

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

**Das Mikrobiom von stationären multimorbiden  
geriatrischen Patient:innen mit und ohne Idiopathischem  
Parkinson-Syndrom**

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

vorgelegt von

Levin Marc Lützel Schwab

aus Freiburg im Breisgau

Kiel [2024]

1.Berichterstatter: Prof. Dr. med. Walter Maetzler

2.Berichterstatter/in: Priv. Doz. Dr. med. Anette Friedrichs

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.2026

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 10.11.2025

gez.: Priv.-Doz. Dr. med. Steffen Paschen

# INHALTSVERZEICHNIS

|   |           |
|---|-----------|
| Abbildungsverzeichnis.....                              | III       |
| Tabellenverzeichnis.....                                | IV        |
| Abkürzungsverzeichnis.....                              | V         |
| <b>1 Einleitung .....</b>                               | <b>1</b>  |
| <b>1.1 Gesamtkontext .....</b>                          | <b>1</b>  |
| <b>1.2 Geriatrie .....</b>                              | <b>2</b>  |
| <b>1.3 Idiopathisches Parkinson-Syndrom (IPS).....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>1.4 Mikrobiom .....</b>                              | <b>8</b>  |
| 1.4.1 Darm-Hirn-Achse .....                             | 14        |
| 1.4.2 Mikrobiom und Dysbiose.....                       | 17        |
| 1.4.3 Mikrobiom und IPS.....                            | 19        |
| <b>1.5 Hypothesen dieser Arbeit .....</b>               | <b>24</b> |
| <b>2 Methoden.....</b>                                  | <b>26</b> |
| <b>2.1 ComOn-Studie .....</b>                           | <b>26</b> |
| 2.1.1 <i>Biobanking</i> .....                           | 27        |
| <b>2.2 Datenerhebung .....</b>                          | <b>28</b> |
| 2.2.1 Mikrobiomdaten-Verarbeitung .....                 | 28        |
| <b>2.3 Datenauswertung .....</b>                        | <b>29</b> |
| 2.3.1 Demographische und klinische Daten.....           | 32        |
| 2.3.2 Mikrobiomdaten .....                              | 34        |
| <b>3 Ergebnisse.....</b>                                | <b>40</b> |
| <b>3.1 Demographische Daten .....</b>                   | <b>40</b> |
| <b>3.2 Einflussnehmende Faktoren.....</b>               | <b>42</b> |
| <b>3.3 Stuhl- vs. Speichelproben (Hypothese 1).....</b> | <b>45</b> |
| <b>3.4 IPS vs. nND (Hypothese 2).....</b>               | <b>49</b> |
| 3.4.1 Alpha-Diversität (2a).....                        | 49        |
| 3.4.2 Beta-Diversität (2b).....                         | 54        |
| 3.4.3 Random-Forest-Analyse (2c) .....                  | 55        |
| 3.4.4 DESeq2-Analyse (2c) .....                         | 58        |
| <b>4 Diskussion.....</b>                                | <b>59</b> |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>4.1</b> | <b>Hypothese 1.....</b>                    | <b>59</b> |
| <b>4.2</b> | <b>Hypothese 2.....</b>                    | <b>60</b> |
| <b>4.3</b> | <b>Interpretation der Ergebnisse .....</b> | <b>62</b> |
| <b>4.4</b> | <b>Allgemeine Limitationen .....</b>       | <b>67</b> |
| <b>5</b>   | <b>Zusammenfassung.....</b>                | <b>70</b> |
| <b>6</b>   | <b>Literaturverzeichnis .....</b>          | <b>72</b> |
| <b>7</b>   | <b>Appendix .....</b>                      | <b>88</b> |
| <b>8</b>   | <b>Danksagung.....</b>                     | <b>90</b> |

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: <i>Begrifflichkeiten in der Mikrobiomforschung</i> .....  | 10 |
| Abbildung 2: <i>Gut-Brain-Axis – die Bidirektionale Kommunikation zwischen Mikrobiom und Gehirn</i> .....                                    | 17 |
| Abbildung 3: <i>Alpha- und Beta-Diversität</i> .....   | 18 |
| Abbildung 4: <i>Bildung der Subgruppen zur Beantwortung der Hypothesen</i> .....   | 31 |
| Abbildung 5: <i>Das Mikrobiom beeinflussende Größen</i> .....  | 33 |
| Abbildung 6: <i>Statistische Analysen zur Alpha-Diversität</i> .....   | 37 |
| Abbildung 7: <i>Demographische Daten der Subgruppen</i> .....  | 41 |
| Abbildung 8: <i>Beta-Diversität nach Bray-Curtis von Stuhl- und Speichelproben auf Gattungsebene (links) und Speziesebene (rechts)</i> ..... | 46 |
| Abbildung 9: <i>Relative Abundanz der bakteriellen Phyla zwischen den Probenarten Stuhl- vs. Speichelproben</i> .....                        | 47 |
| Abbildung 10: <i>Random-Forest-Analyse der Stuhl- vs. Speichelproben</i> .....   | 48 |
| Abbildung 11: <i>Signifikante T-Test Analysen der Stuhlproben: IPS vs. nND der Pielou's Evenness und des ACE</i> .....                       | 51 |
| Abbildung 12: <i>Beta-Diversität nach Bray-Curtis von „IPS vs. nND: Stuhlproben“ auf Gattungs- und Speziesebene</i> .....                    | 54 |
| Abbildung 13: <i>Beta-Diversität nach Bray-Curtis von „IPS vs. nND: Speichelproben“ auf Gattungs- und Speziesebene</i> .....                 | 55 |
| Abbildung 14: <i>Random-Forest-Analyse der Stuhlproben auf Familienebene</i> .....   | 56 |
| Abbildung 15: <i>Random-Forest-Analyse der Speichelproben auf Familienebene</i> .....  | 57 |

# TABELLENVERZEICHNIS

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: <i>Taxonomische Einteilung</i> .....  | 9  |
| Tabelle 2: <i>Einflussfaktoren der Gruppe Stuhlproben: IPS vs. nND</i> .....   | 43 |
| Tabelle 3: <i>Einflussfaktoren der Gruppe Speichelproben: IPS vs. nND</i> .....  | 44 |
| Tabelle 4: <i>Ergebnisse der EdgeR-Analyse der Stuhl- vs. Speichelproben</i> .....                                       | 49 |
| Tabelle 5: <i>Unterschiede in der Alpha-Diversität der Stuhlproben: IPS vs. nND auf Gattungs- und Speziesebene</i> ..... | 51 |
| Tabelle 6: <i>ANCOVA der Pielou's Evenness der Stuhlproben: IPS vs. nND auf Gattungsebene</i> .....                      | 52 |
| Tabelle 7: <i>ANCOVA des ACE der Stuhlproben: IPS vs. nND auf Speziesebene</i> .....                                     | 53 |
| Tabelle 8: <i>Ergebnisse der DESeq2-Analyse der Stuhl- und Speichelproben auf Familienebene</i> .....                    | 58 |

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|               |  |
|---------------|--|
| 16S-rRNA      | 16S-ribosomale Ribonukleinsäure                          |
| $\alpha$ -Syn | alpha-Synuklein  |
| ACTH          | Adrenocorticotropes Hormon                               |
| ANCOVA        | Kovarianzanalyse   |
| ASVs          | Amplikon-Sequenz-Varianten                               |
| BBB           | Blood-Brain-Barrier                                      |
| BMI           | Body-Mass-Index  |
| ComON         | COgnitive and Motor interactions in the Older population |
| COMT          | Catechol-O-Methyltransferase                             |
| CRH           | Corticotropin-Releasing-Hormon                           |
| FDR           | False Discovery Rate                                     |
| GABA          | gamma-Aminobuttersäure                                   |
| GBA           | Gut-Brain-Axis   |
| GLP1          | Glukagon-Like-Peptide1                                   |
| IKMB          | Institut für Klinische Molekularbiologie                 |
| IL-6          | Interleukin 6  |
| IPS           | Ideopatisches Parkinson-Syndrom                          |
| LFC           | Log Fold Change  |
| logCPM        | log Counts Per Million                                   |
| LPS           | Lipopolysaccharide                                       |
| MDA           | Mean Decrease Accuracy                                   |
| MDS           | Movement Disorder Society                                |
| NMDA          | N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptorantagonist                   |
| NMDS          | Nicht-metrische MultiDimensionale Skalierungen           |
| nND           | nicht neurodegenerativ Erkrankte                         |
| MAO-B         | Monoaminoxidase-B-Hemmer                                 |
| OOB           | Out Of Bag   |
| OTU           | Operating Taxonomic Units                                |
| p             | empirisches Signifikanzniveau                            |
| PK            | Parkinson-Krankheit                                      |
| PNS           | peripheres Nervensystem                                  |
| REM           | Rapid-Eye-Movemet  |

|              |                          |
|--------------|--------------------------|
| SCFAs        | Short-Chain-Fatty-Acids  |
| TNF $\alpha$ | Tumornekrosefaktor alpha |
| vs.          | versus                   |
| z.B.         | zum Beispiel             |

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Gesamtkontext

Neurodegenerative Erkrankungen stehen schon seit längerem im Verdacht mit Veränderungen des Darmmikrobioms einherzugehen (Ullah et al., 2023). Immer mehr Studien legen nahe, dass sich das Mikrobiom von neurodegenerativ Erkrankten im Vergleich zu dem von nicht-neurodegenerativ Erkrankten (nND) in der Zusammensetzung unterscheidet (Bang & Heinzl, 2023; Ullah et al., 2023). Die Ursachen und Mechanismen, die diesen Veränderungen zugrunde liegen, sowie die damit einhergehenden Konsequenzen sind trotz intensiver Forschungsbestrebungen bisher umstritten (Wallen et al., 2020). Weitere grundlagenwissenschaftliche und klinische Studien zu diesem Thema sind unerlässlich und bilden die Basis für ein besseres Verständnis, inwiefern das Mikrobiom eine Rolle in der Pathophysiologie von neurodegenerativen Erkrankungen spielt (Bang & Heinzl, 2023; Ullah et al., 2023).

Doch was ist Neurodegeneration eigentlich? Das Nervensystem besteht aus einer Vielzahl miteinander verknüpfter, in ständigem Kontakt stehender Neurone und spielt eine zentrale Rolle für die Physiologie des Körpers (Lamprey et al., 2022). Aus neuronalen Stammzellen entsteht bis zum Ende der Pubertät die maximale Anzahl an Neuronen (Sorrells et al., 2018). Neurodegeneration bezeichnet einen aus verschiedensten Ursachen entstandenen, in der neuronalen Zelle lokalisierter progressiver Verlust an Zahl, Struktur oder Funktion von Neuronen einer spezifischen anatomischen und funktionellen Gruppe (Przedborski, 2017). Die damit einhergehenden Krankheitsbilder werden als neurodegenerative Erkrankungen zusammengefasst (Przedborski, 2017). Hierzu zählen Erkrankungen wie die Alzheimer-Demenz und die Parkinson-Krankheit (Ullah et al., 2023). Ziel aktueller Forschung ist es, aus einem besseren Verständnis bezüglich des wechselseitigen Einflusses von Mikrobiom und neurodegenerativen Erkrankungen - insbesondere dem Idiopathischen Parkinson-Syndrom (IPS) - präventive und therapeutische Maßnahmen abzuleiten (Bang & Heinzl, 2023; Ullah et al., 2023). Es wurden bereits eine Vielzahl von Mikrobiomstudien, die sich mit dieser Frage beschäftigten, durchgeführt (Morais et al., 2021; Ullah et al., 2023; Zacharias et al., 2022). Ein einheitlicher Konsens über parkinsontypische mikrobielle Veränderungen besteht aktuell noch nicht (Z. Li et al., 2022; Plassais et al., 2021; Ullah et al., 2023; Wallen et al., 2020). Weitere Studien

aus unterschiedlich zusammengesetzten Kohorten in Hinblick auf Ethnizität, Alter, Geschlecht und Komorbiditäten könnten zu einem besseren Verständnis dieser Thematik beitragen (Qian et al., 2020). Gerade das Mikrobiom älterer, geriatrischer Patient:innen, welches im Rahmen dieser Studie untersucht wurde, ist besonders variabel und durch eine hohe Vulnerabilität gegenüber Umweltveränderungen gekennzeichnet (Bäuerl et al., 2018). Mikrobiomstudien von geriatrischen Patient:innen könnten zu einem besseren Verständnis über spezifische Veränderungen des Mikrobioms beitragen, welche mit der Parkinson-Krankheit assoziiert sind (Bang & Heinzl, 2023; Ullah et al., 2023).

## 1.2 Geriatrie

Bevor auf wissenschaftliche Grundlagen und aktuelle Forschungsstände im Hinblick auf Mikrobiom und Parkinson-Krankheit eingegangen wird, wird zunächst die Bedeutung der Geriatrie dargestellt. Die Geriatrie, auch als Altersmedizin bekannt, ist eine medizinische Fachrichtung, die sich mit der Prävention, Diagnostik, Therapie und Rehabilitation von Gesundheitsproblemen älterer Menschen befasst. Sie wird aufgrund des demographischen Wandels in Zukunft eine immer zentralere Rolle im Gesundheitssystem einnehmen (Lübke et al., 2015). Der demographische Wandel ist durch eine Verschiebung der Altersstruktur einer Bevölkerung im Laufe der Zeit gekennzeichnet und wird maßgeblich durch Geburtenrate, Sterberate und Migration beeinflusst (Nowossadeck, 2012; Statistisches Bundesamt, 2023). Der aktuell stattfindende demographische Wandel in Deutschland ist durch eine steigende Zahl älterer Menschen und eine sinkende Zahl jüngerer Menschen gekennzeichnet (Statistisches Bundesamt, 2023). Im Vergleich zum Jahre 1950, als etwa jede zehnte Person älter als 65 Jahre alt war, war im Jahre 2021 bereits jeder fünfte Deutsche über 65 Jahre alt (Statistisches Bundesamt, 2023). Grund dafür ist eine immer höher werdende Lebenserwartung bei gleichzeitig unter dem Erhaltungsniveau liegender Geburtenrate. Eine Trendumkehr ist trotz wachsender Migration in den nächsten Jahren nicht abzusehen (Statistisches Bundesamt, 2023)

Geriatrische Patient:innen sind durch ein höheres Lebensalter, meist 65 Jahre und älter, sowie das Vorliegen von einer oder mehreren alterstypischen Erkrankungen gekennzeichnet (Neubart, 2018). Mehr als die Hälfte der über 65-Jährigen in

Deutschland leiden an mindestens einer chronischen Erkrankung (Nowossadeck, 2012) und produzieren über die Hälfte der entstandenen Gesundheitskosten (Statistisches Bundesamt, 2022). Bei den über 85-Jährigen ist der Anteil der entstandenen Gesundheitskosten im Vergleich zur durchschnittlichen Bevölkerung fast fünfmal so hoch (Statistisches Bundesamt, 2022).

In der Geriatrie spielt Multimorbidität eine bedeutende Rolle (Neubart, 2018). Als multimorbide werden Patient:innen bezeichnet, die unter mindestens zwei chronischen Erkrankungen leiden (Hüllemann & Baron, 2019; Neubart, 2018). Aus der Gruppe der chronischen Erkrankungen nehmen die neurodegenerativen Erkrankungen einen erheblichen Anteil ein (Gao et al., 2024).

Gerade in der Neurogeriatrie spielt die Primärprävention von dysfunktionalem Altern eine entscheidende Rolle (Synofzik & Maetzler, 2015). Der Fokus liegt hierbei nicht nur auf den älteren, multimorbiden Patient:innen, sondern auch auf den „noch gesunden“ älteren Personen, die erste, nicht alltagsbeeinträchtigende Symptome chronischer Erkrankungen zeigen, wie sie beispielsweise im Prodromalstadium des IPS auftreten (Bang & Heinzel, 2023; Synofzik & Maetzler, 2015). Frühzeitige Erkennung und Prävention spielen dabei eine entscheidende Rolle, um ein möglichst funktionales Altern zu ermöglichen (Synofzik & Maetzler, 2015). Hierfür könnten Erkenntnisse aus der Mikrobiomforschung in Zukunft einen Beitrag leisten (Bang & Heinzel, 2023).

