Patient*innen sind sich demnach sehr unähnlich. Mit Blick auf die in Abschnitt 1.2 beschriebene unterschiedliche Zusammensetzung der Darm- und Mundhöhlen-Mikrobiota dürfte diese Erkenntnis wenig überraschen.

Während die Darm-Mikrobiota zu über 90% aus den Bakterienstämmen *Firmicutes* und *Bakteroidetes* besteht, erstreckt sich die Vielfalt der Mundhöhlen-Mikrobiota über sechs wesentliche Stämme. Die bestehende Unähnlichkeit lässt den Gedanken zu, dass möglicherweise ein Biomaterial den *Gebrechlichkeits*-Status der Personen besser abbilden kann als das andere Biomaterial. Aufschluss darüber, auch im Hinblick auf die Beantwortung der Hypothese 2) dieser Arbeit, sollen die folgenden Abschnitte liefern, in denen die Ergebnisse der *Random Forest*- und DESeq2-Analysen betrachtet und eingeordnet werden.

5.2 Häufigkeitsunterschiede

Diese Arbeit untersuchte unter anderem die unterschiedliche Abundanz von Taxa aus Stuhlproben in den Gruppen *frail* und *pre-frail*. Mit einem LFC von -6.17 (padj.=0.0001) fiel besonders die Bakteriengattung *Intestinimonas* auf. Diese war in der *frail*-Gruppe höher abundant als in der *pre-frail*-Gruppe. Dieses Ergebnis verdeutlichte sich allerdings nur bei der geschlechterunabhängigen Betrachtung aller Proben. Unterschiedliche Spezies der Gattung *Intestinimonas* konnten erst in den 2010-Jahren im Darm von Menschen und Mäusen nachgewiesen werden. Die Gattung gehört, wie in Abschnitt 1.1 erwähnt, zu den Butyratproduzenten in der Darm-Mikrobiota. Die Fähigkeit der Butyratproduktion rückte aufgrund der beschriebenen Eigenschaften (antiinflammatorisch, antioxidativ, antikanzerogen) in den Fokus der Mikrobiomforschung (Hinnebusch et al., 2002; Klampfer et al., 2003). Die Synthese von Butyrat durch Mikroorganismen erfolgt im Darm aus unterschiedlichen Substraten. Ausgangssubstrate der Butyratproduktion sind Glutarat, Succinat, Acetyl-CoA und die Aminosäure Lysin (Vital et al., 2014). Die Bakteriengattung *Intestinimonas* produziert Butyrat über die Fermentation von Lysin und nutzt damit einen anderen Weg als bereits erwähnte Butyratproduzenten der gleichen Bakterienfamilie (*Faecalibacterium prausnitzii* oder *Ruminococcus*). Der gleichzeitigen Metabolisierung von Lysin und der Butyrogenese aus Lysin mag hierbei eine besondere Stellung im Darm zugeschrieben werden können. Die Beschreiber der Bakteriengattung *Intestinimonas* verbinden diese eher mit positiven Effekten auf die Gesundheit des Menschen (Bui et al., 2016). Auch wenn die Bakteriengattung in den letzten Jahren das Interesse der Mikrobiomforschung geweckt hat, existieren unseres Wissens nach keine Studien,

welche *Intestinimonas* in Bezug auf geriatrische Syndrome oder sogar *Gebrechlichkeit* betrachteten.

Einige wenige Studien haben sich in den vergangenen Jahren mit den Zusammenhängen zwischen der Abundanz von *Intestinimonas* in der Darm-Mikrobiota, einer fettreichen Ernährung und der Entstehung von Übergewicht beschäftigt (Companys et al., 2021; Li et al., 2022; Lin et al., 2019). Vorwiegend handelte es sich dabei um Versuche an Mäusen. Es konnte gezeigt werden, dass eine fettreiche Ernährung der Mäuse zu einem Anstieg in der Abundanz einiger Bakteriengattungen, unter anderem *Intestinimonas*, führte (Lin et al., 2019). Auch eine jüngst erschienene Untersuchung an Mäusen beschäftigte sich mit einer erhöhten Abundanz von *Intestinimonas* und anderen Taxa in der Darm-Mikrobiota nach fettreicher Ernährung. Hier konnte gezeigt werden, dass sich bestimmte Stoffe im Tee positiv auf die Zusammensetzung der Darm-Mikrobiota auswirken können und die durch fettreiche Ernährung entstandene *Dysbiosis* somit ausgeglichen werden konnte (Li et al., 2022). Die Betrachtung des Mikrobioms als therapeutisches Target soll allerdings erst weiter unten näher betrachtet werden. Die Autor*innen einer Studie, welche das Mikrobiom von übergewichtigen Personen im Vergleich zu Normalgewichtigen betrachtete, bezeichnete *Intestinomonas* sogar als „einen Biomarker für Übergewichtige“ (Companys et al., 2021). Ergänzende Analysen unserer Stichprobe ergaben keine Hinweise auf einen signifikanten Abundanzunterschied von *Intestinimonas* zwischen übergewichtigen und normalgewichtigen geriatrischen Patient*innen.

Obwohl die Literatur unsere Beobachtung nicht stützt, dass die Bakteriengattung *Intestinimonas* zwischen den beiden Gruppen *frail* und *pre-frail* unterschiedlich abundant ist, lässt sich in unserer Untersuchung der deutliche Abundanzunterschied ($p<0.001$) nicht ignorieren. Gestützt wird diese Erkenntnis durch die *Random Forest*-Analyse. Hier wird die Gattung als eine wichtige Variable zur Unterscheidung zwischen den beiden Gruppen erkannt. Allerdings fällt auch dieses Ergebnis nur bei der geschlechterunabhängigen Betrachtung der Proben auf (siehe Abschnitt 4.5). Es bleibt zu diskutieren, ob sich die beiden Gruppen noch durch eine andere Variable als den *Gebrechlichkeits*-Status voneinander abgrenzen lassen (z.B. durch die Ergebnisse in Kognitionstests). Möglicherweise besteht der deutliche Abundanzunterschied nicht zwischen den Gruppen *frail* und *pre-frail*, sondern zwischen zum Beispiel normaler und

eingeschränkter Kognition. Aber diese Frage wird sich ohne ergänzende Untersuchungen in sich anschließenden Arbeiten nicht beantworten lassen.

In einer bereits oben erwähnten Untersuchung an älteren Personen mit *Gebrechlichkeit* und Sarkopenie (n=18, Alter: 76 Jahre, Spannweite: 4 Jahre) und einer Kontroll-Gruppe (n=17, Alter: 74 Jahre, Spannweite: 3 Jahre) konnte die unterschiedliche Abundanz einzelner Taxa in Stuhlproben gezeigt werden. Es erwies sich eine höhere Abundanz der Taxa *Oscillospira* und *Ruminococcus* in der Gruppe der Patient*innen mit *Gebrechlichkeit* und Sarcopenie (Picca et al., 2020). Beide gehören als Butyratproduzenten zur Familie der Ruminococcaceae (Gophna et al., 2017; Louis & Flint, 2017). Eine bereits erwähnte Studie an 728 Frauen untersuchte ebenfalls die unterschiedliche Abundanz von Taxa in Stuhlproben von Personen abhängig von ihrer *Gebrechlichkeit*. Dort fielen 21 Taxa mit einer signifikant niedrigeren Abundanz bei Personen mit höherer *Gebrechlichkeit* auf. Die meisten dieser Taxa gehörten zur Familie Ruminococcaceae, unter anderem die Spezies *Faecalibacterium prausnitzii*. Mit höherer Abundanz in der *Gebrechlichkeit*-Gruppe zeigten sich die Spezies *Eubacterium dolichum* und *Eggerthella lenta* (Jackson et al., 2016). Eine andere Forschungsgruppe konnte ebenfalls Abundanzunterschiede bezüglich des Taxon *Faecalibacterium prausnitzii* beobachten. Hier wurden die Abundanzunterschiede von Taxa in Stuhlproben in den Gruppen *frail* (hier: *high-frailty-group*, n=10) und *pre-frail* (hier: *low-frailty-group*, n=13) untersucht. Diese Studie konnte also, so wie unsere Untersuchung, keine Kontroll-Gruppe stellen. Die Probanden waren allesamt über 70 Jahre alt und wohnten in einer gemeinsamen Pflegeeinrichtung. Es konnte gezeigt werden, dass 17 Taxa statistisch signifikant unterschiedlich abundant zwischen den beiden Gruppen waren. Der prozentuale Anteil des Bakteriums *Faecalibacterium prausnitzii* war in der *high-frailty-group* niedriger als in der *low-frailty-group*, wohingegen der Anteil an *Ruminococcus* höher war (Van Tongeren et al., 2005).