### **1.3 Idiopathisches Parkinson-Syndrom (IPS)**

Die Parkinson-Krankheit (PK) gehört zur Gruppe der neurodegenerativen Erkrankungen. Die nachfolgende Beschreibung beruht auf der im Oktober 2023 veröffentlichten Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), 2023). Die PK wird in unterschiedliche Parkinson-Syndrome unterteilt, am häufigsten sind Patient:innen vom IPS betroffen. Es tritt im Gegensatz zum hereditären Parkinson-Syndrom sporadisch auf und definiert sich als primäres Parkinson-Syndrom ohne erkennbare Ursache (Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), 2023).

Die Symptome des IPS setzen sich aus motorischen und nicht-motorischen Symptomen zusammen. Diese beginnen oft schleichend und schreiten zeitlebens fort.

Die motorische Symptomatik ist geprägt durch Bradykinese (Bewegungsverlangsamung), oft begleitet von Tremor (unwillkürliche rhythmische Bewegung eines oder mehrerer Körperteile), Rigor (Widerstand, bei passiver Bewegung der großen Gelenke) und posturaler Instabilität (Haltungsinstabilität mit Sturzneigung, ohne primäre visuelle, vestibuläre, zerebelläre oder propriozeptive Dysfunktion) (Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), 2023). Diese Symptome können zusammen mit sensorischen, vegetativen, psychischen und kognitiven Störungen auftreten, welche insbesondere im vorausgehenden Prodromalstadium eine zentrale Rolle spielen (Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), 2023). Hierzu zählen Obstipation, Hyposmie (Riechstörung), und *Rapid-eye-movement* (REM)-Schlaf-Verhaltensstörung (Berg et al., 2015; Schäffer & Berg, 2021). Zu den weiteren nicht-motorischen Symptomen zählen Sensibilitätsstörungen (Parästhesien/Dysästhesien), orthostatische sowie sexuelle Dysfunktionen, kognitive Einschränkungen (z.B. Exekutivfunktionsstörungen, Konzentrationsstörungen, aber auch Halluzinationen) bis hin zur Demenz, und psychischen Symptomen wie z.B. Depression und Angststörung (Schapira et al., 2017).

IPS ist mit einer Prävalenz von schätzungsweise 420.000 Patient:innen in Deutschland und einer weltweiten Prävalenz von 6.3 Millionen Patient:innen (Stand 2015) die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach der Alzheimer-Demenz (Heinzel et al., 2018). Pro Jahr wird die Zahl der Neuerkrankungen auf 85 bis 95 pro 100.000 Einwohner:innen geschätzt. Der Erkrankungsgipfel liegt um das 60. Lebensjahr (Heinzel et al., 2018). Die Inzidenz von IPS unterscheidet sich anhand von Alter, Geschlecht, Ethnizität und Herkunft (Heinzel et al., 2018; von Campenhausen et al., 2005) und steigt ab dem sechsten Lebensjahrzehnt stark an (Heinzel et al., 2018). In dem Bevölkerungsanteil der über 65-Jährigen liegt die Prävalenz der PK zwischen ein und zwei Prozent (Elbaz et al., 2002; Heinzel et al., 2018). Studien haben gezeigt, dass die Prävalenz von neurodegenerativen Erkrankungen wie dem IPS in Nordamerika und Nord-West-Europa in den letzten Jahrzehnten deutlich zugenommen hat und dies nicht nur auf den demographischen Wandel zurückzuführen ist (Rocca, 2018). Das lässt sich neben veränderten Lebensstilfaktoren wie der Abnahme der körperlichen Aktivität und Änderung der Ernährungsgewohnheiten auch durch veränderte Umweltfaktoren, wie z.B. der Exposition gegenüber toxischen Substanzen wie Pestiziden und Schwermetallen erklären (Ascherio & Schwarzschild, 2016). Auch in

Zukunft ist weiterhin mit einer steigenden Prävalenz von IPS-Patient:innen zu rechnen (Ascherio & Schwarzschild, 2016; Rocca, 2018).

Analysen von Versicherungsdaten zeigten, dass in Deutschland etwa 20 % aller Patient:innen mit PK in Einrichtungen der Langzeitpflege betreut werden und bei mehr als der Hälfte dieser eine Demenz-Diagnose vorliegt, was oft mit intensiverer Betreuungsnotwendigkeit einhergeht (Heinzel et al., 2018; Mai & Ketter, 2022). Neben der Pflegebedürftigkeit stellen stationäre Klinikaufenthalte und mit der PK einhergehende Therapiekosten eine immer größer werdende Belastung für das Gesundheitssystem dar (Heinzel et al., 2018).

Das IPS ist eine klinische Diagnose und wird anhand der *Movement Disorder Society* (MDS)-Kriterien gestellt (Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), 2023; Postuma & Berg et al., 2015). Die MDS-Kriterien sind sowohl für die klinische Forschung als auch als Leitfaden für die klinische Diagnostik konzipiert und werden in den folgenden Abschnitten anhand der Veröffentlichung von Postuma & Berg et al. (2015) dargestellt: Zunächst ist das Vorliegen von Parkinsonismus erforderlich, welcher durch Bradykinese (muss zwingend vorhanden sein) in Kombination mit Ruhetremor oder Rigor (eines davon muss ebenfalls vorhanden sein) definiert wird. Nach Bestätigung des Parkinsonismus muss für ein bereits im Vorfeld klinisch gesichertes IPS das Fehlen absoluter Ausschlusskriterien, das Vorhandensein von mindestens zwei unterstützenden Kriterien und ein Ausschluss von sogenannten *red-flag* Kriterien, welche im weiteren Verlauf erklärt werden, vorliegen. Bei einem klinisch wahrscheinlichen IPS dürfen keine absoluten Ausschlusskriterien vorhanden sein, und auftauchende *red-flag* Kriterien müssen durch unterstützende Kriterien ausgeglichen werden.

Unterstützende Kriterien sind z.B. ein Ansprechen auf dopaminerge Therapie, das Vorhandensein von Levodopa-induzierten Dyskinesien, das Vorhandensein eines einseitigen Ruhetremors, der Verlust des Geruchssinns oder das Vorhandensein von kardialer sympathischer Denervation.

Absolute Ausschlusskriterien des IPS beinhalten unter anderem das Auftreten von eindeutigen zerebellären Abnormalitäten, eine supranukleäre Blickparese, eine frontotemporale Demenz oder progressive Aphasie innerhalb der ersten fünf Jahre, eine starke Betonung der Parkinsonsymptomatik im Bereich der unteren Extremitäten, fehlendes Ansprechen auf hohe Levodopa-Dosen, sowie normale funktionelle Neuroimaging-Ergebnisse des präsynaptischen dopaminergen Systems.

Zu den *red-flag* Kriterien, die gegen eine IPS-Diagnose sprechen, zählen: ein schneller Fortschritt der Gangstörung, fehlende Progression der motorischen Symptome über fünf Jahre, frühes Auftreten ausgeprägter Sprach- und Schluckstörungen, inspiratorische Atemstörung, schwere autonome Dysfunktion in den ersten fünf Jahren mit orthostatischer Hypotension und Harnverhalt/Inkontinenz, häufige Stürze aufgrund von Gleichgewichtsstörungen innerhalb der ersten drei Jahre, das Auftreten von Kontrakturen in den ersten zehn Jahren, das Fehlen typischer nicht-motorischer Symptome bei mindestens fünfjähriger Erkrankungsdauer und das unerklärte Auftreten von Pyramidenbahnzeichen und bilateral symmetrische Parkinson-Symptome.

Neben den MDS-Kriterien gibt es supportive Diagnose-Kriterien, wie den Levodopa-Test und die Testung auf Levodopa-induzierte Dyskinesien. Außerdem können apparative, nuklearmedizinische Verfahren wie die Dopamin-Transporter-Szintigraphie (DaTSCAN) und die Metaiodbenzylguanidin-Szintigraphie (MIBG-Szintigraphie) zur Diagnosestellung oder dem Ausschluss der Erkrankung entsprechend den Oktober 2023 veröffentlichten S2k-Leitlinien hinzugezogen werden (Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), 2023).

In der Pathophysiologie des IPS spielt die Degeneration dopaminerger Neurone in der *Substantia nigra* sowie im *Locus caeruleus* eine zentrale Rolle (Mor et al., 2019). Diese sind Bestandteil der Basalganglien im Mesencephalon und sind in diverse Schaltkreise des Basalganglien-assoziierten Systems eingebunden (Mor et al., 2019). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Bewegungsinitiation und Planung (Mor et al., 2019). Eine Degeneration dieser dopaminergen Neurone führt zu einer Disinhibition des *Striatums* und somit zu einer fortschreitenden Hemmung der Motorik (Mor et al., 2019). Histologisch zeigen sich in post-mortem Analysen von Patienten mit IPS im Hirngewebe betroffener Regionen sogenannte Lewy-Körperchen (Mor et al., 2019). Lewy-Körperchen sind intrazelluläre Protein- und Peptidablagerungen die unter anderem aus dem fehlgefalteten alpha-Synuklein ( $\alpha$ -Syn)-Protein bestehen. Die Körperchen wurden erstmals 1912 durch Friedrich Lewy beschrieben. Die Entstehung von Lewy-Körperchen in IPS-assoziierten Arealen im ZNS könnte mit der Beeinträchtigung der Dopamin-Produktion und einer daraus resultierenden IPS-Symptomatik in Zusammenhang stehen (Mollenhauer et al., 2011; Mor et al., 2019). Die Hypothese um die durch Lewy-Körperchen verursachte Neurodegeneration dopaminerger Neurone beruht auf der Annahme von Proteininternalisierung,

mitochondrialer Dysfunktion, oxidativem Stress, Unterdrückung des Ubiquitin-Proteasom-Systems und daraus resultierender axonaler und synaptischer Dysfunktion (Adam et al., 2023).

Beim IPS kommt es neben den Basalganglien-assoziierten Systemen auch in anderen Systemen zu Störungen (Mor et al., 2019). Hierzu zählen das autonome Nervensystem, der Hirnstamm, die Großhirnrinde und nicht-neuronale Gewebe wie Riechkolben, Haut, Speicheldrüsen und Darmschleimhaut (Nishiwaki et al., 2020). Diese stehen vor allem in Zusammenhang mit nicht-motorischen Begleitsymptomen. So wird ein häufig beim IPS beobachteter Noradrenalin- und Serotonin-Mangel mit depressiven Symptomen, und ein Acetylcholin-Mangel mit kognitiven Defiziten in Verbindung gebracht (Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), 2023).

Zur Verbesserung der Symptomatik von IPS-Patient:innen gibt es eine Vielzahl an Therapieansätzen. Die Therapieansätze sind stark abhängig vom jeweiligen Erkrankungsstadium der Patient:innen. Das am häufigsten verwendete Medikament zur Verbesserung der IPS-Symptomatik ist Levodopa (Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), 2023). Levodopa ist eine Vorläufersubstanz des Dopamins und sorgt für einen Ausgleich des pathophysiologischen Dopamin-Mangels im Basalganglien-assoziierten System. Darüber hinaus finden weitere Medikamente Verwendung, die den pathophysiologischen Dopamin-Mangel günstig beeinflussen. Hierzu zählen: Dopaminagonisten, Catechol-O-Methyltransferase-Inhibitoren (COMT-Hemmer) und Monoaminoxidase-B-Hemmer (MAO-B-Hemmer). Auch kommen medikamentöse Therapieoptionen zum Einsatz, welche am nicht-Basalganglien-assoziierten System eingreifen. Hier spielen vor allem N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptorantagonisten (NMDA-Rezeptorantagonisten) eine Rolle. Standardmäßig wird die Behandlung zunächst mit einer Monotherapie begonnen und kann bei unzureichender Wirkung auf eine Kombinationstherapie erweitert werden.

Nicht-medikamentöse Therapiemaßnahmen stellen Physiotherapie, Logopädie, Ergotherapie und kognitives Training dar (Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), 2023). Intensivierte Therapieformen, die vor allem bei schwer einstellbaren Verläufen angewendet werden, beinhalten die tiefe Hirnstimulation und diverse Pumpentherapien. Eine kausale Therapie gibt es aktuell nicht (Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), 2023). Die aktuellen Therapieansätze haben vermutlich keinen oder wenig Einfluss auf die fortschreitende Neurodegeneration und somit den

fortschreitenden klinischen Verlauf von IPS (Adam et al., 2023; Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), 2023).

Die auslösenden Faktoren, die zum IPS und der damit einhergehenden Neurodegeneration führen sind noch immer Gegenstand aktueller Forschung (Adam et al., 2023). Als mögliche auslösende Faktoren kommen sowohl genetische als auch Umweltfaktoren in Betracht. Neben oxidativem Stress und neuronalen Entzündungsprozessen (Searles Nielsen et al., 2013) hat in den letzten Jahren die Rolle des Mikrobioms als potentielle Einflussgröße für die Entstehung und das Fortschreiten des IPS an Bedeutung gewonnen (Bang & Heinzl, 2023; Li et al., 2023; Ullah et al., 2023; Unger et al., 2020). Die bidirektionale Kommunikation zwischen Darmmikrobiom und Gehirn über die „*gut microbiota-brain-axis*“ (GBA) gilt als Grundstein dieser Theorie (Morais et al., 2021).

## 1.4 Mikrobiom

Das Mikrobiom des menschlichen Körpers umfasst Billionen von Mikroorganismen, welche die Epithelien des menschlichen Körpers besiedeln. Dazu zählen neben Bakterien und Archaeen auch Viren, Pilze und Protozoen (Bang & Heinzl, 2023; Qian et al., 2020). Allein das menschliche Darmmetagenom umfasst 3.3 Millionen nicht redundanter Gene (Ursell et al., 2012). Das Darmmetagenom umfasst circa 150-mal mehr Gene als das gesamte menschliche Genom mit etwa 22000 Genen (Ullah et al., 2023).

Auch wenn die menschlichen Mikrobiota aus vielen verschiedenen Mikroorganismen bestehen, basiert der aktuelle Forschungsstand zu Mikrobiota vor allem auf Studien über Bakterien. Bakterien werden wie andere Lebewesen in taxonomische Gruppen (Singular: Taxon; Plural: Taxa) eingeteilt (Qian et al., 2020). Dies geschieht nach dem „*International Code of Nomenclature of Prokaryotes*“: Domäne – Stamm – Klasse – Ordnung – Familie – Gattung – Spezies (Lapage et al., 1992).

Ein Beispiel zur Veranschaulichung der taxonomischen Einteilung kann Tabelle 1 entnommen werden.

## Tabelle 1:

### *Taxonomische Einteilung*

| Rang                         | Taxonomischer Name  |
|------------------------------|---------------------|
| <i>Kingdom</i> (Domäne)      | Bakterien           |
| <i>Phylum</i> (Stamm)        | Proteobacteria      |
| <i>Class</i> (Klasse)        | Gammaproteobacteria |
| <i>Order</i> (Ordnung)       | Enterobakteriales   |
| <i>Family</i> (Familie)      | Enterobacteriaceae  |
| <i>Genus</i> (Gattung)       | Escherichia         |
| <i>Species</i> (Art/Spezies) | Escherichia coli    |

*Anmerkung.* Taxonomische Einteilung nach dem „*International Code of Nomenclature of Prokaryotes*“ anhand von *Escherichia coli* (adaptiert nach Unger et al. (2020)). In Klammern die deutschen Bezeichnungen.

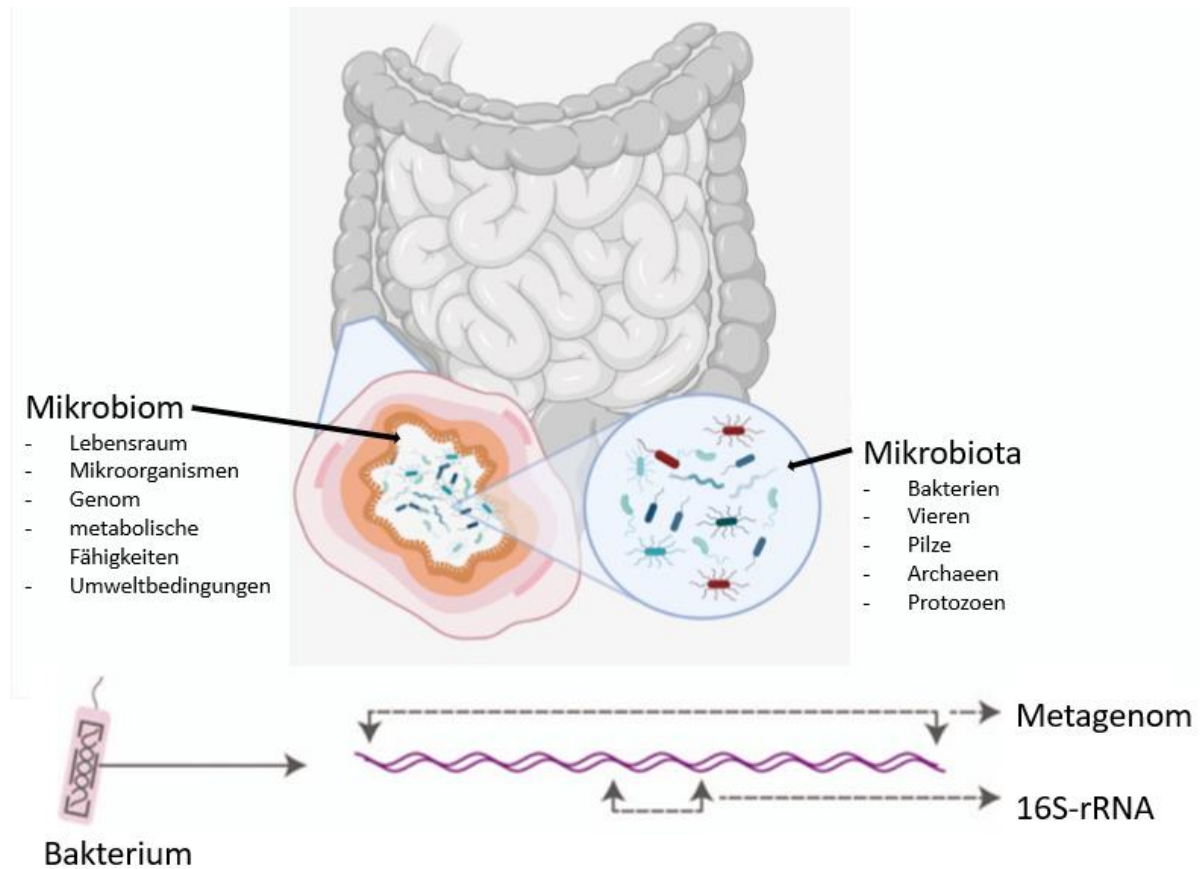
Die beiden häufigsten Vertreter der Bakterienstämme der menschlichen Darmmikrobiota sind *Firmicutes* (inklusive der Gattungen *Lactobacillus*, *Eubacterium* und *Clostridium*) und *Bacteroidetes* (inklusive *Bacteroides* und *Prevotella*) (Morais et al., 2021; Ullah et al., 2023).

Der Begriff „Mikrobiom“ erlangte 2001 durch den Nobelpreisträger Joshua Lederberg Bekanntheit (Ursell et al., 2012). Das Mikrobiom umfasst den gesamten betrachteten Lebensraum, einschließlich der Mikroorganismen, ihres Genoms, ihrer metabolischen Fähigkeiten und der dort herrschenden Umweltbedingungen (Qian et al., 2020). Seither versucht die Wissenschaft das menschliche Mikrobiom immer ausführlicher zu analysieren und zu definieren (Ursell et al., 2012). Diese Aufgabe wird neben technischen Herausforderungen dadurch erschwert, dass Begriffe in der Mikrobiom-Forschung nicht einheitlich verwendet werden. Zum Beispiel wird der Begriff des Mikrobioms häufig gleichzeitig für die Beschreibung der Mikrobiota verwendet (Ursell et al., 2012). Für ein adäquates Verständnis dieser Arbeit ist eine Einführung in die „Mikrobiom-Terminologie“ essentiell. Diese kann in Abbildung 1 nachvollzogen werden.

Der Begriff "Mikrobiota" bezieht sich im Gegensatz zum „Mikrobiom“ nur auf die Mikroorganismen, die einen spezifischen Ort im Körper besiedeln. Das Metagenom bezeichnet wiederum ausschließlich das Genom der Mikrobiota (Qian et al., 2020). Die Abundanz beschreibt die Anzahl der Individuen einer Art in einer Lokalisation. Der Begriff „Taxa“ (Singular: Taxon) bezeichnet taxonomische Gruppen, die nach dem *international code of taxonomy* gebildet wurden (Lapage et al., 1992).

## Abbildung 1:

### Begrifflichkeiten in der Mikrobiomforschung



*Anmerkung.* Begrifflichkeiten in der Mikrobiomforschung (adaptiert nach DKFZ (2024), Qian et al. (2020)). Das Mikrobiom beschreibt die Mikroorganismen, deren Lebensraum und die Umweltbedingungen. Die Mikrobiota umschreibt allein die Mikroorganismen. Das Metagenom beschreibt das Genom der Mikroorganismen. Die 16S-rRNA-Sequenzierung (16S-rRNA) ist ein Verfahren zur Analyse des Metagenoms. *Abkürzung.* 16S-rRNA = 16S-ribosomale Ribonukleinsäure

Die Mikrobiota besiedeln den menschlichen Körper sowohl von außen als auch von innen. Entlang des Verdauungstrakts ist die Konzentration an Mikrobiota besonders hoch. Das Mikrobiom des Darms beherbergt die größte Anzahl an Mikrobiota im menschlichen Körper (Eckburg et al., 2005; Rackaityte & Lynch, 2020). Den zweiten Platz belegt das Mikrobiom der Mundhöhle (Verma et al., 2018). In der medizinischen Forschung wird daher vor allem dem oralen und dem enteralen Mikrobiom eine besondere Bedeutung beigemessen (Bang & Heinzl, 2023).

In den letzten Jahren haben moderne und kosteneffektive Techniken zur Analyse von Proben auf deren mikrobielle Zusammensetzung, wie beispielsweise die 16S-ribosomale Ribonukleinsäure-Sequenzierungsanalyse (16S-rRNA), stark zum

Verständnis des Mikrobioms beigetragen (Ursell et al., 2012). Forscher sind nun in der Lage kosten- und zeiteffektiv Millionen von Sequenzen in einer Probe zu analysieren, um Unterschiede in der Zusammensetzung der Mikrobiota zwischen verschiedenen Individuen oder unterschiedliche Probeentnahmeorten eines Individuums festzustellen. Das 16S-rRNA Sequenzierungsverfahren wurde in den 1970er Jahren etabliert (Fox et al., 1977). Es ermöglicht anhand der Analyse spezifischer Regionen der 16S-rRNA in der Probe vorkommende Mikrobiota entsprechend ihrer taxonomischen Einteilung zu klassifizieren (Fox et al., 1977; Qian et al., 2020). Das 16S-rRNA Sequenzierungsverfahren kann in einer Probe ausschließlich Bakterien und Archaeen analysieren, weitere Mikrobiota wie Viren werden nicht erfasst (Qian et al., 2020). Dies hat zur Folge, dass in der medizinischen Forschung hauptsächlich durch das 16S-rRNA-Verfahren abbildungsfähige Mikrobiota (vor allem Bakterien) untersucht werden und nicht die gesamte Mikrobiota (Poretsky et al., 2014; Ursell et al., 2012). Eine detailliertere Beschreibung zum Ablauf der 16S-rRNA-Sequenzierungsanalysen erfolgt in Kapitel 2.2.1.

Das Darmmikrobiom ist keineswegs ein passiver Bestandteil des menschlichen Körpers. Es hat Einfluss auf Funktionen des Körpers wie z.B. des Immunsystems und des Stoffwechsels und trägt zur Entwicklung verschiedener Organe wie dem gastrointestinalen Nervensystem bei. Das Darmmikrobiom fungiert als Schnittstelle zwischen dem Wirt (Menschen) und dessen Umwelt und hat einen direkten Einfluss auf dessen Gesundheit (Morais et al., 2021).

Sowohl die Zusammensetzung als auch die Aktivität der Mikrobiota ist dynamisch und im Laufe des Lebens ständigen Veränderungen ausgesetzt (Cresci & Bawden, 2015). Der erste Kontakt eines Menschen mit Mikroorganismen findet bereits vor der Geburt in der Gebärmutter statt (Cresci & Bawden, 2015). Es folgen der Geburtsvorgang, die Ernährung des Säuglings mit Muttermilch und die sich daran anschließende Umstellung auf feste Nahrung (Cresci & Bawden, 2015). Das Säuglings- und Kleinkindalter spielt eine essentielle Rolle bei der Ansiedlung des Mikrobioms des Menschen (Cresci & Bawden, 2015). Diese ersten Lebensjahre scheinen entscheidend für die Zusammensetzung des Mikrobioms zu sein (Cresci & Bawden, 2015). Danach stellt sich eine gewisse Stabilität ein, die sich über das Leben nur geringfügig ändert (Cresci & Bawden, 2015; Turnbaugh et al., 2007). Diese Stabilität, bestehend aus einer großen Vielfalt an Mikroorganismen, wird auch als „Kern-Mikrobiom“ bezeichnet. Mit zunehmendem Alter beginnt sich diese Stabilität zu

verändern und das Mikrobiom verliert an Vielfalt (S. Kim & Jazwinski, 2018). Insbesondere scheint es zu Veränderungen im Bereich des Phylums der *Firmicutes* zu kommen. Dabei scheint ein höheres Alter mit einer Zunahme von fakultativ anaerober Mikrobiota, insbesondere opportunistischen pro-inflammatorischen Arten, assoziiert zu sein (Bäuerl et al., 2018). Dagegen scheint die Anzahl von *Bifidobacteriaceae* in Stuhlproben von gesunden, älteren im Vergleich zu gesunden, jüngeren Proband:innen verringert (Haikal et al., 2019).

Diese Ungleichgewichte in der Darmflora scheinen eng mit dem Alterungsprozess verbunden zu sein. Immunoseneszenz – die Abnahme der Funktion des Immunsystems im höheren Alter – und permanente geringgradige chronische Entzündungen können eine Vielzahl von Gesundheitsproblemen im Alter, wie einer erhöhten Infektanfälligkeit und Erkrankungen wie Alzheimer-Demenz, IPS und Arteriosklerose verstärken (Bäuerl et al., 2018). Diese altersbedingten Veränderungen können ein entzündliches Milieu im Darm fördern, welches möglicherweise wiederum zum Progress chronischer Erkrankungen beitragen könnte. Das Mikrobiom älterer Menschen zeigt dabei eine besonders große interindividuelle Variabilität und gleichzeitig Vulnerabilität gegenüber externen, das Mikrobiom beeinflussende Faktoren (Bäuerl et al., 2018).

Veränderungen im Mikrobiom können von vielen verschiedenen Faktoren abhängig sein. So spielen neben dem Alter auch Geschlecht, Gewicht, Herkunft sowie sich verändernde Umweltfaktoren, wie Ernährung und Medikamenteneinnahme, eine entscheidende Rolle (Morais et al., 2021). Untersucht wurde dies unter anderem in großangelegten Studien wie *“The Human Microbiome Project”* im Jahre 2012 (Huttenhower, 2012). Im Rahmen dieses Projektes konnten viele neue Erkenntnisse über das Mikrobiom gesammelt werden. Es wurde z.B. festgestellt, dass auch opportunistische Krankheitserreger Teil eines „gesunden“ Mikrobioms waren (Huttenhower, 2012). Der menschliche Körper ist stark von den Funktionen der Bakterien abhängig. So übernehmen diese zahlreiche Schutzfunktionen wie z.B. durch Verdrängung von Pathogenen, Stärkung der Darmbarriere und Entwicklung des Immunsystems (Huttenhower, 2012). Auch übernehmen die Mikrobiota wichtige Stoffwechselfunktionen wie zum Beispiel die Synthese essentieller Vitamine und die Fermentation unverdaulicher Nahrungsreste (Bang & Heinzl, 2023). Durch den Metabolismus von Bakterien können neben Vitaminen auch kurzkettige Fettsäuren (engl. *short-chain-fatty-acids* - SCFAs) entstehen, die zur „Ernährung“ und

Regeneration der Darmepithelien beitragen. Außerdem sind Bakterien in der Lage durch ihren Metabolismus krebserregende Stoffe zu entgiften (Huttenhower, 2012). Im Rahmen des *Human Microbiome Projects* konnte kein einzelner gemeinsamer Mikroorganismus auf allen Körperoberflächen oder bei allen Individuen identifiziert werden (Huttenhower, 2012). Dies spricht für die hohe Intervariabilität des Mikrobioms zwischen den jeweiligen Individuen und den verschiedenen Lokalisationen. Am ähnlichsten war sich das Mikrobiom verschiedener Proband:innen zwischen gleichen Körperregionen (Huttenhower, 2012). So war das Darmmikrobiom von zwei unterschiedlichen Menschen ähnlicher als das Mikrobiom einer einzelnen Person aus verschiedenen Lokalisationen (z.B. Darm und Mundhöhle) (Huttenhower, 2012). Nicht nur die mikrobielle Diversität, sondern auch die metabolischen Fähigkeiten der Mikroorganismen spielen eine Rolle und können zu einem „gesunden“ oder mit einer Krankheit assoziierten Mikrobiom beitragen (Huttenhower, 2012).

Die zuvor angesprochene Abnahme der Vielfalt und Stabilität des Mikrobioms, sowie die gleichzeitige Zunahme der Anzahl an pathogenen Mikrobiota, wird als Dysbiose bezeichnet (Qian et al., 2020; Sheikh Sajjadih et al., 2012). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Gesundheitsergebnisse der untersuchten Personen umso besser waren, je vielfältiger ihr Mikrobiom war (Cryan et al., 2020). Dysbiose scheint nach aktuellem Forschungsstand mit der Entwicklung von Erkrankungen, wobei es sich bei diesen vor allem um chronische Erkrankungen handelt, sowie einer reduzierten Lebenserwartung assoziiert zu sein (S. Kim & Jazwinski, 2018). Zu den mit einem Ungleichgewicht der Darmmikrobiota assoziierten chronischen Erkrankungen zählen unter anderem entzündliche Darmerkrankungen, Asthma bronchiale, Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus und neurodegenerative Erkrankungen (Bang & Heinzl, 2023). Der Einfluss des Mikrobioms auf die Pathophysiologie von neurodegenerativen Erkrankungen ist Gegenstand aktueller Forschung (Z. Li et al., 2022).

## 1.4.1 Darm-Hirn-Achse

Im Folgenden wird der aktuelle Forschungsstand zu Interaktionen zwischen Mikrobiom und ZNS beleuchtet.

Die GBA bezieht sich auf ein Netzwerk von Verbindungen, das mehrere biologische Systeme umfasst und eine bidirektionale Kommunikation zwischen Darmmikrobiom und ZNS ermöglicht. Sie ist entscheidend für die Aufrechterhaltung der Homöostase der im Austausch miteinander stehenden Systeme: Gastrointestinaltrakt – Mikrobiom – ZNS (Morais et al., 2021). Der Kommunikationsweg der GBA ist hoch komplex und umfasst verschiedene Signalwege (siehe Abbildung 2). Zu den wichtigsten Säulen zählen das ZNS und periphere Nervensystem (PNS) selbst (1), neuroaktive Substanzen (2), das Immunsystem (3) und der Hormonhaushalt (4).

(1) Das ZNS ist mit dem Darm über den *Nervus vagus* verbunden. Dieser innerviert beinahe das gesamte Verdauungssystem und beinhaltet sowohl afferente als auch efferente Nervenfasern (Ullah et al., 2023). Über vagale Rezeptoren, welche Nahrungsbestandteile, Hormone, bakterielle Metabolite und Entzündungsmediatoren erkennen, steht das ZNS in direktem Kontakt mit dem Darm und dem darin enthaltenen Darmmikrobiom (de Lartigue et al., 2011). Als Beispiel für diesen bidirektionalen Einfluss konnte eine Studie zeigen, dass bei sterilen Mäusen die Innervation des kolorektalen Epithels reduziert war und nach mikrobieller Besiedelung gesteigert werden konnte (De Vadder et al., 2018). Dies beruht auf der Erkenntnis, dass enteroendokrine Zellen eine direkte Synapse zum afferenten *Nervus vagus* haben und über diesen in Verbindung mit dem ZNS stehen (Kaelberer et al., 2018).