In der Literatur und den hier stellvertretend vorgestellten Studien wird die Spezies *Faecalibacterium prausnitzii* als ein Taxon diskutiert, welches unterschiedlich abundant zwischen Personen mit und ohne *Gebrechlichkeit* zu sein scheint (Jackson et al., 2016; Van Tongeren et al., 2005). *Faecalibacterium prausnitzii* gehört, wie oben erwähnt, zu einem der wichtigsten Butyratproduzenten im menschlichen Darm (Duncan et al., 2002) mit den bereits für die Darmgesundheit genannten förderlichen

antiinflammatorischen und antioxidativen Eigenschaften (Hinnebusch et al., 2002; Klampfer et al., 2003). Es wird davon ausgegangen, dass die Entwicklung von *Gebrechlichkeit* unter anderem durch eine im Darm beginnende Entzündung begünstigt wird (Jackson et al., 2016). *Faecalibacterium prausnitzii* und andere Butyratproduzenten könnten positiven Einfluss auf die Entstehung der Entzündung (Miquel et al., 2015) und damit die Entstehung von *Gebrechlichkeit* nehmen (Jackson et al., 2016). Der Zusammenhang zwischen inflammatorischen Prozessen im Darm und der Entwicklung geriatrischer Syndrome bedarf weiterer Forschung in den kommenden Jahren. In dieser Arbeit zeigte sich die Gattung *Faecalibacterium* hingegen höher, wenn auch nicht signifikant, abundant in der *frail*-Gruppe verglichen mit der *pre-frail*-Gruppe.

Diese Arbeit bekräftigt die Hypothese 1b), welche sich mit der unterschiedlichen Abundanz einzelner Taxa in der Unterscheidung zwischen den Gruppen *frail* und *pre-frail* beschäftigt. Die Ergebnisse der Analysen deuten auf Bakteriengattungen hin, welche sich statistisch signifikant in der Abundanz zwischen den Gruppen unterscheiden. In Zusammenschau mit den Ergebnissen in der Literatur bleibt eine gewisse Unsicherheit, ob hier tatsächlich der Abundanzunterschied zwischen den Variablen *frail* und *pre-frail* oder möglicherweise zwischen zwei uns bisher unbekannten Variablen gemessen worden ist. Der eindeutige Abundanzunterschied einzelner Taxa und die passenden Ergebnisse in der *Random Forest*-Analyse werden allerdings nur bei der geschlechterunabhängigen Betrachtung der Proben, also bei der Betrachtung einer größeren Stichprobe, deutlich. Es ist möglich, dass sich etwaige Zusammenhänge erst ab einer gewissen Stichprobengröße aufdecken lassen.

5.3 Diskriminierungsfähigkeit von Stuhl- und Speichelproben

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Diskriminierungsfähigkeit aus Stuhlproben größer sei als aus Speichelproben. In der Vergangenheit befassten sich Wissenschaftler*innen weitaus mehr mit der Darm-Mikrobiota im Hinblick auf den Zusammenhang mit dem geriatrischen Syndrom *Gebrechlichkeit* als mit der Mundhöhlen-Mikrobiota. Ein Teil der vorliegenden Studien geht von einer Abnahme der Diversität der Darm-Mikrobiota bei Patient*innen mit *Gebrechlichkeit* aus (Jackson et al., 2016). Zudem erwiesen sich bestimmte Taxa als unterschiedlich abundant zwischen den Stuhlproben von Patient*innen mit und ohne *Gebrechlichkeit* (Jackson

et al., 2016; Picca et al., 2020; Van Tongeren et al., 2005; Zhang et al., 2019). Diese Studie, sowie andere Studien mit kleinen Stichproben (Zhang et al., 2019), konnten keine signifikanten Alpha-Diversitätsunterschiede in der Darm-Mikrobiota bei Patient*innen mit und ohne *Gebrechlichkeit* nachweisen. Der aktuelle Forschungsstand hinsichtlich der Mundhöhlen-Mikrobiota zeigt, dass auch hier eine geringere Diversität mit der Entwicklung von *Gebrechlichkeit* verbunden sein könnte (Larson et al., 2022; Ogawa et al., 2018). Bestimmte unterschiedlich abundant Taxa sind, zumindest in Hinblick auf *Gebrechlichkeit*, bisher nicht zu definieren. Es ist allerdings davon auszugehen, dass sich mit zunehmendem Erkenntnisgewinn Taxa hervortun werden, welche unterschiedlich abundant in Speichelproben zwischen den Gruppen *frail* und *pre-frail*, oder auch *frail* und *nicht frail*, sind. So konnte bereits gezeigt werden, dass eine höhere Abundanz der Spezies *Porphyromonas gingivalis* mit der Entwicklung der Alzheimer-Erkrankung zusammenhängt (Dominy et al., 2019). Auch konnten Verbindungen zwischen der Abundanz unterschiedlichster Taxa und einem Diabetes mellitus beobachtet werden (Casarin et al., 2013).

Bezüglich der gerechneten Korrelationen zwischen der Alpha-Diversität in Stuhl- und Speichelproben und des *Gebrechlichkeits*-Status einer Person, ließen sich signifikante Assoziationen zwischen der Alpha-Diversität in Stuhlproben und Parametern des *Gebrechlichkeit*-Konzeptes (Gehtempo) erkennen. Zwischen der Alpha-Diversität in Speichelproben und Parametern der *Gebrechlichkeit* konnten wir keine Assoziationen finden.

In Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich Hypothese 2) dieser Arbeit nicht abschließend beantworten. Eine höhere Diskriminierungsfähigkeit bezüglich des *Gebrechlichkeits*-Status einer Person aus Stuhlproben konnte nicht gefunden werden.

5.4 Herausforderungen im Umgang mit Bioproben

Wie eingangs erwähnt, war diese Studie unseres Wissens nach die erste, welche nicht-genetisches Material in die *Healthcare-embedded*-Biobank des UKSH unter *Broad Consent*-Bedingungen eingespeist hat. Folglich kam es im explorativen Setting zu verschiedenen Herausforderungen im Prozess der Biprobengewinnung, während des Transports und der Weiterverarbeitung der Proben. Diese sollen im Anschluss in

patient*innen-bezogene und struktur-bedingte Herausforderungen unterteilt werden. Zum Abschluss sollen konkrete Verbesserungsvorschläge gemacht werden.