(2) Mikroorganismen sind außerdem in der Lage neuroaktive Substanzen entweder selbst herzustellen oder die Produktion dieser zu stimulieren (Ullah et al., 2023). Dazu zählen zum Beispiel Dopamin (*Escherichia*), Serotonin (*Streptococcus*, *Candida*, *Escherichia*), Norepinephrin (*Escherichia*, *Bacillus*, *Saccharomyces*), Gamma-Aminobuttersäure (GABA) (*Lactobacillus* und *Bifidobacterium*) und Acetylcholin (*Lactobacillus*) (Y. Chen et al., 2021; Lyte, 2014; Ullah et al., 2023).

(3) Neben dem direkten Kontakt mit den Nervenzellen selbst, spielt die Interaktion zwischen Mikrobiom und Immunsystem eine entscheidende Rolle (Morais et al., 2021). Das Immunsystem, bestehend aus angeborenem und erworbenem Immunsystem,

bildet ein komplexes Netzwerk und spielt eine entscheidende Rolle bei der Abwehr potentiell pathogener äußerer Einflüsse. Evolutionär betrachtet, ist das Immunsystem aus dem ständigen Kontakt und der Interaktion zwischen Lebewesen und Mikroorganismen entstanden und befindet sich im gesunden Zustand in einer Homöostase. Diese enge Beziehung erfordert eine korrekte Funktion des Immunsystems, um Parasitismus und Infektionen zu verhindern, während gleichzeitig eine immunologische Toleranz gegenüber harmlosen Reizen aufrechterhalten erhalten werden soll. Die Funktion und Entwicklung des Immunsystems steht unter ständigem Einfluss des Darmmikrobioms (Zheng et al., 2020).

Zellen des Immunsystems sind in der Lage die Blut-Hirn-Schranke (*engl. blood-brain-barrier* - BBB) direkt zu durchdringen und das ZNS erreichen. Die BBB ist eine physische Barriere, die das ZNS vom Körperkreislauf trennt. Sie ermöglicht eine selektive Durchlässigkeit von Stoffen aus dem Körperkreislauf ins Nervengewebe des Gehirns. Zentraler Bestandteil dieser Barriere sind Mikrogliazellen und *tight-junction*-Proteine, die die Endothelzellen der Kapillaren miteinander verbinden (Morais et al., 2021). Die Permeabilität der BBB steht möglicherweise unter dem Einfluss des Darmmikrobioms. Darauf weisen Studien hin, in welchen sterile Mäuse eine erhöhte BBB-Permeabilität zeigten (Braniste et al., 2014). Die BBB ermöglicht neben der Abwehr von pathogenen Mikroben eine selektive Passage von Chemikalien, Ionen und anderen Zellen (Ullah et al., 2023).

Ein weiterer Zusammenhang zwischen Mikrobiota und Immunsystem konnte anhand der Mikrogliazellen im Gehirn festgestellt werden. Mikrogliazellen sind Teil des angeborenen zellulären Immunsystems und ebenfalls Bestandteil der BBB (Zheng et al., 2020). Sie übernehmen die Funktion der Phagozytose und Antigenpräsentation von Pathogenen. Die Entstehung, Reifung und Aktivierung von Mikrogliazellen wird durch Mikrobiota beeinflusst (Zheng et al., 2020). Es konnte gezeigt werden, dass bei sterilen Mäusen nach Zugabe von SCFAs eine Wiederherstellung der Form und Funktion von Mikrogliazellen beobachtet werden konnte (Erny et al., 2015). SCFAs sind wie zuvor erwähnt kurzkettige Fettsäuren, die als Stoffwechselprodukte durch Fermentation von Ballaststoffen durch bestimmte Bakterien des Darmmikrobioms entstehen (Dalile et al., 2019). Ihre Produktion wird durch die Dominanz spezifischer Bakteriengruppen beeinflusst (Fusco et al., 2023).

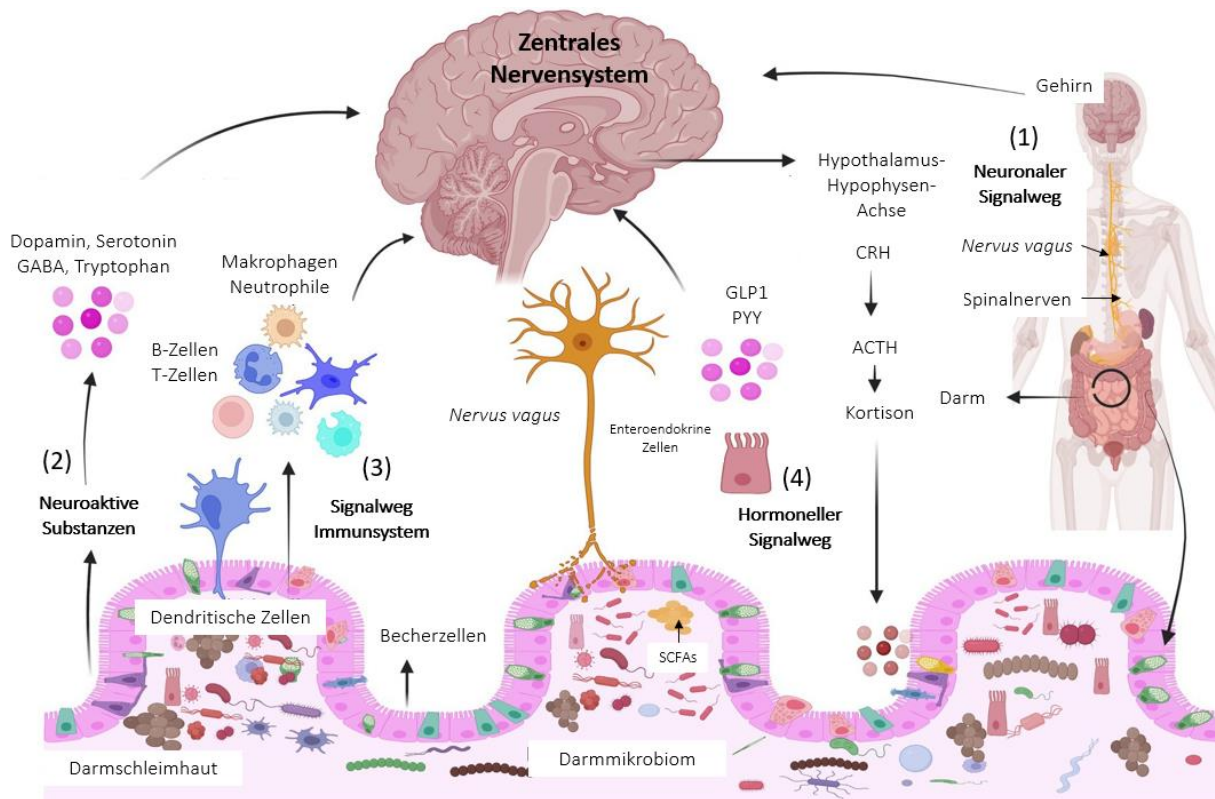
Diese SCFAs regulieren nicht nur die Reifung und Aktivierung von Mikrogliazellen im Gehirn, sondern haben auch einen Einfluss auf die Reifung und Aktivierung von

weiteren Zellen des Immunsystems wie T-Lymphozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten (Corrêa-Oliveira et al., 2016). Diese Interaktion von SCFAs und Immunzellen scheint durch Verringerung von Neuroinflammation eine stabilisierende Auswirkung auf das Gehirn zu haben (Dalile et al., 2019). Neuroinflammation beschreibt einen chronischen Entzündungsprozess des Gehirngewebes, welcher durch Zytokine und Zellen des Immunsystems, die die BBB passieren können, aufrechterhalten wird. Dabei kommt es zur Schädigung von Nervenzellen und damit einhergehend zu funktionellen Einschränkungen des ZNS (DiSabato et al., 2016).

(4) Neben den zuvor genannten Kommunikationswegen der GBA spielt auch der Hormonhaushalt eine wichtige Rolle. Auch hier sind die SCFAs ein essentieller Bestandteil. Diese können die Produktion von im Gastrointestinaltrakt produzierten Hormonen über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren beeinflussen. Zu diesen Hormonen zählen Ghrelin, Leptin, Insulin, Peptid YY und *Glukagon-Like-Peptide 1* (GLP1) (Ullah et al., 2023). GLP1 wirkt sowohl über neuronale als auch endokrine Signalwege und hat unter anderem Einfluss auf das periphere und zentrale Nervensystem (Ullah et al., 2023). In Tiermodellen wurde gezeigt, dass GLP1 einen Einfluss auf Gedächtnisfunktionen wie das Lernen hat und mit einer erhöhten Neuroplastizität und Neuroprotektion im Hippocampus einherzugehen scheint. Zudem konnte ein Einfluss von GLP1 auf die Akkumulation von beta-Amyloid-Plaques und Mikroglia-Aktivierung im Rahmen der Alzheimer-Demenz nachgewiesen werden (Porter et al., 2011; McClean et al., 2011).

## Abbildung 2:

### Gut-Brain-Axis – die Bidirektionale Kommunikation zwischen Mikrobiom und Gehirn



*Anmerkung.* Darstellung der Bidirektionalen Kommunikation zwischen Mikrobiom und Gehirn (adaptiert nach Ullah et al. (2023)).

Die Säulen der *Gut-Brain-Axis* (GBA) bilden: Der neuronale Weg (1) über den *Nervus vagus*; Neuroaktiven Substanzen (2) wie Dopamin, Serotonin, GABA, Tryptophan; Das Immunsystem (3) über Dendritische Zellen, B- und T-Zellen, Makrophagen, Neutrophile und Einflussnahme durch SCFAs; Der hormonelle Signalweg (4) über die Hypothalamus-Hypophysen-Achse mit den damit verbundenen Hormonen CRH, ACTH und Kortison, sowie GLP1 und PYY der Enteroendokrinen Zellen (Ullah et al., 2023).

*Abkürzungen.* ACTH = Adrenocorticotropes Hormon; CRH = *Corticotropin-Releasing-Hormon*; GABA = *Gammaaminobuttersäure*; GLP1 = *Glukagon-Like-Peptide1*; PYY = *PeptidYY*; SCFAs = *Short-Chain-Fatty-Acids*.

## 1.4.2 Mikrobiom und Dysbiose

Der menschliche Körper steht in einem engen symbiotischen Austausch mit dem Mikrobiom. Merkmale einer bakteriellen Gemeinschaft sind die Anzahl der vorhandenen Arten, deren taxonomische Einteilung und die Vielfalt der numerischen Zusammensetzung (Mack et al., 2016). Es wird angenommen, dass Veränderungen,

Ungleichgewichte und Abnahme der Vielfalt der Mikrobiota an der Entstehung von Krankheiten beteiligt sein könnten (Bang & Heinzl, 2023). Diese Veränderungen der Mikrobiota werden als Dysbiose bezeichnet (Sheikh Sajjadih et al., 2012). Ein einheitliches Vorgehen zur Erfassung von Dysbiose gibt es aktuell nicht (Bang & Heinzl, 2023; Z. Li et al., 2022; Ullah et al., 2023; Wallen et al., 2020).

Zur Beschreibung von mikrobieller Vielfalt einer ökologischen Gemeinschaft können Metriken zur Bestimmung der Alpha-Diversität und Beta-Diversität verwendet werden (Z. Li et al., 2022; Qian et al., 2020). Die Begriffe der Alpha- und Beta-Diversität wurden ursprünglich durch Robert Harding Whittaker geprägt (Whittaker R.H., 1975). Alpha-Diversitätsmetriken fassen die Struktur einer mikrobiellen Gemeinschaft in Bezug auf ihre Reichhaltigkeit (Anzahl der taxonomischen Gruppen), ihre Gleichmäßigkeit (Verteilung der Häufigkeiten der Gruppen) oder in ihrer Kombination zusammen (Kers & Saccetti, 2022; Willis, 2019). Während die Alpha-Diversität die Zusammensetzung der Mikrobiota innerhalb einer Probe beschreibt, beleuchtet die Beta-Diversität die Unterschiede zwischen zwei Proben oder Gruppen untereinander. Die Beta-Diversität wird verwendet, um Unterschiede in der Zusammensetzung der Mikrobiota zu beschreiben (Qian et al., 2020). Dies wird in Abbildung 3 dargestellt.

### Abbildung 3:

#### Alpha- und Beta-Diversität



*Anmerkung.* Veranschaulichung der Alpha- und Beta-Diversität (Adaptiert nach Qian et al. (2020))

Aufgrund der zuvor erwähnten Einschränkungen des 16S-rRNA-Sequenzierungsverfahrens im Hinblick auf Abbildungsfähigkeit der Mikrobiota einer Probe können Verzerrungen in den erhobenen Daten entstehen. Um diesen Verzerrungen entgegenzuwirken und die mikrobielle Vielfalt möglichst ganzheitlich

abzubilden, werden in der Mikrobiomforschung stets verschiedene Metriken verwendet. Beispiele hierfür sind Metriken zur Abbildung der Alpha-Diversität. Einige dieser Metriken gehen nur von den durch das jeweilige Verfahren entdeckten Mikrobiota aus, wogegen andere versuchen, die durch das Analyseverfahren nicht-erfassten Mikrobiota zu schätzen und gleichzeitig die Gleichmäßigkeit der unterschiedlichen Mikrobiota zu berücksichtigen (Poretsky et al., 2014; Willis, 2019). Die in dieser Arbeit verwendeten Metriken zur Erfassung der Alpha- und Beta-Diversität werden ergänzend in Kapitel 2.3.2.1 und 2.3.2.2 beleuchtet.

### 1.4.3 Mikrobiom und IPS

Wie bereits erwähnt geht man bei einer Vielzahl neurologischer Erkrankungen, insbesondere beim IPS, davon aus, dass sie in Verbindung mit einer Dysbiose des menschlichen Darmmikrobioms stehen. In zahlreichen Studien konnte das Ausmaß der Darmdysbiose bei IPS-Patient:innen entweder mit dem Progress und der Schwere der Erkrankung oder auch mit deren Entstehung in Verbindung gebracht werden (Bang & Heinzl, 2023; Keshavarzian et al., 2015; Scheperjans, 2015; Ullah et al., 2023). Der Einfluss des Mikrobioms auf die Entstehung des IPS kann anhand der zuvor beschriebenen Achsen der GBA nachvollzogen werden (Ullah et al., 2023). Bis heute besteht jedoch noch immer kein einheitliches, umfassendes und eindeutiges Verständnis dieser pathophysiologischen Mechanismen (Z. Li et al., 2022). Aktuell werden verschiedenste Theorien zu den Einflüssen des Mikrobioms auf die Entstehung und das Voranschreiten von IPS diskutiert (Nishiwaki et al., 2020).

In einer Arbeit von Nishiwaki et al. (2020) wurden wissenschaftliche Erkenntnisse, die auf einen Zusammenhang von IPS und Mikrobiom hindeuten, strukturiert zusammengefasst. Die im Folgenden beschriebenen Erkenntnisse aus klinischen Studien deuten darauf hin, dass  $\alpha$ -Syn-Fibrillen bei Patient:innen mit IPS aus dem Darm über das PNS über den *Nervus vagus* zum ZNS (*Substantia nigra* im Mittelhirn) aufsteigen und so zur Entstehung von IPS beitragen könnten (Chiang & Lin, 2019; Nishiwaki et al., 2020; Unger et al., 2020).

Autopsien von verstorbenen Patient:innen mit IPS zeigten, dass Ablagerungen von *Lewy*-Körperchen sowohl im PNS als auch im Kern des *Nervus vagus* nachgewiesen werden konnten. Darüber hinaus konnten Ablagerungen von *Lewy*-Körperchen

ebenfalls entlang neuroanatomischer Pfade im ZNS bis hin zur *Substantia nigra* im Mittelhirn nachgewiesen werden (Braak et al., 2002, 2003, 2004, 2006). Die Theorie der Arbeitsgruppe um Braak et al. geht von einer neuronalen Ausbreitung der Lewy-Körperchen vom PNS zum ZNS aus. Diese Hypothese wird durch Beobachtungen anderer Studien gestützt, die eine verlangsamte Progression des IPS nach einer durchgeführten Vagotomie zeigen konnten (Bencsik et al., 2014). In Dickdarmbiopsien von IPS-Patient:innen konnte histologisch eine vermehrte Anhäufung von  $\alpha$ -Syn-Fibrillen im submukösen Nervengeflecht nachgewiesen werden (Cersosimo, 2015). Es konnte außerdem festgestellt werden, dass eine mehrere Jahre zuvor durchgeführte totale Vagotomie zur Behandlung von Zwölffingerdarmgeschwüren die Inzidenz von Parkinson um bis zu 50 % senken konnte (Liu et al., 2017; Svensson et al., 2015). Dies konnte jedoch nicht in allen Studien belegt werden (Tysnes et al., 2015). Auch konnte nachgewiesen werden, dass chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn mit einer deutlich erhöhten Inzidenz von IPS einhergehen (Lin et al., 2016). Patient:innen, welche unter einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung litten, schienen im Vergleich zur Normalbevölkerung ein 22-25% höheres relatives Risiko zu haben, an IPS zu erkranken (Villumsen et al., 2019; Weimers et al., 2019). Auch schien eine in der Vergangenheit durchgeführte Appendektomie mit einer im Verlauf um 19 % geringeren Inzidenz von IPS assoziiert zu sein (Killinger et al., 2018). Somit könnte das Entfernen des *Appendix vermiformis*, welches als lymphatisches Organ einen Einfluss auf das Immunsystem hat, einen protektiven Effekt gegen die Entwicklung von IPS haben (Killinger et al., 2018).