5.4.1 Patient*innen-bezogene Herausforderungen

Die Gewinnung von Biomaterial vor allem älterer Patient*innen geht mit gewissen Herausforderungen für die Forschung einher (Larson et al., 2022). Die Gewinnung von Biomaterial unter erschwerten Bedingungen bei hospitalisierten geriatrischen Patient*innen könnte die übersichtliche Studienlage mit teils kleinen Stichproben zu Zusammenhängen zwischen dem Mikrobiom und geriatrischen Syndromen erklären. So zeigte sich auch in dieser Untersuchung, dass beispielsweise kognitive Einschränkungen oder Obstipation, welche jeweils praktische Probleme bei der Gewinnung von Biomaterial bzw. assoziierter Daten darstellen, aber auch die Einnahme von Antibiotika in den letzten sechs Wochen (Ausschlusskriterium) die Sammlung des Biomaterials verzögerte oder gar verhinderte. Studien deuten auf eine Veränderung in der Darm- und Mundhöhlen-Mikrobiota im Anschluss an eine Antibiotika-Therapie hin. Wenn auch anhand einer kleinen Stichprobe, untersuchte beispielsweise eine Studie den Einfluss der Antibiotika Clarithromycin und Metronidazol auf die Zusammensetzung der Darm- und Mundhöhlen-Mikrobiota nach wenigen Tagen, einem und vier Jahren. Insbesondere wenige Tage nach der Behandlung mit Antibiotika konnten Veränderungen in der Zusammensetzung des Mikrobioms im Vergleich zu einer unbehandelten Kontroll-Gruppe erkannt werden. Größtenteils hatten sich diese Veränderungen nach einem bzw. vier Jahren zurückgebildet (Jakobsson et al., 2010). Eine Rückverfolgbarkeit der Antibiotika-Einnahme bei geriatrischen Patient*innen über vier Jahre ist sicherlich schwer umsetzbar, in weiteren Studien sollte aber zumindest auf eine Verifizierung der Einnahme von Antibiotika (zum Beispiel über den Hausarzt oder die Hausärztin) in den vergangenen sechs Wochen geachtet werden, auch wenn dieses mit zusätzlichem Aufwand bei der Sammlung von Biomaterial einhergehen wird. Somit könnten verfälschten Ergebnissen durch eine jüngst vorhergegangene Antibiotika-Therapie vorgebeugt werden. Weiter interferierten kognitive Einschränkungen der Patient*innen mit der Effizienz der Probensammlung. Trotz Aufklärung und Instruktion der Patient*innen, nutzen diese für den Toilettengang zum Beispiel nicht den zur Verfügung gestellten Toilettenstuhl, sondern verrichteten und entsorgten den Stuhlgang auf der herkömmlichen Toilette. Unsere Erfahrung ist, dass

Studienteilnehmer*innen mit einem Punktewert von ≤21 im MoCA gehäuft Probleme mit der Umsetzbarkeit der Probensammlung hatten.

5.4.2 Struktur-bedingte Herausforderungen

Beim Aufbau der hier beschriebenen Biobank traten unterschiedliche struktur-bedingte Herausforderungen an den Tag. So stellte es eine Herausforderung dar, den Abnahmezeitpunkt von Biomaterial mit den Anwesenheitszeiten des Personals vom Labor abzustimmen. So konnte die personelle Besetzung des Labors zur Herstellung der Aliquots lediglich an zwei bis drei Tagen in der Woche für jeweils zwei Stunden gewährleistet sein. Um zu verhindern, dass das Material über längere Zeiträume ohne Weiterverarbeitung verblieb, musste dementsprechend eine Abnahme der Bioproben in diesen Zeitfenstern geschehen. Zum einen aus personellen, aber auch aus organisatorischen Gründen (z.B. Patient*in zum Zeitpunkt der Blutentnahme zur Untersuchung) konnte die Abnahme der Proben nicht immer rechtzeitig erfolgen und musste gegebenenfalls auf einen anderen Tag verlegt werden. Auch für die Abgabe der Speichelproben war ein korrekter Abnahmezeitpunkt von Bedeutung. Wie bereits in Abschnitt 1.2 erwähnt, haben Wissenschaftler*innen gezeigt, dass sich die Zusammensetzung der Mikroorganismen in der Mundhöhle kurz nach der Mundhygiene von jener sechs Stunden später relevant unterscheidet (Verma et al., 2018). Es sollte also in Zukunft bei der Gewinnung von Biomaterial aus der Mundhöhle auf einen definierten zeitlichen Abstand zum Zeitpunkt der Durchführung der Mundhygiene geachtet werden. Zudem konnte nicht immer sichergestellt werden, dass zu jedem Zeitpunkt der Stuhl- und Speichelproben-Abgabe geschultes Personal vor Ort war, um die Proben SOP-gerecht einfrieren zu können und somit eine verlängerte Liegedauer der Proben zu verhindern. In der Literatur wird die Zeit zwischen der Gewinnung der Proben und der Tiefkühlung jener als „*warm ischaemia*“ bezeichnet. Es wird dort bereits problematisiert, dass die sogenannte Zeit der warmen Ischämie in vielen Fällen nicht korrekt dokumentiert wird (Coppola et al., 2019). Vergleichbares trifft auf diese Untersuchung zu. Die Blut- und Speichelproben sind in allen Fällen umgehend weiterverarbeitet bzw. tiefgefroren worden. Da sich die Abgabe von Stuhlproben per definitionem nicht auf einen genauen Zeitpunkt festlegen ließ, kam es insbesondere bei diesen Proben gelegentlich zu längeren Liegezeiten des Materials, welche auch hier oft nicht stundengenau zu dokumentieren war. Die maximale Liegedauer der Stuhlproben bis zur Tiefkühlung bei -80°C sollte 24 Stunden nicht überschreiten (Paskal et al., 2018). Es ist nicht ausgeschlossen, dass es durch eine

unterschiedliche Liegedauer der Proben (in allen Fällen <24 Stunden, Proben wurden andernfalls verworfen) auch zu unterschiedlich großen Veränderungen in der mikrobiellen Zusammensetzung des Biomaterials gekommen sein könnte. In Zukunft sollte auf eine lückenlose Dokumentation der Liegedauer geachtet werden. Auch könnte eine Zwischenlagerung der Proben im Kühlschrank bei +4°C bei nächtlicher Abgabe als Prozessoptimierung in Erwägung gezogen werden.

Neben Schwierigkeiten in der Probengewinnung und dem anschließenden Weitertransport, sind Herausforderungen bei der Probenuordnung zu benennen. Die abgenommenen Bioproben wurden mit fortlaufenden Nummern versehen, welche gemäß des *Broad Consents* den Meta-Daten der Patient*innen zugeordnet wurden. Im teils kleinschritten Prozess von Gewinnung, Transport, Zwischenlagerung und Analyse der Proben kann es dabei zu Zuordnungsfehlern kommen. In dieser Studie kam es zu einem in Abbildung 7 veranschaulichten Ausreißer im Speichel-Datensatz. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei dieser Probe um eine Stuhlprobe handelte und ein Fehler in der Materialzuordnung wahrscheinlich ist. Es ist daher zu betonen, dass beim Umgang mit solchen Daten immer auf die Plausibilität geachtet werden muss. Zudem könnten solche Fehler durch eine größere Stichprobe kompensiert werden. Auch in der Literatur wird auf die Bedeutung eines präzisen und im besten Fall fehlerfreien Arbeitsablauf und auf die Möglichkeit der Nutzung von speziell auf die Bedarfe von Biobanken ausgerichtete IT-Systeme hingewiesen. Diese könnten die durch SOP's implementierten Arbeitsabläufe ergänzen und Probleme, wie beispielsweise in der Materialzuordnung, minimieren (Paskal et al., 2018).