Die Theorie über die Aszension von  $\alpha$ -Syn-Fibrillen bei IPS-Patient:innen aus dem Darm ins ZNS konnte auch anhand von Tiermodellen nachgewiesen werden. Dort zeigten intraperitoneale und gastrische Injektionen von  $\alpha$ -Syn-Fibrillen eine anschließende Ansammlung von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten im ZNS (Braid et al., 2016; Holmqvist et al., 2014; Uemura et al., 2018).

Auch die SCFAs scheinen im Zusammenhang mit IPS eine Rolle zu spielen. Studien zeigten, dass die Darmmikrobiota von IPS-Patient:innen sowohl eine verminderte SCFAs-Konzentration im Stuhl, als auch eine Reduktion von SCFAs-produzierenden Bakterien aufwies (Unger et al., 2016). Dazu gehörten die Familie der *Lachnospiraceae* und *Faecalibacterium prausnitzii*, welche anti-inflammatorische Eigenschaften besitzen (Ullah et al., 2023). So scheinen auch SCFAs einen Einfluss auf die Akkumulation von  $\alpha$ -Syn im Gehirn zu haben. Im Tiermodell zeigten zuvor

sterile  $\alpha$ -Syn-überexprimierende Mäuse nach oraler Zugabe von SCFAs höhere  $\alpha$ -Syn-Konzentration im Gehirn und eine damit einhergehende Verschlechterung von fein- und grobmotorischen IPS-Symptomen (Sampson et al., 2016). Außerdem konnte eine verstärkte Aktivierung der Mikrogliazellen (erhöhte Konzentrationen von TNF $\alpha$  und IL-6) nach Zugabe von SCFAs in zuvor sterilen IPS-Mäusen beobachtet werden. Dabei korrelierte die Aktivierung der Mikrogliazellen und der damit einhergehenden Neuroinflammation ebenfalls mit dem Ausmaß der  $\alpha$ -Syn-Ablagerungen und der motorischen IPS-Symptomatik (Sampson et al., 2016).

Bei IPS-Patient:innen konnte eine erhöhte Darmpermeabilität – ein sogenannter „*leaky gut*“ – festgestellt werden (Forsythe et al., 2014; Hasegawa et al., 2015). IPS-Patient:innen weisen eine verringerte Expression des *tight-junction*-Proteins *Occludin* auf (Clairembault et al., 2015). Auch scheint die Präsenz von bakteriellen Oberflächenmolekülen wie Lipopolysacchariden (LPS) von gramnegativen Bakterien zu einer erhöhten Permeabilität der Darmwand zu führen. Dies konnte in einer Tiermodellstudie nachgewiesen werden, in der systemisch verabreichte LPS eine erhöhte Darmpermeabilität zur Folge hatten (Kelly et al., 2014). Dies könnte sowohl die Passage von LPS in den systemischen Kreislauf als auch von  $\alpha$ -Syn-Fibrillen aus dem Darm über den *Nervus vagus* ins ZNS vereinfachen (Hasegawa et al., 2015; Kelly et al., 2014). LPS scheinen auch *in vitro* die Bildung von  $\alpha$ -Syn-Fibrillen zu fördern und sind gleichzeitig in der Lage, die Funktion der BBB zu beeinträchtigen (C. Kim et al., 2016; Peng et al., 2021). Dadurch wäre das Gehirn einer vermehrten Anzahl an Pathogenen und anderen toxischen Substanzen ausgesetzt (Bang & Heinzel, 2023; Rosario et al., 2021). Somit könnten LPS ebenfalls durch das „*leaky gut*“-Phänomen zur Entstehung und Aufrechterhaltung der Neuroinflammation im ZNS eine wichtige Rolle in der Entstehung von IPS spielen (Bang & Heinzel, 2023; Hasegawa et al., 2015).

In weiteren Studien an Mäusen konnte festgestellt werden, dass die orale Verabreichung spezifischer mikrobieller Metabolite an sterile Mäuse IPS-typische motorische Symptome und Obstipation hervorruft (Sampson et al., 2016). Eine ähnliche Wirkung zeigten Fäkaltransplantationen von IPS-Erkrankten in sterile Mäuse (Scheperjans et al., 2015). Auch die orale Verabreichung des pathogenen Stammes *Proteus mirabilis* konnte eine Schädigung von dopaminergen Neuronen und damit einhergehenden motorischen Symptomen hervorrufen (J. G. Choi et al., 2018). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Darmbakterien an der Entstehung von IPS-

typischen Bewegungsstörungen bei Mäusen beteiligt sein könnten und legen nahe, dass entsprechende Veränderungen im menschlichen Mikrobiom einen Risikofaktor für die Entstehung von IPS darstellen könnten (Nishiwaki et al., 2020).

Es gibt auch Kritik bzw. Zweifel an diesem Modell. So konnte z.B. durch elektrische Stimulation des *Nervus vagus* eine antiinflammatorische und somit protektive Reaktion im Gehirn ausgelöst werden (Meneses et al., 2016). Dies ist ein Beispiel dafür, dass die Theorie um die Aszension von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten aus dem enterischen Nervensystem ins ZNS als potentielle Ursache für die IPS-Entstehung trotz vielversprechender Ergebnisse umstritten ist (Burke et al., 2008; Meneses et al., 2016; Tysnes et al., 2015).

Aufgrund stetig wachsender Evidenz geht man jedoch inzwischen von einem starken Zusammenhang zwischen mikrobieller Dysbiose im Darm und der Entstehung und Progression von IPS aus (Ullah et al., 2023). So konnten zahlreiche Studien einen Unterschied in der Abundanz, also der Anzahl von Individuen einer Taxa, von IPS-Patient:innen und Gesunden feststellen (Bang & Heinzl, 2023; Heinzl et al., 2021; Z. Li et al., 2022; Nuzum et al., 2020; Unger et al., 2020). Dies gilt sowohl für Stuhl- als auch für Speichelproben.

Es folgt ein kurzer Überblick zu den aktuellen Erkenntnissen über unterschiedlich abundante Taxa in Stuhl- und Speichelproben bei IPS-Patient:innen. Verschiedenste Studien der letzten Jahre kamen dabei zu unterschiedlichen Ergebnissen. Einige Ergebnisse konnten in Metaanalysen mehrfach reproduziert werden. Eine Dominanz der Phyla *Firmicutes* und *Bacteroidetes* scheint mit IPS assoziiert zu sein (Haikal et al., 2019). *Bifidobacteriaceae*, *Lactobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae* und *Verrucomicrobiaceae* (Gattung: *Akkermansia*) scheinen bei IPS häufiger abundant zu sein, wohingegen *Lachnospiraceae* und *Prevotellaceae* bei IPS weniger abundant zu sein scheinen (Barichella et al., 2019; Z.-J. Chen et al., 2021; Mihaila et al., 2019; Wallen et al., 2020; Zhou et al., 2023).

Während sich ein Großteil der Studien mit dem Mikrobiom des Darmes auseinandersetzt, konnten in einigen Studien auch Taxa in der Mundhöhle identifiziert werden, welche bei IPS unterschiedlich abundant vorkamen. So konnten z.B. Mihaila et al. (2019) ein vermehrtes Vorkommen von *Lactobacillaceae* in Speichelproben bei IPS-Patient:innen feststellen.

Außerdem konnte in mehreren Studien eine höhere Abundanz der Gattung *Lactobacillus* aus der Familie der *Lactobacteriaceae* bei IPS-Patient:innen detektiert

werden (Z. Li et al., 2023; Ullah et al., 2023). *Lactobacillus* ist typischerweise Bestandteile von Probiotika (Z. Li et al., 2023). Diese könnten zudem bei steigender therapeutischer Dosierung von Medikamenten zur Therapie motorischer Symptome von IPS, wie Levodopa oder COMT-Hemmer, vermehrt in der Darmmikrobiota detektiert werden (Z.-J. Chen et al., 2021; Z. Li et al., 2023). *Lactobacillus* produziert ein Enzym, welches in die Verstoffwechslung von Levodopa eingreift. Dies führt dazu, dass Levodopa bereits im Darm durch enzymatische Aktivität von *Lactobacillus* abgebaut wird und somit eine höhere Konzentrationen von oral verabreichtem Levodopa für eine ausreichende Wirkung am Zielort – dem Gehirn – von Nöten sind (Z.-J. Chen et al., 2021; Z. Li et al., 2023). Dadurch kann es im Verlauf zur Verabreichung immer höher werdender Dosen von Levodopa kommen, was wiederum die Vermehrung von *Lactobacillus* zu fördern scheint (Z.-J. Chen et al., 2021; Wallen et al., 2020).

Zusammenfassend stehen viele verschiedene Mechanismen im Verdacht, über die das Mikrobiom an der Entstehung von IPS beteiligt zu sein scheint. Zu diesen zählen die Aszension von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten entlang des *Nervus vagus*, eine erhöhte intestinale Permeabilität, der Einfluss der SCFAs und LPS auf physiologische Prozesse, die Interaktion mit pathogenen Mikrobiota, die Mikrogliazell-Aktivierung im ZNS sowie die direkte Synthese von neuroaktiven Substanzen durch die Mikrobiota selbst.

Um weitere Erkenntnisse über die Interaktion von Mikrobiom und IPS herauszufinden, wird in zahlreichen klinischen Studien die Zusammensetzung von Stuhl- und Speichelproben von IPS-Patient:innen untersucht. Um solche Veränderungen zu detektieren und im nächsten Schritt interpretieren zu können, sind unterschiedliche Herangehensweisen möglich. Ein häufig verwendetes Instrument zum Erkennen von mikrobiellen Veränderungen ist, wie bereits erwähnt, die Bestimmung von mehreren unterschiedlichen Diversitätsmetriken (Ullah et al., 2023; Willis, 2019). So wurde in der Arbeit von Z. Li et al. (2022) bei der Untersuchung der Mikrobiomdaten auf Dysbiose bei IPS-Patient:innen die Alpha-Diversität unter Verwendung von sechs verschiedenen Indizes berechnet. Hier konnte bei IPS-Patient:innen eine geringere Alpha-Diversität festgestellt werden (nicht nach Geschlecht, Alter und BMI bereinigt). Die in der Studie von Z. Li et al. (2022) verwendeten Parameter waren die *Richness* (zu deutsch, Reichhaltigkeit), der *Chao1-Index*, der *Abundance-based-Coverage-Estimator* (ACE), der *Shannon-Index*, der *Simpson-Index* und die *Pielou's Evenness*

(zu deutsch, Gleichmäßigkeit) (Z. Li et al., 2022). Die englischen Begriffe der Alpha-Diversitätsmetriken sind in der Mikrobiomforschung feststehende Begriffe und werden daher auch als solche verwendet. Diese werden detailliert in Kapitel 2.3.2.1 betrachtet. Inwiefern diese Metriken ein geeignetes Maß zur Bestimmung der mikrobiellen Unterschiede beim IPS sind, ist Gegenstand aktueller Diskussionen.

Eine Metaanalyse (Plassais et al., 2021) kam zum Schluss, dass Alpha-Diversität kein geeigneter Biomarker zur Untersuchung des Mikrobioms im Hinblick auf IPS sei. Neben der Bestimmung der Alpha- und Beta-Diversitätsmetriken werden zahlreiche Abundanz-Analysen der Mikrobiota in der Mikrobiomforschung von IPS durchgeführt (Zhou et al., 2023). Abundanz-Analysen untersuchen mittels verschiedener statistischen Verfahren das unterschiedlich häufige Vorkommen von einzelnen Taxa. Hier konnten bereits zahlreiche Abundanz-Unterschiede festgestellt werden und in unabhängigen Studien reproduziert werden (Bang & Heinzl, 2023; Ullah et al., 2023; Wallen et al., 2020).

Weitere Studien sind notwendig, um Einflüsse des Mikrobioms auf das IPS besser zu verstehen. Noch immer ist nicht klar, ob beobachtete Mikrobiomveränderungen Ursache oder Resultat des IPS sein könnten. Ein besseres Verständnis könnte ein großes Potential für präventive oder kurative Therapieansätze bieten (Bang & Heinzl, 2023; Boertien et al., 2019).

## **1.5 Hypothesen dieser Arbeit**

Im vorherigen Teil wurde die Bedeutung der Mikrobiomforschung im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere des IPS, hervorgehoben. Die im Rahmen dieser Studie untersuchte Kohorte umfasst geriatrische, multimorbide Patient:innen, die während eines stationären Aufenthaltes in Norddeutschland auf mikrobielle Veränderungen untersucht wurden. Studien zu Veränderungen des Mikrobioms bei stationär behandelten, geriatrischen multimorbiden Patient:innen mit fortgeschrittenem IPS in einer norddeutschen Kohorte wurden bislang nicht durchgeführt. Im Rahmen dieser Studie können bestehende Hypothesen bezüglich mikrobieller Veränderungen im Rahmen des IPS, welche in der Einleitung beschrieben wurden, an einer einzigartigen Kohorte überprüft werden. Zugang zur stationären Behandlung und damit zur Teilnahme an der Studie erlangte ein Patient:innen-

Kollektiv aus multimorbiden, geriatrischen, durch Krankheit stark beeinflussten Patient:innen. In dieser Kohorte war es möglich, mikrobielle Veränderungen zwischen IPS-Patient:innen und nND-Patient:innen trotz einer gewissen Heterogenität in Hinblick auf Vorerkrankungen zu analysieren und zu interpretieren. Dies wird durch einen umfangreichen Datensatz an Faktoren, die das Mikrobiom beeinflussen, ermöglicht. In dieser Kohorte lassen sich Mikrobiomveränderungen nicht nur zwischen Gesunden und Erkrankten, sondern auch zwischen IPS-Patient:innen und anderweitig multimorbid beeinträchtigten nND-Patient:innen untersuchen.

Hierbei wurde neben dem Mikrobiom des Darmes auch das Mikrobiom der Mundhöhle untersucht, welchem eine immer größer werdende Rolle beigemessen wird (Ranjan et al., 2018).

Im Rahmen dieser Arbeit werden die folgenden zwei Hypothesen untersucht:

Hypothese 1: Es zeigen sich Unterschiede in der **Beta-Diversität** und der **Abundanz** bestimmter Mikrobiota zwischen **Stuhlproben und Speichelproben** einer stationär behandelten, geriatrischen multimorbiden norddeutschen Kohorte.

Hypothese 2: In einer Kohorte von stationär behandelten, geriatrischen multimorbiden norddeutschen Patient:innen zeigen sich Unterschiede in der Mikrobiotazusammensetzung von Stuhl- und Speichelproben zwischen Patient:innen mit **Idiopathischem Parkinson-Syndrom (IPS)** und **nicht-neurodegenerativ erkrankten (nND)** Patient:innen.

- a) Es zeigen sich Unterschiede in der **Alpha-Diversität** der Mikrobiota.
- b) Es zeigen sich Unterschiede in der **Beta-Diversität** der Mikrobiota.
- c) Es zeigen sich Unterschiede in der **Abundanz** bestimmter Taxa.