Eine Weiterentwicklung des bestehenden Konzeptes, insbesondere mit Schulungen für beteiligtes Personal, könnte vermutlich zumindest einen Teil der genannten Herausforderungen erfolgreich adressieren. Beispielsweise könnte die Probengewinnung auch in der Ambulanz zu definierten Zeitpunkten durch instruiertes Personal stattfinden. Zudem könnte es eine Möglichkeit sein, die Stuhl- und Speichelproben, nicht wie in Abbildung 3 beschrieben in der Klinik für Neurologie, sondern im Institut für Klinische Chemie einzulagern, um die Logistik zu erleichtern.

Gesamthaft zeigt sich, dass eine Gewinnung von Biomaterial geriatrischer Patient*innen im stationären Setting, wenn auch mit den beschriebenen Herausforderungen, möglich ist. Im Hinblick auf den Prozess der Probengewinnung, der Standardisierung der Transportwege und der Schulung des beteiligten Personals

wurde Potential zur Verbesserung gesehen und konkrete Vorschläge unterbreitet. Zudem wurde die Notwendigkeit von longitudinalen Studiendesigns herausgearbeitet, um sich anschließende Fragestellungen beantworten zu können. Im Abschnitt 5.1 bleibt beispielsweise die Frage offen, ob die höhere *Gebrechlichkeit* eine geringe Alpha-Diversität in den Proben begünstigt, oder ob *Gebrechlichkeit* eine Folge geringer Alpha-Diversität sein könnte. Für die Beantwortung solcher Fragen und der Erstellung longitudinaler Designs ist die Zusammenarbeit mit einer Biobank von immenser Bedeutung.

Insgesamt ist die Anzahl an Biobanken in den vergangenen Jahren gestiegen. Wissenschaftler*innen erhoffen sich durch die strukturierte Gewinnung und Analyse von Proben und dazugehöriger Meta-Daten einen enormen Erkenntnisgewinn und Perspektiven für zukünftigen (personalisierte) Therapiemöglichkeiten (Paskal et al., 2018).

5.5 Limitationen der Studie

Aufgrund der besonderen Vulnerabilität der Studienpopulation ergaben sich Limitationen. Unsere Kohorte bestand aus multimorbidem geriatrischen Patient*innen, welche aufgrund eines aktuellen Krankheitsgeschehens stationär im Rahmen einer frühgeriatrischen Komplexbehandlung behandelt wurden. Bereits das umfangreiche Hauptprotokoll der ComOn Studie, bestehend aus Ganganalysen, Untersuchungen zum Gleichgewicht und kognitiven Assessments, stellte für einige Patient*innen eine körperliche und mentale Herausforderung dar. Die dazu ergänzende Abgabe von Bioproben, verbunden mit den dazugehörigen Fragebögen, erweiterte das ohnehin herausfordernde Programm der Patient*innen.

Zudem wurden einige der verwendeten Daten aus Fragebögen erhoben, welche die Patient*innen selbstständig ausfüllen mussten. Aufgrund der Fülle an Fragebögen kann nicht ausgeschlossen werden, dass es zu einem Motivationsverlust der Patient*innen gekommen war, und die Fragebögen nicht immer mit höchster Motivation ausgefüllt wurden. Zur Verbesserung der Datenqualität sollte eine Hilfestellung beim Ausfüllen der Fragebögen geleistet werden. Aus kapazitiven Gründen konnte diese nicht immer gestellt und somit potentiell bestehende Rückfragen der Patient*innen möglicherweise nicht immer geklärt werden.

Neben den Limitationen, welche durch die Struktur der Bioproben sammlung und die Erfassung von Informationen über Fragebögen entstehen, muss auf die Gruppeneinteilung hingewiesen werden. Die Einteilung der Patient*innen in *frail* und *pre-frail* muss als limitierend für die Qualität der Ergebnisse gesehen werden. Für weitere Untersuchungen sollte eine Kontroll-Gruppe mit Personen ohne Gebrechlichkeit eingeschlossen werden.

5.6 Ausblick

Diese Arbeit liefert einen Einblick in die Zusammensetzung des Mikrobioms bei einer stationär behandelten geriatrischen Kohorte. Viele Wissenschaftler*innen haben in den vergangenen Jahren versucht, das Potential des Mikrobioms für Diagnose, Prävention und Therapie von Erkrankungen zu definieren. So konnte beispielsweise bei Mäusen mit fettreicher Ernährung gezeigt werden, dass die Zufütterung von Oolong Tee über acht Wochen das Körpergewicht und die Fettmasse reduziert, die Blutwerte verbessert und die Abundanz einzelner Taxa in der Darm-Mikrobiota positiv verändert hatte (Li et al., 2022).

Aber auch an Menschen konnte die aktuelle Mikrobiomforschung bereits interessante Erkenntnisse bezüglich des Mikrobioms als Ansatzpunkt für Prävention und Therapie von Erkrankungen gewinnen. Eine Untersuchung an 178 älteren Personen zeigte einen Zusammenhang zwischen der Ernährung der Personen, ihrer Darm-Mikrobiota und der Entstehung von *Gebrechlichkeit*. Eine Ernährung reich an tierischen Produkten und mit einem geringen Anteil an pflanzlichen Bestandteilen erwies sich als förderlich bei der Entstehung von *Gebrechlichkeit* (Claesson et al., 2012). Ergänzende Untersuchungen zeigten, dass signifikante (wenn auch schwache) Assoziationen zwischen der Aufnahme von Ballaststoffen und der Darm-Mikrobiota bestehen, aber auch zwischen der Aufnahme von ungesättigten Fettsäuren und der Darm-Mikrobiota (Jeffery et al., 2016).

Dass die Ernährung des Menschen Auswirkungen auf das Mikrobiom hat, erscheint wenig überraschend. Welche Nährstoffe allerdings Mikrobiom-vermittelte förderliche Eigenschaften für die Gesundheit mit sich bringen, welche eventuell über die Beeinflussung des Mikrobioms Krankheiten verhindern oder bereits bestehende Krankheiten positiv beeinflussen können, gilt es in der Zukunft genauer zu eruieren.

Eine interdisziplinäre Zusammenarbeit aus Mediziner*innen, Mikrobiolog*innen und Ernährungswissenschaftler*innen ist dabei dringend erforderlich.

Für kommende Untersuchungen im Bereich der Mikrobiomforschung bei geriatrischen Patient*innen sollte der Fokus vor allem auf longitudinale Studien gelegt werden, um eine Entwicklung der Mikrobiota im Kontext zur klinischen Entwicklung der Patient*innen nachvollziehen zu können. Hilfreich bei der Erstellung longitudinaler Studiendesigns kann dabei die Entwicklung von Biobanken sein, um Veränderungen nicht nur im Mikrobiom, sondern auch in anderen Laborwerten darstellen zu können.

6 Zusammenfassung

Das geriatrische Syndrom *Gebrechlichkeit* betrifft etwa ein Viertel der Personen über 75 Jahre. Noch mehr der Personen über 75 Jahre sind von *Prä-Gebrechlichkeit* betroffen. Da *Gebrechlichkeit* mit Stürzen, Neuaufnahmen in Krankenhäusern und einer erhöhten Mortalität einhergeht, ist das frühzeitige Erkennen von Personen mit (*Prä-*)*Gebrechlichkeit* und den zugrunde liegenden Ursachen von besonderer Bedeutung. (*Prä-*)*Gebrechlichkeit* kann anhand klinischer Parameter definiert werden. Diese Arbeit hat untersucht, ob stationäre geriatrische Patient*innen mit *Prä-Gebrechlichkeit* sich hinsichtlich der Zusammensetzung der Darm- und Mundhöhlen-Mikrobiota von jenen mit *Gebrechlichkeit* unterscheiden.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Diversität der Darm- und Mundhöhlen-Mikrobiota zwischen *frail*- und *pre-frail*-Patient*innen gefunden werden. Bei der Betrachtung der Abundanz unterschiedlicher Taxa erwiesen sich, trotz geringer Stichprobengröße, unter anderem die Gattungen *Intestinimonas* und *Anaerotruncus* als signifikant unterschiedlich in den Stuhlproben der betrachteten Gruppen. Auch eine *Random Forest*-Analyse unterstrich die Wichtigkeit von *Intestinimonas* für die Unterscheidung von *frail*- und *pre-frail*-Patient*innen. Aus Speichelproben konnten keine statistisch signifikanten Erkenntnisse hinsichtlich der Abundanz gewonnen werden.

Diese Arbeit liefert somit neue Aspekte zur Mikrobiomanalyse im Rahmen der medizinischen Forschung. So konnte gezeigt werden, dass sich die Darm-Mikrobiota der betrachteten Gruppen hinsichtlich bestimmter Taxa signifikant unterscheidet. Offen bleibt, ob sich die Gruppen neben ihrem *Gebrechlichkeits*-Status noch in anderen Variablen unterscheiden, welche ebenfalls den Abundanzunterschied erklären könnten. Außerdem bleibt ungeklärt, ob die unterschiedliche Zusammensetzung des Mikrobioms die Entstehung von *Gebrechlichkeit* begünstigt, oder ob die unterschiedliche Zusammensetzung als Konsequenz von *Gebrechlichkeit* und einer eventuell damit einhergehenden Mobilitätseinschränkung zu betrachten ist. Die gewonnenen Kenntnisse über Veränderungen im Mikrobiom, welche möglicherweise mit der Entwicklung von *Gebrechlichkeit* einhergehen, ermöglichen das Mikrobiom als Ansatz für Prävention und Therapie von Erkrankungen nutzen zu können.

Zur Beantwortung der offen gebliebenen Fragen bedarf es weiterer Untersuchungen, vor allem im longitudinalen Studiendesign. Der Aufbau einer Biobank erleichtert durch die Speicherung von Biomaterialien den Aufbau solcher longitudinaler Designs. Diese Arbeit liefert relevante Aspekte zum Aufbau einer Biobank. 2017 wurde am UKSH, Campus Kiel, mit dem Aufbau einer *Healthcare-embedded*-Biobank begonnen. Dieses Konzept kann in Deutschland als bahnbrechend bezeichnet werden. Die vorliegende Studie war die erste, welche nicht-genetisches Material eingespeist hat und somit entscheidend am Aufbau beteiligt war. Es konnte in dieser Arbeit auf die Vorteile der Zusammenarbeit mit Biobanken hingewiesen werden. Zudem wurden Probleme im Arbeitsablauf erkannt und Verbesserungsvorschläge zur Prozessoptimierung unterbreitet.

Schließen soll diese Arbeit mit einer Aussage des Time-magazine, wessen Autor*innen den Auf- und Ausbau von Biobanken sogar zu den “*10 Ideas Changing the World Right Now*” zählen (Park, 2009).

Literaturverzeichnis

- Ahn, J., Chen, C. Y., & Hayes, R. B. (2012). Oral microbiome and oral and gastrointestinal cancer risk. In *Cancer Causes and Control* (Vol. 23, Issue 3, pp. 399–404). <https://doi.org/10.1007/s10552-011-9892-7>
- Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, 26(1), 32–46. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x>
- Annaratone, L., De Palma, G., Bonizzi, G., Sapino, A., Botti, G., Berrino, E., Mannelli, C., Arcella, P., Di Martino, S., Steffan, A., Daidone, M. G., Canzonieri, V., Parodi, B., Paradiso, A. V., Barberis, M., & Marchiò, C. (2021). Basic principles of biobanking: from biological samples to precision medicine for patients. In *Virchows Archiv* (Vol. 479, Issue 2, pp. 233–246). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00428-021-03151-0>
- Bibbò, S., Ianiro, G., Giorgio, V., Scaldaferri, F., Masucci, L., Gasbarrini, A., & Cammarota, G. (2016). The role of diet on gut microbiota composition. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 20(22), 4742–4749.
- Breiman, L. (2001). Random forests. *Machine Learning*, 45(1). <https://doi.org/10.1023/A:1010933404324>
- Bui, T. P. N., Shetty, S. A., Lagkouvardos, I., Ritari, J., Chamlagain, B., Douillard, F. P., Paulin, L., Piironen, V., Clavel, T., Plugge, C. M., & de Vos, W. M. (2016). Comparative genomics and physiology of the butyrate-producing bacterium *Intestinimonas butyriciproducens*. *Environmental Microbiology Reports*, 8(6), 1024–1037. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12483>
- Casarín, R. C. V., Barbagallo, A., Meulman, T., Santos, V. R., Sallum, E. A., Nociti, F. H., Duarte, P. M., Casati, M. Z., & Gonçalves, R. B. (2013). Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2 diabetes and chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 48(1), 30–36. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2012.01498.x>
- Chung, J. (2017). *Taxonomy of Clostridium clusters XIVa and IV*. Letzter Zugriff am 17.09.2023 <https://help.ezbiocloud.net/taxonomy-of-clostridium-cluster-xiva-iv/>
- Claesson, M. J., Jeffery, I. B., Conde, S., Power, S. E., O'connor, E. M., Cusack, S., Harris, H. M. B., Coakley, M., Lakshminarayanan, B., O'sullivan, O., Fitzgerald, G. F., Deane, J., O'connor, M., Harnedy, N., O'connor, K., O'mahony, D., van Sinderen, D., Wallace, M., Brennan, L., ... O'toole, P. W. (2012). Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*, 488(7410), 178–184. <https://doi.org/10.1038/nature11319>
- Clegg, A., Young, J., Iliffe, S., Rikkert, M. O., & Rockwood, K. (2013). Frailty in elderly people. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62167-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62167-9)
- Companys, J., Gosálbes, M. J., Pla-Pagà, L., Calderón-Pérez, L., Llauradó, E., Pedret, A., Valls, R. M., Jiménez-Hernández, N., Sandoval-Ramirez, B. A.,

del Bas, J. M., Caimari, A., Rubió, L., & Solà, R. (2021). Gut microbiota profile and its association with clinical variables and dietary intake in overweight/obese and lean subjects: A cross-sectional study. *Nutrients*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/nu13062032>

Coppola, L., Cianflone, A., Grimaldi, A. M., Incoronato, M., Bevilacqua, P., Messina, F., Baselice, S., Soricelli, A., Mirabelli, P., & Salvatore, M. (2019). Biobanking in health care: Evolution and future directions. In *Journal of Translational Medicine* (Vol. 17, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1922-3>

Craig, C. L., Marshall, A. L., Sjöström, M., Bauman, A. E., Booth, M. L., Ainsworth, B. E., Pratt, M., Ekelund, U., Yngve, A., Sallis, J. F., & Oja, P. (2003). International physical activity questionnaire: 12-Country reliability and validity. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 35(8), 1381–1395. <https://doi.org/10.1249/01.MSS.0000078924.61453.FB>

Cresci, G. A., & Bawden, E. (2016). *The Gut Microbiome: What we do and don't know*. 30(6), 734–746. <https://doi.org/10.1177/0884533615609899>.The

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). *H E A L T H A N D M E D I C I N E Porphyromonas gingivalis in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors*.