## 2 METHODEN

### 2.1 ComOn-Studie

Die in dieser Arbeit verwendeten Daten wurden im Rahmen der Studie: *COgnitive and Motor interactions in the Older populatioN* (ComOn) erhoben (Geritz et al., 2020). Dabei handelte es sich um eine prospektive, explorative Beobachtungsstudie, die das Ziel einer umfangreichen quantitativen Datenerhebung von geriatrischen Patient:innen während eines zweiwöchigen stationären Aufenthaltes verfolgte. Die Datenerhebung geschah im Rahmen einer frührehabilitativen geriatrischen Komplexbehandlung auf der Station für Neurogeriatrie und internistische Altersmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel. Die Daten wurden von September 2018 bis Dezember 2020 erhoben.

Neben dem *Comprehensive Geriatric Assessment* wurde im Rahmen des Protokolls eine ausführliche Testbatterie zu Motorik und kognitiven Fähigkeiten durchgeführt, welche nicht Gegenstand dieser Arbeit ist. Außerdem wurde der Ernährungszustand der Studienteilnehmer:innen untersucht. Dies geschah einerseits durch Bestimmung objektiver Parameter wie Gewicht, Größe, *Body-Mass-Index* (BMI) sowie mittels einer körperlichen Untersuchung. Andererseits wurden validierte Fragebögen wie das *Mini Nutritional Assessment* (MNA) (Vellas et al., 1999), das *Malnutrition Universal Screening* (MUST) und das *Subjective Global Assessment* (SGA) erhoben.

Die Testbatterien zu Motorik und kognitiven Fähigkeiten wurden zu zwei Zeitpunkten durchgeführt. Die erste Messung (T1) erfolgte innerhalb der ersten zwei Tage nach Aufnahme auf der Station. Diese spiegelte am ehesten den prästationären Zustand der Patient:innen wider. Die zweite Messung (T2) wurde innerhalb der letzten zwei Tage des zweiwöchigen Aufenthaltes durchgeführt (Geritz et al., 2020). Die für diese Arbeit verwendeten Daten wurden zu Beginn des stationären Aufenthaltes (T1) erhoben.

Einschlusskriterien der ComOn-Studie waren das Einverständnis der Patient:innen bzw. des gesetzlichen Betreuers, ein Alter  $\geq 70$  Jahre, das Vorliegen einer chronischen Erkrankung oder von Multimorbidität und die Fähigkeit, selbständig zu stehen oder auch durch Zuhilfenahme von Gehhilfen mindestens drei Meter zu gehen. Auch jüngere Patient:innen, die  $< 70$  Jahre jedoch  $\geq 50$  Jahre alt waren, wurden in die Studie miteingeschlossen, sofern diese an mindestens zwei chronischen Erkrankungen litten. Eine fehlende Einwilligungsfähigkeit, eine klinisch diagnostizierte

Bewusstseinsbeschränkung, sowie eine starke kognitive Einschränkung ( $\leq 5$  Punkte im *Montreal Cognitive Assessment* (MoCA)) führten zur Nichtaufnahme oder zum Ausschluss der Patient:innen aus der ComOn-Studie (Geritz et al., 2020). Ebenfalls ausgeschlossen wurden Patient:innen mit einer ausgeprägten Sturzneigung ( $\geq 2$  Stürze in der letzte Woche), einer starken Einschränkung des korrigierten Sehvermögens (Sehschärfe  $< 60\%$ ) und einem anamnestischen Drogenkonsum (außer Nikotin).

Eine Subkategorie der ComOn-Studie war das sogenannte *Biobanking*, welches die Erhebung und Lagerung von Bioproben ausgewählter Studienteilnehmer:innen umfasst. Zu den Bioproben gehörten Stuhl-, Speichel- und Blutproben, welche der Biobank des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel zugeführt wurden. Seit 2017 erfolgt am UKSH eine strukturierte Sammlung von Bioproben im Rahmen eines *Broad Consent*, welcher routinemäßig allen stationär behandelten Patient:innen vorgelegt und von den meisten unterschrieben wurde. Das Vorliegen eines *Broad Consent* ermöglichte es auch für unsere Studie zeitkritisches Material unbürokratisch zu erheben, um dies zu einem späteren Zeitpunkt für spezifische wissenschaftliche Fragestellungen zeitlich gebündelt untersuchen zu können.

### **2.1.1 *Biobanking***

Teilnehmer:innen am *Biobanking* der ComOn-Studie waren Patient:innen, welche für die zusätzliche Erhebung und Asservierung der Bioproben aufgeklärt und mit dieser einverstanden waren. Ein Ethikvotum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität Kiel liegt vor (Prüfantragsnummer: 427/17). Die Eignung der Patient:innen für die Teilnahme am Biobanking wurde individuell durch das Untersucherteam geprüft. Neben den oben genannten Einschlusskriterien war für das *Biobanking* eine ausreichende Mitarbeit seitens der Patient:innen bei der Gewinnung der Bioproben sowie eine zuverlässige Kommunikation und Koordination mit dem Studien- und Pflegepersonal notwendig.

Die Gewinnung der Stuhl- und Speichelproben erfolgte interdisziplinär und unter engmaschiger Absprache zwischen Studien- und Pflegepersonal. Für die Probengewinnung wurden Stuhlprobenröhrchen und orale Abstrichtupfer verwendet. Die Bioproben wurden in den ersten beiden Tagen des stationären Aufenthalts

gewonnen. Ziel war es, Stuhlproben aus dem ersten Stuhlgang während des stationären Aufenthaltes in einem extra hierfür bereit gestellten Toilettenstuhl zu gewinnen. Hierfür war die Mitarbeit der Patient:innen von entscheidender Rolle, da diese das Personal auf den verrichteten Stuhlgang selbst hinweisen mussten. Die Probengewinnung erfolgte entweder durch das Studienpersonal oder in Absprache durch das Pflegepersonal. Es folgte die zeitnahe Erhebung der Speichelprobe aus der Mundschleimhaut der Patient:innen durch das Studienpersonal. Anschließend wurden die Bioproben nach Gewinnung für maximal 24 Stunden bei Raumtemperatur zwischengelagert, woraufhin die Bioproben der Biobank zugeführt wurden, wo sie bei -80 °Celsius tiefgefroren wurden.

## 2.2 Datenerhebung

### 2.2.1 Mikrobiomdaten-Verarbeitung

Die Auswertung der Proben erfolgte gesammelt durch das Institut für Klinische Molekularbiologie (IKMB) in Kiel. Es wurde das 16S-rRNA-Verfahren zur Generierung der Mikrobiomdaten verwendet. Es folgt nun die Beschreibung der Verarbeitung und Analyse der Stuhl- und Speichelproben. Detailliertere Beschreibungen zum Ablauf des 16S-rRNA-Verfahrens am IKMB in Kiel finden sich in Publikationen von Trautmann et al. (2020) und Troci et al. (2022).

Die DNA der Stuhlproben wurde unter Verwendung des *QIAamp DNA Fast Stool Mini Kits* semi-automatisiert auf dem *QIAcube* extrahiert. Für die Speichelproben wurde das *QIAamp UCP Pathogen Mini Kit* semi-automatisiert auf dem *QIAcube* verwendet. Extrahierte DNA der Stuhl- und Speichelproben wurde vor der PCR-Amplifikation bei -20 °C gelagert. Bei der Extraktion der Proben wurden leere Extraktionskontrollen miteinbezogen (Troci et al., 2022).

Für die Sequenzierung wurden die variablen Regionen V1 und V2 des 16S-rRNA-Gens innerhalb der DNA-Proben unter Verwendung des *Primerpaares* 27F-338R amplifiziert (Caporaso et al., 2012). Die PCR-Produkte wurden durch Elektrophorese in einem Agarosegel verifiziert und anschließend mit dem *SequalPrep Normalization Plate Kit* normalisiert, equimolar kombiniert und auf dem *Illumina MiSeq v3 2x300bp* sequenziert (Trautmann et al., 2020).

Die Verarbeitung der Mikrobiotadaten erfolgte unter Verwendung des *DADA2-Workflows* für große Datensätze, mit dem Ziel Häufigkeitstabellen zu erstellen, welche die Abundanz der Bakterien und ihrer taxonomischen Einheiten abbilden (Callahan et al., 2016). Häufigkeitstabellen von Mikrobiomdaten basieren auf der Analyse von Markergenen, welche zur Kategorisierung von Bakterien dienen. Bei einer Sequenzähnlichkeit der Markergene von 97% werden diese als *amplicon sequencing variants* (ASVs) zusammengefasst (DADA2-spezifisch) (Qian et al., 2020). Diese ASVs wurden taxonomisch – wenn möglich - bis auf Speziesebene zugeordnet. Sequenzierungen, welche nicht zugeordnet werden konnten, wurden in die feinst mögliche taxonomische Klassifikation eingeteilt (Callahan et al., 2016). Für die weiteren Analysen wurden nur Daten aus Proben mit 10.000 abgelesenen eindeutigen Sequenzen (*reads*) verwendet.

## 2.3 Datenauswertung

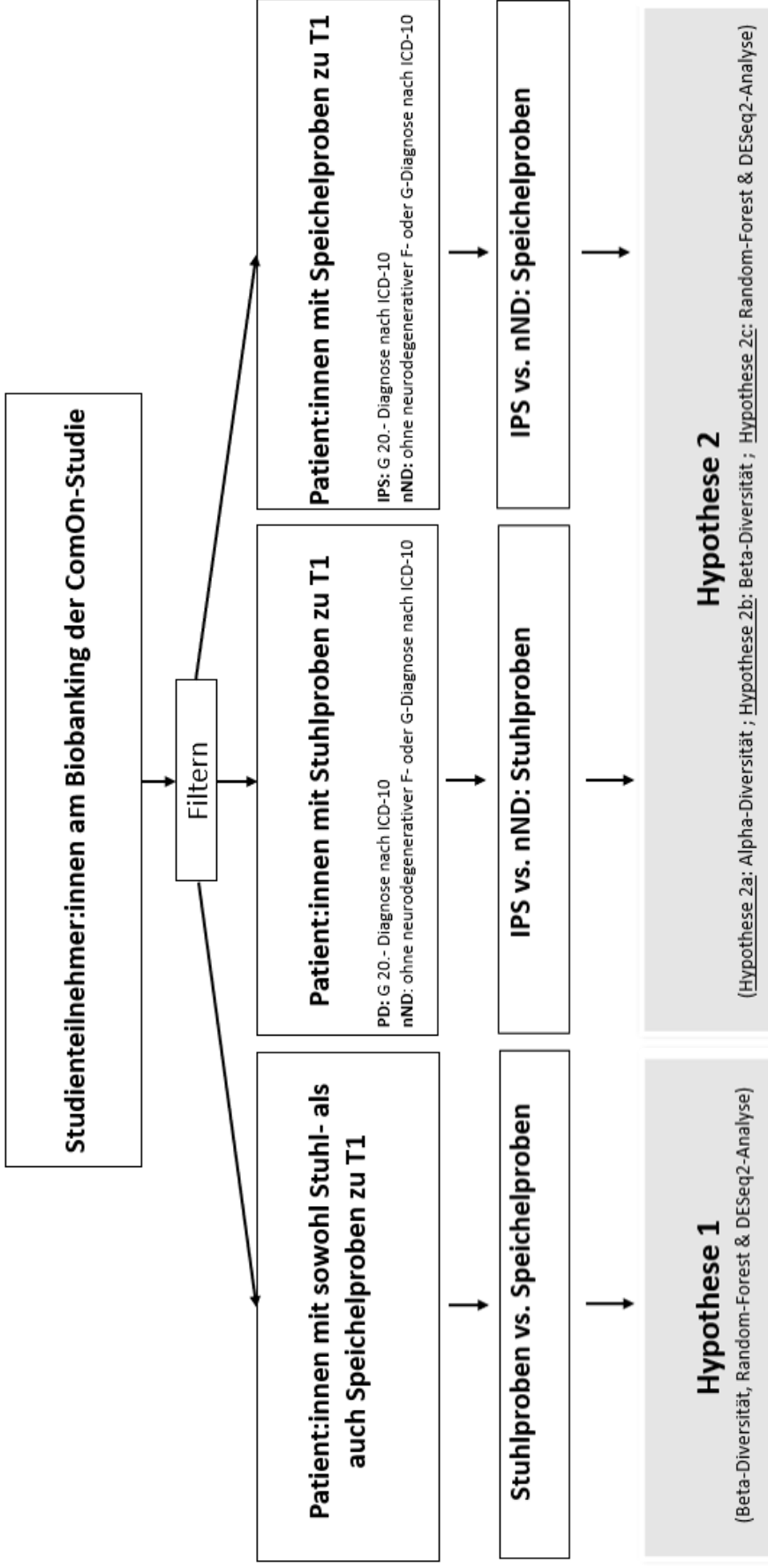
In diese Arbeit wurden Mikrobiotadaten von den Teilnehmer:innen der ComOn-Studie, die am *Biobanking* der ComOn-Studie im Messzeitraum von September 2018 bis Dezember 2020 teilgenommen haben, eingeschlossen. Zur Beantwortung der Hypothesen 1 und 2 dieser Arbeit wurden drei Subgruppen mit unterschiedlichen Ein- und Ausschlusskriterien gebildet. Das Vorgehen wird in Abbildung 4 visualisiert. Zur Beantwortung der Hypothese 1 wurde die Subgruppe „**Stuhl- vs. Speichelproben**“ gebildet, in die alle Patient:innen aus dem *Biobanking* unabhängig von ihrem Erkrankungsstatus (Neurodegeneration ja/nein) eingeschlossen wurden, die zum Messzeitpunkt T1 sowohl eine Stuhl- als auch eine Speichelprobe abgegeben hatten. Zur Beantwortung der Hypothese 2 wurden zwei Subgruppen gebildet: „**IPS vs. nND: Stuhlproben**“ (Patient:innen mit Stuhlproben zum Messzeitpunkt T1) und „**IPS vs. nND: Speichelproben**“ (Patient:innen mit Speichelproben zum Messzeitpunkt T1). Dabei wurde zur Bildung der Gruppe der Patient:innen mit IPS auf die Diagnose G 20.- nach ICD-10 gefiltert. In die Gruppe der nND wurden alle Patient:innen mit Stuhl- oder Speichelproben eingeschlossen, die zum Entlasszeitpunkt keine neurodegenerative F- oder G-Diagnose nach ICD-10 aufwiesen.

Zur Beantwortung der Hypothese 1 wurde zunächst die Beta-Diversität auf Gattungs- und Speziesebene erhoben. Anschließend wurden zur Auswertung der unterschiedlich

abundanten Taxa eine *Random-Forest*- und EdgeR-Analyse auf Phylumebene durchgeführt. Zur Beantwortung der Hypothese 2 wurde die Alpha-Diversität (2a), die Beta-Diversität (2b) und die *Random-Forest*- und DESeq2-Analysen (2c) verwendet. Die Auswertung der Mikrobiomdaten für die Alpha- und Beta-Diversität erfolgte jeweils auf den taxonomischen Ebenen Gattung und Spezies. Die *Random-Forest*- und DESeq2-Analysen erfolgten auf Familienebene.

**Abbildung 4:**

*Bildung der Subgruppen zur Beantwortung der Hypothesen*



*Anmerkung.* Aus den Studienteilnehmer:innen des Biobankings der ComOn-Studie wurden drei Subgruppen gebildet. Zur Beantwortung der Hypothese 1 wurde die Subgruppe „Stuhl- vs. Speichelproben“ gebildet, in die alle Patient:innen aus dem Biobanking eingeschlossen wurden, die zum Messzeitpunkt T1 sowohl eine Stuhl- als auch eine Speichelprobe abgegeben hatten. Zur Beantwortung der Hypothese 2 wurden wurden zwei Subgruppen gebildet: „IPS vs. nND: Stuhlproben“ (Patient:innen mit Stuhlproben zum Messzeitpunkt T1) und „IPS vs. nND: Speichelproben“ (Patient:innen mit Speichelproben zum Messzeitpunkt T1). Zur Bildung der Gruppe der Patient:innen mit IPS wurde auf die Diagnose G 20.- nach ICD-10 gefiltert. Für die Gruppe der nND wurden jeweils alle Patient:innen mit Stuhl- oder Speichelproben eingeschlossen, die keine neurodegenerative F- oder G-Diagnose nach ICD-10 zum Entlasszeitpunkt hatten. *Abkürzungen.* IPS = Patient:innen mit idiopathischem Parkinson-Syndrom; nND = nicht-neurodegenerativ erkrankte Patient:innen

### 2.3.1 Demographische und klinische Daten

Um bei den Ergebnissen aus den Auswertungen der Mikrobiomdaten neben der Unterteilung IPS vs. nND andere auf das Mikrobiom einflussnehmende Faktoren zu berücksichtigen, wurden aus dem ComOn-Studienprotokoll zahlreiche klinische und demographische Daten erhoben. Diese wurden, wie auch die Stuhl- und Speichelproben, zum Zeitpunkt der T1-Messungen erhoben. Zu den berücksichtigten, das Mikrobiom beeinflussende Faktoren, gehören: Herkunft, Alter, Geschlecht, BMI, Alkoholkonsum, Antibiotikaeinnahme in den letzten sechs Monaten, das Vorliegen von Obstipation oder Diarrhö, die Anzahl der wöchentlichen Stuhlgänge, die Anzahl eingenommener Medikamente sowie die Ernährungssituation anhand des Screeningergebnisses des MNA der Patient:innen. Die Patient:innen stammten alle aus Norddeutschland, was dem Einzugsgebiet der geriatrischen Abteilung des UKSH in Kiel entspricht.