Duncan, S. H., Hold, G. L., Harmsen, H. J. M., Stewart, C. S., & Flint, H. J. (2002). Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(6), 2141–2146. <https://doi.org/10.1099/ijjs.0.02241-0>

Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., & Relma, D. A. (2005). Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*, 308(5728), 1635–1638.

Fox, G. E., Magrum, L. J., Balcht, W. E., Wolfe, R. S., Woese, C. R., & Barker, A. (1977). *Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization (comparative oligonucleotide cataloging/phylogeny/molecular evolution) Communicated by H* (Vol. 74, Issue 10).

Fried, L. P., Tangen, C. M., Walston, J., Newman, A. B., Hirsch, C., Gottdiener, J., Seeman, T., Tracy, R., Kop, W. J., Burke, G., & McBurnie, M. A. (2001). Frailty in Older Adults: Evidence for a Phenotype. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. <https://doi.org/10.1093/gerona/56.3.m146>

Geritz, J., Maetzold, S., Steffen, M., Pilotto, A., Corrà, M. F., Moscovich, M., Rizzetti, M. C., Borroni, B., Padovani, A., Alpes, A., Bang, C., Barcellos, I., Baron, R., Bartsch, T., Becktepe, J. S., Berg, D., Bergeest, L. M., Bergmann, P., Bouça-Machado, R., ... Maetzler, W. (2020). Motor, cognitive and mobility

deficits in 1000 geriatric patients: protocol of a quantitative observational study before and after routine clinical geriatric treatment - The ComOn-study. *BMC Geriatrics*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12877-020-1445-z>

Gomaa, E. Z. (2020). Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 113(12), 2019–2040. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01474-7>

Gophna, U., Konikoff, T., & Nielsen, H. B. (2017). Oscillospira and related bacteria – From metagenomic species to metabolic features. *Environmental Microbiology*, 19(3), 835–841. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13658>

Guigoz, Y., Vellas, B., & Garry, P. (1994). A practical assessment tool for grading the nutritional state of elderly patients. *Facts and Research in Gerontology*, 15–59.

Guigoz, Y., Vellas, B., & Garry, P. J. (1996). Nutrition Surveys in the Elderly. *Nutrition*, 54(January), S59–S65.

Guralnik, J. M., Simonsick, E. M., Ferrucci, L., Glynn, R. J., Berkman, L. F., Blazer, D. G., Scherr, P. A., & Wallace, R. B. (1994). A short physical performance battery assessing lower extremity function: Association with self-reported disability and prediction of mortality and nursing home admission. *Journals of Gerontology*, 49(2), 85–94. <https://doi.org/10.1093/geronj/49.2.M85>

Han, H., Guo, X., & Yu, H. (2016). Variable selection using Mean Decrease Accuracy and Mean Decrease Gini based on Random Forest. *Proceedings of the IEEE International Conference on Software Engineering and Service Sciences*, ICSESS, 0, 219–224. <https://doi.org/10.1109/ICSESS.2016.7883053>

Hinnebusch, B. F., Meng, S., Wu, J. T., Archer, S. Y., & Hodin, R. A. (2002). *Nutrition and Cancer The Effects of Short-Chain Fatty Acids on Human Colon Cancer Cell Phenotype Are Associated with Histone Hyperacetylation* 1. <https://academic.oup.com/jn/article/132/5/1012/4687296>

Inouye, S. K., Studenski, S., Tinetti, M. E., & Kuchel, G. A. (2007). Geriatric Syndromes: Clinical, Research and Policy Implications of a Core Geriatric Concept. In *J Am Geriatr Soc* (Vol. 55, Issue 5).

IPAQ Research Committee. (2005). *Guidelines for Data Processing and Analysis of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ)-Short and Long Forms*. Letzter Zugriff am 17.09.2023 www.ipaq.ki.se.

Jackson, M., Jeffery, I. B., Beaumont, M., Bell, J. T., Clark, A. G., Ley, R. E., O'Toole, P. W., Spector, T. D., & Steves, C. J. (2016). Signatures of early frailty in the gut microbiota. *Genome Medicine*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0262-7>

Jakobsson, H. E., Jernberg, C., Andersson, A. F., Sjölund-Karlsson, M., Jansson, J. K., & Engstrand, L. (2010). Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. *PLoS ONE*, 5(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009836>

- Jeffery, I. B., Lynch, D. B., & O'Toole, P. W. (2016). Composition and temporal stability of the gut microbiota in older persons. *ISME Journal*, 10(1), 170–182. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.88>
- Kataoka, K. (2016). The intestinal microbiota and its role in human health and disease. *Journal of Medical Investigation*, 63(1–2), 27–37. <https://doi.org/10.2152/jmi.63.27>
- Kim, S., & Jazwinski, S. M. (2018). The Gut Microbiota and Healthy Aging: A Mini-Review. In *Gerontology* (Vol. 64, Issue 6). <https://doi.org/10.1159/000490615>
- Klampfer, L., Huang, J., Sasazuki, T., Shirasawa, S., & Augenlicht, L. (2003). *Inhibition of Interferon ; Signaling by the Short Chain Fatty Acid Butyrate*.
- Kruskal, J. B. (1964). Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. *Psychometrika*, 29(1), 1–27. <https://doi.org/10.1007/BF02289565>
- Larson, P. J., Zhou, W., Santiago, A., Driscoll, S., Fleming, E., Voigt, A. Y., Chun, O. K., Grady, J. J., Kuchel, G. A., Robison, J. T., & Oh, J. (2022). Associations of the skin, oral and gut microbiome with aging, frailty and infection risk reservoirs in older adults. *Nature Aging*, 2(10), 941–955. <https://doi.org/10.1038/s43587-022-00287-9>
- Ie Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., & Prifti, E. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, 500, 541–549.
- Lexikon der Biologie. (1999). *Abundanz*. Lexikon Der Biologie. Letzter Zugriff am 17.09.2023 <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/abundanz/297>
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006). Human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444.
- Li, A., Wang, J., Kou, R., Chen, M., Zhang, B., Zhang, Y., Liu, J., Xing, X., Peng, B., & Wang, S. (2022). Polyphenol-rich oolong tea alleviates obesity and modulates gut microbiota in high-fat diet-fed mice. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.937279>
- Lin, H., An, Y., Tang, H., & Wang, Y. (2019). Alterations of Bile Acids and Gut Microbiota in Obesity Induced by High Fat Diet in Rat Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(13), 3624–3632. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00249>
- Louis, P., & Flint, H. J. (2017). Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. In *Environmental Microbiology* (Vol. 19, Issue 1, pp. 29–41). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13589>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Maetzler, W., Grond, M., & Jacobs, A. H. (2016). Neurogeriatrie. In *Neurologie* (Vol. 14, pp. 959–970).

- Mager, D. L., Haffajee, A. D., Delvin, P. M., Norris, C. M., Posner, M. R., & Goodson, J. M. (2005). The salivary microbiota as a diagnostic indicator of oral cancer: A descriptive, non-randomized study of cancer-free and oral squamous cell carcinoma subjects. *Journal of Translational Medicine*, 3. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-3-27>
- Miquel, S., Leclerc, M., Martin, R., Chain, F., Lenoir, M., Raguideau, S., Hudault, S., Bridonneau, C., Northene, T., Bowene, B., Bermúdez-Humarán, L. G., Sokol, H., Thomas, M., & Langella, P. (2015). Identification of metabolic signatures linked to anti-inflammatory effects of *Faecalibacterium prausnitzii*. *MBio*, 6(2), 1–10. <https://doi.org/10.1128/mBio.00300-15>
- Mitnitski, A. B., Mogilner, A. J., & Rockwood, K. (2001). Accumulation of deficits as a proxy measure of aging. *TheScientificWorldJournal*, 1, 323–336. <https://doi.org/10.1100/tsw.2001.58>
- Morley, J. E., Malmstrom, T. K., & Miller, D. K. (2012). A simple frailty questionnaire (FRAIL) predicts outcomes in middle aged african americans. *Journal of Nutrition, Health and Aging*, 16(7), 601–608. <https://doi.org/10.1007/s12603-012-0084-2>
- Müller-Wille, S. (2001). Gardens of paradise. *Endeavour*, 25(2), 49–54.
- Nagpal, R., Mainali, R., Ahmadi, S., Wang, S., Singh, R., Kavanagh, K., Kitzman, D. W., Kushugulova, A., Marotta, F., & Yadav, H. (2018). Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. In *Nutrition and Healthy Aging* (Vol. 4, Issue 4, pp. 267–285). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/NHA-170030>
- Ogawa, T., Hirose, Y., Honda-Ogawa, M., Sugimoto, M., Sasaki, S., Kibi, M., Kawabata, S., Ikebe, K., & Maeda, Y. (2018). Composition of salivary microbiota in elderly subjects. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18677-0>
- Oksanen, J. (2020). Vegan: ecological diversity. *R Software*.
- Park, A. (2009, March 12). *Biobanks - 10 ideas changing the world right now* -. TIME Magazine.
- Parker, C. T., Tindall, B. J., & Garrity, G. M. (2019). International code of nomenclature of Prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(1), S1. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000778>
- Paskal, W., Paskal, A. M., Dębski, T., Gryziak, M., & Jaworowski, J. (2018). Aspects of Modern Biobank Activity – Comprehensive Review. In *Pathology and Oncology Research* (Vol. 24, Issue 4, pp. 771–785). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s12253-018-0418-4>
- Picca, A., Ponziani, F. R., Calvani, R., Marini, F., Biancolillo, A., Coelho-Junior, H. J., Gervasoni, J., Primiano, A., Putignani, L., Del Chierico, F., Reddel, S., Gasbarrini, A., Landi, F., Bernabei, R., & Marzetti, E. (2020). Gut microbial, inflammatory and metabolic signatures in older people with physical frailty and sarcopenia: Results from the BIOSPHERE study. *Nutrients*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/nu12010065>

- Pushalkar, S., Ji, X., Li, Y., Estilo, C., Yegnanarayana, R., Singh, B., Li, X., & Saxena, D. (2012). Comparison of oral microbiota in tumor and non-tumor tissues of patients with oral squamous cell carcinoma. *BMC Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-144>
- Qian, X. B., Chen, T., Xu, Y. P., Chen, L., Sun, F. X., Lu, M. P., & Liu, Y. X. (2020). A guide to human microbiome research: study design, sample collection, and bioinformatics analysis. *Chinese Medical Journal*, 133(15), 1844–1855. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000871>
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., ... Yang, H. (2010). Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821.A>
- Rackaityte, E., & Lynch, S. V. (2020). The human microbiome in the 21st century. *Nature Communications*, 11(1), 19–21. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18983-8>
- Richter, G., Krawczak, M., Lieb, W., Wolff, L., Schreiber, S., & Buyx, A. (2018). Broad consent for health care-embedded biobanking: Understanding and reasons to donate in a large patient sample. *Genetics in Medicine*, 20(1), 76–82. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.82>
- Robert Koch Institut. (2015). *Gesundheit in Deutschland, Gesundheitsberichterstattung des Bundes gemeinsam getragen von RKI und Destatis.* Letzter Zugriff am 17.09.2023 https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GesInDtld/gesundheit_in_deutschland_2015.pdf?__blob=publicationFile
- Roberts, H. C., Denison, H. J., Martin, H. J., Patel, H. P., Syddall, H., Cooper, C., & Sayer, A. A. (2011). A review of the measurement of grip strength in clinical and epidemiological studies: Towards a standardised approach. *Age and Ageing*, 40(4), 423–429. <https://doi.org/10.1093/ageing/afr051>
- Rockwood, K., Stadnyk, K., MacKnight, C., McDowell, I., Hebert, R., & Hogan, D. B. (1999). A brief clinical instrument to classify frailty in elderly people. *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)04402-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)04402-X)
- Scott, K. P., Martin, J. C., Campbell, G., Mayer, C. D., & Flint, H. J. (2006). Whole-genome transcription profiling reveals genes up-regulated by growth on fucose in the human gut bacterium “Roseburia inulinivorans.” *Journal of Bacteriology*, 188(12), 4340–4349. <https://doi.org/10.1128/JB.00137-06>
- Sieber, C. C. (2007). Der ältere patient - Wer ist das? In *Internist* (Vol. 48, Issue 11, pp. 1190–1194). <https://doi.org/10.1007/s00108-007-1945-3>
- Speechley, M., & Tinetti, M. (1991). Falls and Injuries in Frail and Vigorous Community Elderly Persons. *Journal of the American Geriatrics Society*. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1991.tb05905.x>

- Takeshita, T., Kageyama, S., Furuta, M., Tsuboi, H., Takeuchi, K., Shibata, Y., Shimazaki, Y., Akifusa, S., Ninomiya, T., Kiyohara, Y., & Yamashita, Y. (2016). Bacterial diversity in saliva and oral health-related conditions: The Hisayama Study. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep22164>
- Tijs, B., van der Kloet, F., & Galland, M. (2020). *RNA-seq lesson*. Letzter Zugriff am 17.09.2023 <https://github.com/ScienceParkStudyGroup/rnaseq-lesson>
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2007). The Human Microbiome Project. In *Nature* (Vol. 449, Issue 7164, pp. 804–810). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature06244>
- Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). Defining the human microbiome. *Nutrition Reviews*, 70(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x>
- Van Tongeren, S. P., Slaets, J. P. J., Harmsen, H. J. M., & Welling, G. W. (2005). Fecal microbiota composition and frailty. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 6438–6442. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.6438-6442.2005>
- Verma, D., Garg, P. K., & Dubey, A. K. (2018). Insights into the human oral microbiome. In *Archives of Microbiology* (Vol. 200, Issue 4, pp. 525–540). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1505-3>
- Veronese, N., Custodero, C., Cella, A., Demurtas, J., Zora, S., Maggi, S., Barbagallo, M., Sabbà, C., Ferrucci, L., & Pilotto, A. (2021). Prevalence of multidimensional frailty and pre-frailty in older people in different settings: A systematic review and meta-analysis. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 72). <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101498>
- Vital, M., Howe, A. C., & Tiedje, J. M. (2014). Revealing the bacterial butyrate synthesis pathways by analyzing (meta)genomic data. *MBio*, 5(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00889-14>
- Wang, Z., Klipfell, E., Bennett, B. J., Koeth, R., Bruce, S., Dugar, B., Feldstein, A. E., Britt, E. B., Fu, X., Wu, Y., Schauer, P., Smith, J. D., Allayee, H., Tang, W., Didonato, J. A., Lusis, A. J., & Hazen, S. L. (2011). *cardiovascular disease*. 472(7341), 57–63. <https://doi.org/10.1038/nature09922.Gut>
- Willis, J. R., & Gabaldón, T. (2020). The human oral microbiome in health and disease: From sequences to ecosystems. In *Microorganisms* (Vol. 8, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020308>
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Teng, J. L. L., Tse, H., & Yuen, K. Y. (2008). Then and now: Use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 14, Issue 10, pp. 908–934). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02070.x>
- World Health Organization. (2022, October 1). *Ageing and health*. Letzter Zugriff am 17.09.2023 <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health>