Während des stationären Aufenthaltes wurde den Patient:innen eine Batterie an Fragebögen vorgelegt, die entweder eigenständig oder mit Hilfe des Studienpersonals ausgefüllt wurden. Teilnehmenden Patient:innen am *Biobanking* wurden zusätzliche Fragebögen vorgelegt. Hierzu zählen das *Mini Nutritional Assessment* (MNA), das *Malnutrition Universal Screening* (MUST) und das *Subjective Global Assessment* (SGA) (Vellas et al., 1999). Aus diesen Fragebögen konnten die in Abbildung 5 aufgeführten, für das Mikrobiom relevanten, Einflussgrößen abgeleitet werden. Der Parameter „Alkoholkonsum“ wurde unterteilt in kein Alkoholkonsum (0) und Alkoholkonsum (1). Der Parameter „Alkoholkonsum im letzten Jahr“ bestand aus sechs Kategorien: nie (0), einmal pro Monat oder weniger (1), zwei bis dreimal pro Monat (2), ein bis zweimal pro Woche (3), drei bis sechsmal pro Woche (4) und täglich (5). Bei dem Parameter „Antibiotikaeinnahme in den letzten 6 Monaten“ wurde zwischen „Nein“ (0) oder „Ja“ (1) unterschieden. Ob die Patient:innen unter „Obstipation“ oder „Diarrhö“ litten wurde ebenfalls in Fragebögen abgefragt. Diese Parameter unterteilten sich in nie (0), manchmal (1), häufig (2) oder sehr häufig (3). Auch die Anzahl der wöchentlichen Stuhlgänge floss in die Auswertung mit ein. Die Ernährungssituation der Patient:innen wurde anhand des Screeningergebnisses des MNA berücksichtigt. Im Rahmen des MNA wurden Aspekte wie Abnahme der Nahrungsaufnahme, Gewichtsverlust, Mobilität, akute Krankheit, neuropsychologische Probleme und der BMI miteinbezogen.

## Abbildung 5:

### Das Mikrobiom beeinflussende Größen

| <b>Einflussnehmende Größen</b>   |   |
|--|---|
| <u>Demographische Daten</u> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Herkunft</li><li>▪ Alter</li><li>▪ Geschlecht</li></ul>  | <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Antibiotikaeinnahme im letzten halben Jahr<br/>0 = nein<br/>1 = ja</li><li>▪ Obstipation<br/>0 = nie<br/>1 = manchmal<br/>2 = häufig<br/>3 = sehr häufig</li></ul>  |
| <u>Klinische Daten</u> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ <i>Body-Mass-Index (BMI)</i><br/>kg Körpergewicht/m<sup>2</sup> = BMI</li><li>▪ Alkoholkonsum<br/>0 = kein Alkoholkonsum<br/>1 = Alkoholkonsum</li><li>▪ Alkoholkonsum im letzten Jahr<br/>0 = nie<br/>1 = 1x/Monat oder weniger<br/>2 = 2 - 3x/Monat<br/>3 = 1 - 2x/Woche<br/>4 = 3 - 6x/Woche<br/>5 = täglich oder häufiger</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Diarrhoe<br/>0 = nie<br/>1 = manchmal<br/>2 = häufig<br/>3 = sehr häufig</li><li>▪ Anzahl wöchentlicher Stuhlgänge</li><li>▪ Anzahl eingenommener Medikamente</li><li>▪ <i>Mini Nutritional Assessment (MNA)</i><br/>Screening Ergebnis</li></ul> |

*Anmerkung.* Das Mikrobiom beeinflussende Größen, die in dieser Arbeit berücksichtigt wurden. Diese können in demographische und klinische Daten unterteilt werden. Aufgeführt ist zudem die Zusammensetzung der einzelnen klinischen Faktoren.

## 2.3.2 Mikrobiomdaten

### 2.3.2.1 Alpha-Diversität

Die in dieser Arbeit verwendeten Parameter zur Abbildung der Alpha-Diversität sind gängige Parameter der Mikrobiomforschung und wurden so auch von Li et al. in einer großangelegten Metaanalyse zu dem Thema „*Differences in Alpha Diversity of Gut Microbiota in Neurological Diseases*“ verwendet (Z. Li et al., 2022). Zur Überprüfung der Hypothese 2a hinsichtlich Alpha-Diversitätsunterschiede bei IPS vs. nND wurden folgende Parameter zur Abbildung der Reichhaltigkeit der Mikrobiota der untersuchten Proben verwendet: die *Richness*, der *Chao1-Index* und der ACE. Um auch die Gleichmäßigkeit der Verteilung der Mikrobiota in der jeweiligen Probe festzustellen wurden die *Pielou's Evenness*, der *Shannon-Index*, und der *Simpson-Index* herangezogen. Im Folgenden werden die einzelnen Parameter und deren Aussagekraft dargestellt.

#### (1) *Richness*

Die *Richness* ist die Anzahl der tatsächlich beobachteten oder identifizierten ASVs der Probe und spiegelt somit eine direkte Zählung der verschiedenen Arten wider (Kers & Saccenti, 2022; Thukral, 2017).

#### (2) *Chao1-Index*

Der *Chao1-Index* wurde von Anne Chao entwickelt und ist ein Abundanz-basierter nicht-parametrischer Schätzer, der versucht, die gesamte Reichhaltigkeit des Mikrobioms abzubilden (Chao, 1984). Da bei der Analyse der Probe lediglich die abbildungsfähige Mikrobiota (genauer ASVs) und nicht das gesamte Mikrobiom bestimmt werden kann, müssen Mikroorganismen, die im Mikrobiom vorhanden sind, aber nicht beobachtet wurden, mitberücksichtigt werden. Ziel ist es, eine Schätzung für die wahre Anzahl der Arten abzugeben, einschließlich derjenigen, die möglicherweise durch das 16S-rRNA-Verfahren nicht beobachtet wurden (Chao & Chiu, 2016). Bei dieser Metrik wird davon ausgegangen, dass seltene Taxa die meisten Informationen über die Anzahl der fehlenden Taxa liefern. Dabei berücksichtigt der *Chao1-Index* folgende Faktoren: die *Richness*, die Anzahl der *Singletons* (einmalig beobachtete Spezies) und die Anzahl der *Doubletons* (doppelt beobachtete Spezies). Eine Wiedergabe der Abundanz ist nicht möglich (B.-R. Kim et al., 2017; Qian et al., 2020). Der *Chao1-Index* verleiht somit den Taxa mit einer geringeren Häufigkeit ein stärkeres Gewicht (Chao, 1984; Kers & Saccenti, 2022).

### (3) *Abundance-based-Coverage-Estimator* (ACE)

Der ACE ist ähnlich wie der *Chao1-Index* ein nicht-parametrischer Schätzer, der über einen anderen Ansatz versucht, das gesamte Mikrobiom der Probe näherungsweise abzubilden. Dabei wird über einen Schwellenwert (10) in zwei Gruppen eingeteilt: Spezies, welche selten vorkommen, und Spezies, welche häufig vorkommen. Die Formel des ACE führt dazu, dass Arten, welche nur selten vorkommen, ähnlich wie beim *Chao1-Index*, eine größere Bedeutung bekommen. Im Gegensatz zum *Chao1-Index* verwendet der ACE nicht nur *Singletons* und *Doubletons*, sondern auch Informationen zur Abundanz der beobachteten Spezies (Hughes et al., 2001; B.-R. Kim et al., 2017).

### (4) *Pielou's Evenness*

Die Gleichmäßigkeit ist ein Maß für die relative Häufigkeit der verschiedenen Arten im selben Gebiet. Die *Pielou's Evenness* ist ein Maß dafür, wie gleichmäßig die Arten in einer Gemeinschaft verteilt sind. Der Wert der *Pielou's Evenness* variiert zwischen 0 und 1, wobei 1 für eine Gemeinschaft mit perfekter Gleichmäßigkeit steht. In Richtung 0 nimmt die *Pielou's Evenness* mit zunehmender Ungleichmäßigkeit ab (Kohn, 1977).

### (5) *Shannon-Index*

Der *Shannon-Index*, oder auch *Shannon-Wiener-Index* ist eine Schätzung für die Vielfalt der Taxa in einer Probe und kombiniert sowohl Reichhaltigkeit als auch Gleichmäßigkeit miteinander (Kers & Saccenti, 2022; B.-R. Kim et al., 2017; Lemos et al., 2011). Der *Shannon-Index* verwendet dabei die relativen Häufigkeiten der verschiedenen Taxa und misst der Reichhaltigkeit an Taxa ein größeres Gewicht als der Gleichmäßigkeit bei (Kers & Saccenti, 2022; B.-R. Kim et al., 2017). Der Index reagiert sensitiv auf Veränderungen in der Dominanz und Häufigkeit der Arten und gewichtet seltene Arten stärker, was bedeutet, dass er höher ist, wenn die Zahl der seltenen Arten zunimmt (Qian et al., 2020). Der *Shannon-Index* variiert von 0 bis 5. Ein höherer *Shannon-Index* deutet auf eine höhere Diversität oder Heterogenität in der Gemeinschaft hin (Kers & Saccenti, 2022; B.-R. Kim et al., 2017; Qian et al., 2020).

### (6) *Simpson-Index*

Der *Simpson-Index* ist eine Schätzung der Taxa-Diversität, der Reichtum und Gleichmäßigkeit kombiniert (Kers & Saccenti, 2022; Lemos et al., 2011). Dieser Index berücksichtigt bei seiner Messung eher die Taxa-Gleichmäßigkeit als die Taxa-Reichhaltigkeit. Der *Simpson-Index* legt mehr Gewicht auf dominante Taxa und reagiert empfindlicher auf Veränderungen dieser. Er variiert von 0 bis 1, und der Index

steigt, wenn die Vielfalt abnimmt. Somit deutet ein niedriger *Simpson-Index* auf eine höhere Diversität hin, während ein hoher Index auf eine geringere Diversität und stärkere Dominanz hindeutet (Kers & Saccenti, 2022; B.-R. Kim et al., 2017; Qian et al., 2020).

All diese Alpha-Diversitätsmetriken geben keine Informationen darüber, welche Arten in der Gemeinschaft vorhanden sind, welche Funktion diese erfüllen oder wie ähnlich beziehungsweise unterschiedlich diese sind (Kers & Saccenti, 2022; B.-R. Kim et al., 2017; Qian et al., 2020). Die Alpha-Diversität der Stuhl- und Speichelproben dieser Arbeit wurde durch die sechs zuvor vorgestellten Metriken: *Richness*, *Chao1-Index*, *ACE*, *Pielou's Evenness*, *Shannon-Index* und *Simpson-Index* abgebildet.

### **2.3.2.2 Auswertung der Alpha-Diversität**

Zur Berechnung der Alpha-Diversitätsmetriken wurde das Statistikprogramm R 4.3.2 mit dem R-Paket „vegan“ verwendet (Oksanen et al., 2022). Zur anschließenden Auswertung der Ergebnisse der Alpha-Diversitätsberechnungen wurde das Statistikprogramm JASP 0.16 verwendet.

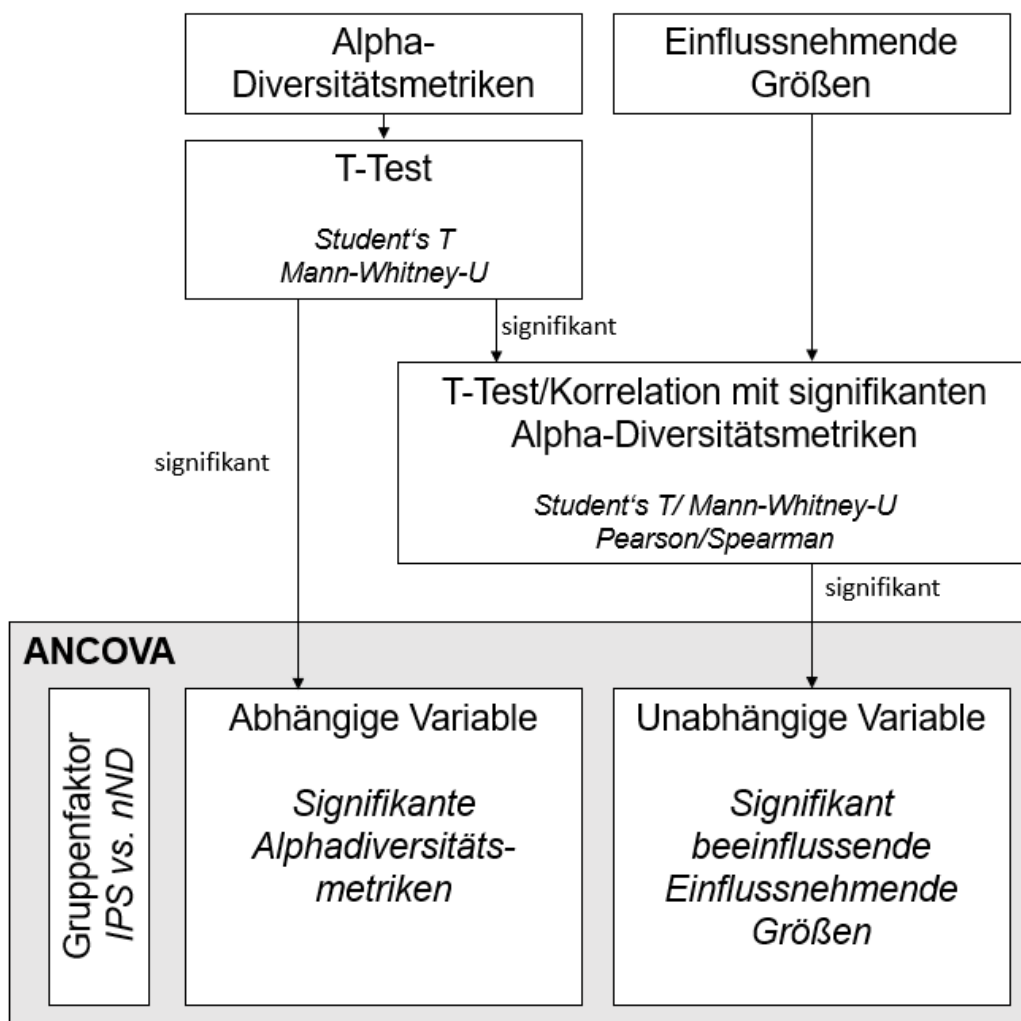
Dort wurden die Daten zunächst auf Ausreißer untersucht und diese aus den Daten entfernt. Als Ausreißer wurden Werte identifiziert, die sich außerhalb eines Bereiches von drei Standardabweichungen ausgehend vom Mittelwert befanden. Bezüglich der Alpha-Diversitätsmetriken wurde ein Ausreißer identifiziert und für die weiteren Analysen ausgeschlossen.