Zhang, L., Liao, J., Chen, Q., Chen, M., Kuang, Y., Chen, L., & He, W. (2019). Characterization of the gut microbiota in frail elderly patients. *Aging Clinical and Experimental Research*. <https://doi.org/10.1007/s40520-019-01385-2>

Anhang

Anhang 1: Kriterien zur Definition von *frail*, *pre-frail* und *nicht frail* nach Fried et al. und derer Adaptation an die ComOn-Messbatterie

	Definition	Frail-Punkt
Gewichtsverlust		
Fried et al.	ungewollte Abnahme von 10 Pfund (= 4.53 kg) innerhalb des letzten Jahres	1 Punkt bei Ja
ComOn	ungewollte Abnahme von 1-3 (oder mehr) kg innerhalb der letzten 3 Monate	1 Punkt bei Ja
Erschöpfung		
Fried et al.	CES-D Depression Scale I felt that everything I did was an effort I could not get going “How often in the last week did you feel this way?” 0. rarely or none of the time (1 day) 1. some or a little of the time (1–2 days) 2. a moderate amount of the time (3–4 days) 3. most 60ft he time	1 Punkt bei Antwort 2 und 3
ComOn	FRAIL-Erschöpfungs-Item Do you feel worn out? Or Do you feel tired?	1 Punkt bei Ja
Körperliche Aktivität		
Fried et al.	Orientiert an der „short version of the Minnesota Leisure Time Activity questionnaire“	Frauen: 1 Punkt bei 270 kcals of physical activity pro Woche Männer: 1 Punkt bei 383 kcals of physical activity pro Woche
ComOn	Orientiert an „International Physical Activity Questionnaire“ (IPAQ) Aktivität ist 1. Nicht ausreichend 2. Ausreichend 3. Hoch-aktiv	1 Punkt bei Antwort 1
Gehdauer		
Fried et al.	Cut-offs bei 15 Fuß (=4.572m) Gehstrecke	Frauen: 1 Punkt bei
ComOn	Abhängig von Geschlecht und Körpergröße	Größe ≤ 159cm ≥ 7 sek Größe > 159cm ≥ 6 sek Männer: 1 Punkt bei Größe ≤ 173cm ≥ 7 sek Größe > 173cm ≥ 6 sek
Handgreifkraft		
Fried et al.	Handgreifkraft in kg	Frauen: 1 Punkt bei
ComOn	Abhängig von Geschlecht und BMI	BMI ≤ 23 ≤ 17 kg BMI 23.1–26 ≤ 17,3 kg BMI 26.1–29 ≤ 18 kg BMI > 29 ≤ 21 kg Männer: 1 Punkt bei BMI ≤ 24 ≤ 29 kg BMI 24.1–26 ≤ 30 kg BMI 26.1–28 ≤ 30 kg BMI > 28 ≤ 32 kg

Anhang 2: Darstellung der Ergebnisse der PERMANOVA für Stuhlproben

	Df	SofSq	MeanSqs	F.Model	R2	Pr (>F)
FRAIL	1	0.1152	0.11516	0.71369	0.03287	0.77
Residuals	21	3.3886	0.16136		0.96713	
Total	22	3.5037			1.00000	

Df: Degrees of Freedom, SofSq: Sums of Squares, MeanSqs: Mittlere Squares, Pr (>F) gibt den p-Wert an

Anhang 3: Darstellung der Ergebnisse der PERMANOVA für den Vergleich von Stuhl- und Speichelproben

	Df	SofSq	MeanSqs	F.Model	R2	Pr (>F)
Biomaterial	1	7.0860	7.0860	44.045	0.49464	0.001
Residuals	45	7.2396	0.1609		0.50536	
Total	46	14.3256			1.00000	

Df: Degrees of Freedom, SofSq: Sums of Squares, MeanSqs: Mittlere Squares, Pr (>F) gibt den p-Wert an

Erklärung zum Eigenteil

Diese Arbeit wurde unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Walter Maetzler in der Klinik für Neurologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, durchgeführt. Die Promovendin Katharina Frommhagen war seit Mai 2018 in die Planung und Durchführung der ComOn Studie eingebunden. Dabei war sie vor allem an der Integration der Sammlung von Bioproben in die ComOn Studie beteiligt und in die Analyse und Interpretation dieser Daten involviert.

Am 4. September 2021 wurde ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit beim online ausgetragenen Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Geriatrie im Rahmen eines Posters vorgestellt. Das Poster wurde von der Promovendin in Eigenarbeit erstellt und gewann den 1. Preis unter 82 eingereichten Postern.

Niemann, K., Bang, C., Franke, A., Geritz, J., Hansen, C., Heinzel, S., Rausch, P., Welzel, J., Bergmann, P., Maetzler, W. (2021). Mikrobiom-Studie an geriatrischen Patient*innen: Präsentation des Studienprotokolls. Posterpräsentation beim online ausgetragenen Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Geriatrie, 4.09.2021.

Das hier vorgelegte Manuskript wurde von der Promovendin selbstständig erstellt. Dabei hat die Promovendin die Fragestellung dieser Arbeit unter Betreuung selbstständig entworfen, die statistischen Analysen mit Hilfestellung selbstständig durchgeführt, die Literaturrecherche selbstständig durchgeführt sowie die Diskussion selbstständig erstellt.

Es wurden keine weiteren als die angegebenen Quellen verwendet.

Kiel, den 19.09.2023

Katharina Frommhagen

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Walter Maetzler für die herzliche, zuverlässige und kompetente Betreuung dieser Arbeit bedanken. Die wertschätzenden und stets motivierenden Gespräche haben mir sehr bei der Umsetzung dieser Arbeit geholfen. Auch möchte ich mich für das Vertrauen bedanken, welches mir zu jeder Zeit bei der Umsetzung meiner Projekte im Rahmen der ComOn Studie entgegengebracht worden ist.

Weiter danke ich Johanna Geritz für ihre immerwährende Unterstützung und ihre unablässige Geduld mit mir während der letzten Jahre. Ohne ihre konstruktiven und ermunternden Anmerkungen zu dieser Arbeit, hätte diese niemals so entstehen können. Zudem gilt mein Dank Clint Hansen und Milda Resch, welche mir bei jeglicher Art (software-) technischer Fragen zuverlässig und prompt zur Seite standen, sowie der gesamten Arbeitsgruppe Neurogeriatrie für das herzliche Miteinander.

Auch möchte ich mich bei Patrick bedanken, ohne dessen Unterstützung in allen Lebenslagen ich diese Arbeit niemals hätte schreiben können. Seine fürsorgliche, humorvolle und gleichzeitig pragmatische Art haben den Umgang mit Rückschlägen immer erleichtert. Und ich danke Jonte, unserem Sohn, der zwar das Zeitmanagement dieser Arbeit häufig durcheinandergebracht hat, aber mir trotzdem immer wieder Kraft und Muße geben konnte.

Und zuletzt danke ich meinem Vater, welcher mir auf seine eigene Art und Weise wiederkehrend das Gefühl gegeben hat, stolz auf mich zu sein.