Die errechneten Alpha-Diversitätsmetriken der Stuhl- und Speichelproben wurden je nach Vorliegen einer Normalverteilung unter Verwendung des Student-T-Tests oder Mann-Whitney-U-Tests auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen IPS und nND untersucht. Dabei wurde die Alpha-Diversität sowohl auf Spezies- als auch auf Gattungsebene untersucht. Anschließend wurden signifikant unterschiedliche Metriken in Hinblick auf die zuvor beschriebenen, auf das Mikrobiom einflussnehmenden Größen untersucht. Hierfür wurden mittels T-Tests und Korrelationsanalysen nach Pearson oder Spearman, je nach Skalenniveau, einflussnehmende Größen bestimmt. Diese einflussnehmenden Größen zeigten in den jeweiligen Subgruppen zum Teil signifikante Unterschiede. Anschließend wurden zur weiteren Beurteilung der jeweils signifikant unterschiedlichen einflussnehmenden

Größen Kovarianzanalysen (ANCOVA) gerechnet. Die jeweils im T-Test signifikanten Alpha-Diversitätsmetriken wurden dabei als abhängige Variable verwendet, während die im T-Test als signifikant identifizierten, auf das Mikrobiom einflussnehmenden Größen als unabhängige Variable in die ANCOVA einfließen. Die Gruppierung erfolgte anhand des Faktors IPS vs. nND. Dies wird in Abbildung 6 veranschaulicht.

### Abbildung 6:

Statistische Analysen zur Alpha-Diversität



*Anmerkung.* Darstellung der aufeinander aufbauenden statistischen Analysen zur Interpretation des Zusammenhanges der Alpha-Diversitätsmetriken und den auf das Mikrobiom einflussnehmenden Größen. Zur Berechnung der ANCOVA wurden als abhängige Variable, die jeweils im T-Test signifikanten Alpha-Diversitätsmetriken verwendet. Diese wurden wiederum mit den einflussnehmenden Größen mittels T-Test/Korrelation (je nach Skalenniveau und Verteilungsmuster) auf Signifikanz untersucht. Die in diesen Tests signifikanten einflussnehmenden Größen fließen als unabhängige Variable in die ANCOVA mit ein. Als Gruppenfaktor dient die Unterteilung zwischen IPS vs. nND.

*Abkürzung.* ANCOVA = Kovarianzanalyse, IPS = Patient:innen mit idiopathischem Parkinson-Syndrom; nND = nicht-neurodegenerativ erkrankte Patient:innen

### 2.3.2.3 Auswertung der Beta-Diversität

Zur Überprüfung der Hypothese 1 und 2b wurde die Beta-Diversität der Mikrobiotadaten untersucht. Diese wird verwendet, um die unterschiedliche Zusammensetzung (Dissimilarität) zweier unterschiedlicher Proben voneinander darzustellen. Beta-Diversitätsmetriken fassen zusammen, welche Proben sich voneinander unterscheiden, indem sie je nach Metrik, Sequenzhäufigkeiten oder nur das Vorhandensein oder Nichtvorhandenseins der Sequenzen berücksichtigen (Kers & Saccenti, 2022). In dieser Arbeit wurde die Abstandsmetrik des *Bray-Curtis-Index* verwendet. Der *Bray-Curtis-Index* misst die unterschiedliche Zusammensetzung zwischen den mikrobiellen Gemeinschaften zweier Proben auf Grundlage von Zählungen der gleichen und unterschiedlichen Spezies oder Gattungen in jeder Probe (Qian et al., 2020). Er variiert von 0 (die beiden Proben haben alle Spezies/Gattungen gemein) bis 1 (die beiden Proben haben keine Spezies/Gattungen gemein)(Qian et al., 2020). Dabei wird die *Bray-Curtis-Dissimilarität* jeweils paarweise zwischen allen Proben berechnet (Kers & Saccenti, 2022).

Die Auswertung der Mikrobiotadaten erfolgte durch die webbasierte Plattform *Microbiome Analyst* (Chong et al., 2020). Die hochgeladenen Datensätze wurden zunächst gefiltert. Der *low count filter* wurde auf 0 und der *low variance filter*, basierend auf der *inter-quantile range*, auf 10% eingestellt. Bei der anschließenden Normalisierung der Daten wurde ein *data scaling* basierend auf dem *total sum scaling* durchgeführt. Diese Einstellungen wurden auch für die anschließenden Abundanz-Analysen verwendet.

Da Mikrobiomdaten hochdimensionale Daten sind, wurden die Ergebnisse der Beta-Diversität visuell in einer Ordinationsgrafik dargestellt. Ordinationsgrafiken werden verwendet, um die Komplexität der Mikrobiomdaten zu vereinfachen, indem die Daten geometrisch auf weniger Dimensionen, sogenannte nicht-metrische multidimensionale Skalierungen (NMDS), projiziert werden (Qian et al., 2020). Die Beta-Diversität wurde sowohl auf Gattungs- als auch auf Speziesebene berechnet. Anschließend wurden die Ergebnisse auf statistische Signifikanz untersucht. Für diese Untersuchung wurde eine *Permutational Analysis Of Variance* (PERMANOVA) mittels *Microbiome Analyst* durchgeführt (Qian et al., 2020). Die Durchführung der statistischen Analysen mittels *Microbiome Analyst* folgt einem standardisierten, vorprogrammierten Algorithmus.

### 2.3.2.4 Auswertung der *Random-Forest-Analyse*

Um nicht nur die Mikrobiotadaten auf Basis von Diversitätsmetriken zu beurteilen wurden im nächsten Schritt die Stuhl- und Speichelproben der Gruppen IPS vs. nND auf deren unterschiedlich abundante Taxa untersucht. Dafür wurde die *Random-Forest-Analyse* unter Verwendung von *Microbiome Analyst* durchgeführt. Die *Random-Forest-Analyse* ist ein Maschinenlernalgorithmus, der häufig zur Klassifizierung verschiedener Gruppen von Mikrobiotadaten verwendet wird. Dabei werden verschiedene Entscheidungsbäume erstellt, wobei jeder Baum auf einer zufälligen Teilmenge der Daten und Merkmale basiert. Das Ergebnis der *Random-Forest-Analyse* gibt Auskunft über die Wichtigkeit einzelner Taxa zur Unterscheidung von Gruppenmerkmalen und wird als *MeanDecreaseAccuracy* (MDA) angegeben (Breiman, 2001). Die *Random-Forest-Analyse* wurde auf Gattungsebene durchgeführt und anhand folgender Einstellungen berechnet: Anzahl der Entscheidungsbäume: 1000, Anzahl der verwendeten Prädiktoren: 10, und zur besseren Reproduzierbarkeit wurde als Basis für die Analyse eine Konstante (123456) verwendet.

### 2.3.2.5 Auswertung der DESeq2/EdgeR-Analyse

Im nächsten Schritt wurde eine Einzelfaktoranalyse (DESeq2/EdgeR-Analyse) auf *Microbiome Analyst* durchgeführt. Diese Analyse ermöglicht es, im Gegensatz zur *Random-Forest-Analyse*, Aussagen über statistisch signifikant unterschiedliche Taxa in zwei Gruppen herauszufinden und gibt an, ob diese häufiger oder seltener vorkommen (Love et al., 2014). Dabei wird das Verhältnis der durchschnittlichen Häufigkeit der Taxa der verschiedenen Gruppen berechnet. Das Ergebnis wird als *LogFoldChange* (LFC) angegeben. Dabei steht ein positiver LFC für Taxa, die in der untersuchten Gruppe häufiger vorkommen, und ein negativer LFC für Taxa, die seltener vorkommen (Love et al., 2014). Das Signifikanzniveau *alpha* wurde aufgrund multiplen Testens auf 0.01 adjustiert, um die signifikanten LFC der Taxa zu identifizieren. Die EdgeR-Analyse wurde zur Analyse der Hypothese 1 aufgrund des großen Datensatzes von 144 Proben verwendet. Die DESeq2-Analyse wurde für die Hypothese 2 verwendet, da hier die Datensätze mit 53 und 63 Proben nicht zu groß waren.

## 3 ERGEBNISSE

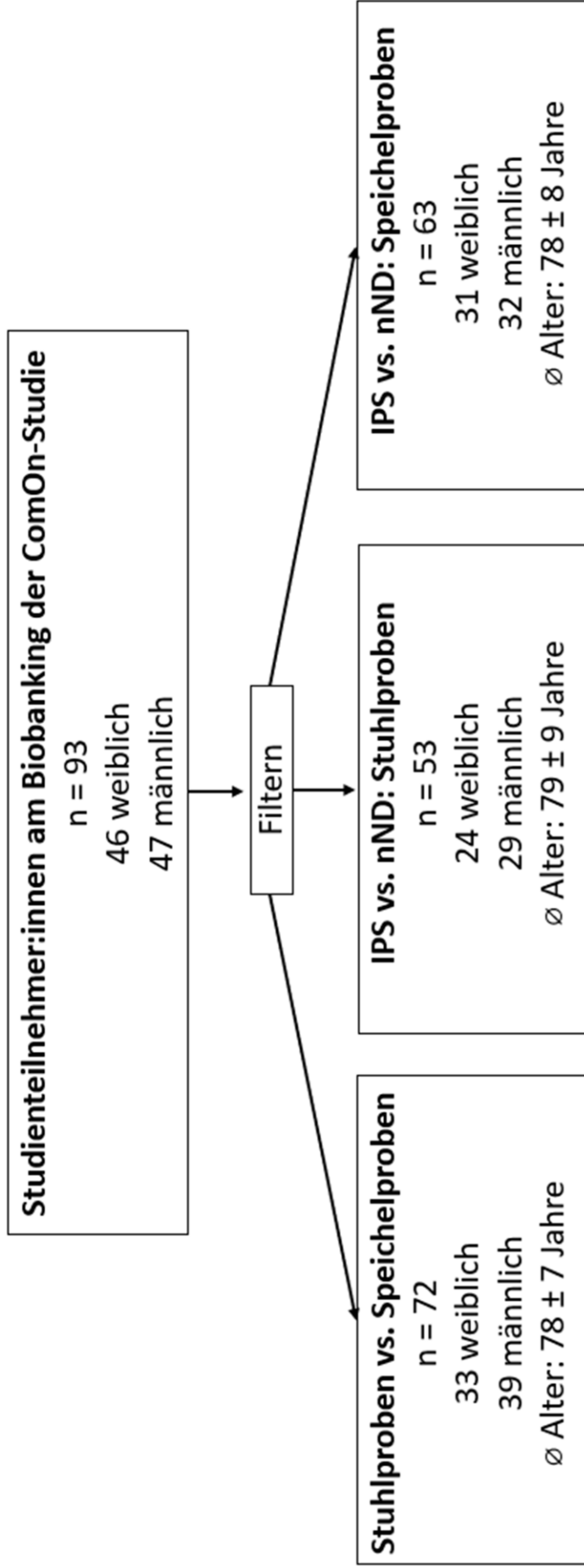
Zuerst werden für die gesamte untersuchte Kohorte die demographischen Daten beschrieben. Im Anschluss folgt die Beantwortung der Hypothese 1. Anschließend wird auf die Ergebnisse der Hypothese 2 eingegangen. Hierzu wurden die Mikrobiomdaten auf Alpha-Diversitätsunterschiede (2a), Beta-Diversitätsunterschiede (2b) und Berechnung der *Random-Forest*- und DESeq2-Analysen (2c) untersucht.

### 3.1 Demographische Daten

In den durchgeführten Untersuchungen dieser Arbeit nahmen  $n = 93$  Studienteilnehmer:innen teil. Davon waren 46 weiblich und 47 männlich. Aus diesen Teilnehmer:innen ergaben sich die zuvor erwähnten drei Subgruppen für die jeweiligen Untersuchungen (Abbildung 4). Zur Subgruppe „**IPS vs. nND: Stuhlproben**“ trugen  $n = 53$  Patient:innen mit einem durchschnittlichen Alter von  $79 \pm 7$  Jahren bei, wobei 24 weiblich und 29 männlich waren. Die Subgruppe „**IPS vs. nND: Speichelproben**“ setzte sich aus  $n = 63$  Patient:innen mit einem durchschnittlichen Alter von  $78 \pm 8$  Jahren zusammen, wobei 31 weiblich und 32 männlich waren. Zur Subgruppe „**Stuhlproben vs. Speichelproben**“, die zur Beantwortung der Hypothese 2 gebildet wurde, trugen  $n = 72$  Patient:innen mit einem durchschnittlichen Alter von  $78 \pm 7$  Jahre bei, wobei 33 weiblich und 39 männlich waren. Eine Übersicht über die demographischen Daten der drei Subgruppen liefert Abbildung 7.

**Abbildung 7:**

Demographische Daten der Subgruppen



*Anmerkung.* Demographische Daten der Subgruppe „Stuhlproben vs. Speichelproben“ zur Beantwortung der Hypothese 1 und der Subgruppen „IPS vs. nND: Stuhlproben“ und „IPS vs. nND: Speichelproben“ zur Beantwortung der Hypothese 2. *Abkürzungen.* IPS = Patient:innen mit idiopathischem Parkinsonsyndrom; nND = nicht-neurodegenerativ erkrankte Patient:innen; n = Anzahl; Ø = Durchschnitt

## 3.2 Einflussnehmende Faktoren

Die Subgruppe „IPS vs. nND: Stuhlproben“ setzte sich aus 20 IPS-Patient:innen und 33 nND-Patient:innen zusammen. Die Subgruppe war mit einem durchschnittlichen BMI von  $26.5 \pm 5.6 \text{ kg/m}^2$  leicht übergewichtig. Der aktuelle Alkoholkonsum wurde im Durchschnitt mit  $0.5 \pm 0.5$  Punkten angegeben, der Alkoholkonsum im letzten halben Jahr mit einem durchschnittlich Punktwert von  $1.5 \pm 1.5$ . Der Durchschnitt des Parameters Antibiotikaeinnahme in den letzten 6 Monaten betrug  $0.3 \pm 0.5$  Punkte. Für die Parameter der Stuhleigenschaften zeigte sich der Parameter Obstipation mit einem durchschnittlichen Wert von  $0.9 \pm 0.9$  Punkten und der Parameter Diarrhöe mit  $0.3 \pm 0.7$  Punkten angegeben. Die Anzahl der wöchentlichen Stuhlgänge betrug im Durchschnitt  $6 \pm 3$ . Das MNA-Screeningergebnis betrug im Durchschnitt  $11.2 \pm 2.2$  Punkte. Durchschnittlich nahmen die Patient:innen der Subgruppe  $7 \pm 4$  Medikamente pro Tag zu sich. Bis auf den BMI zeigten die aufgeführten einflussnehmenden Faktoren der Subgruppe „IPS vs. nND: Stuhlproben“ keinen signifikanten Unterschied zwischen IPS- und nND-Patient:innen. Im Student T-Test der Subgruppe „IPS vs. nND: Stuhlproben“ waren die Mittelwerte des BMI signifikant unterschiedlich ( $t(47) = 2.35$ ,  $p = 0.023$ ). IPS-Patient:innen hatten einen signifikant niedrigeren BMI ( $24 \pm 3.7 \text{ kg/m}^2$ ) als nND-Patient:innen ( $27.8 \pm 5.9 \text{ kg/m}^2$ ). Weitere Informationen zu den einflussnehmenden Faktoren der Subgruppe „IPS vs. nND: Stuhlproben“ können der Tabelle 2 und Anhang 2 entnommen werden.

**Tabelle 2:***Einflussfaktoren der Gruppe Stuhlproben: IPS vs. nND*

| <b>Einflussfaktoren -<br/>Stuhlproben: IPS vs.<br/>nND</b>  | <b>Test</b>  | <b>T-/U-Werte</b> | <b>df</b> | <b>p-Wert</b> |
|---|--------------|-------------------|-----------|---------------|
| <b>Geschlecht</b>   | Mann-Whitney | 314               | -         | 0.905         |
| <b>Alter</b>  | Student      | -1.685            | 50        | 0.098         |
| <b>BMI</b>  | Student      | 2.356             | 47        | 0.023*        |
| <b>Alkoholkonsum</b>  | Mann-Whitney | 276               | -         | 0.677         |
| <b>Alkoholkonsum im<br/>letzten Jahr</b>                    | Mann-Whitney | 88                | -         | 0.516         |
| <b>Antibiotikaeinnahme<br/>in den letzten 6<br/>Monaten</b> | Mann-Whitney | 121               | -         | 0.550         |
| <b>Obstipation</b>  | Mann-Whitney | 92                | -         | 0.636         |
| <b>Diarrhoe</b>   | Mann-Whitney | 102               | -         | 0.756         |
| <b>Anzahl<br/>wöchentlicher<br/>Stuhlgänge</b>              | Mann-Whitney | 110.5             | -         | 0.800         |
| <b>MNA: Screening-<br/>Ergebnis</b>                         | Mann-Whitney | 235               | -         | 0.662         |
| <b>Anzahl<br/>eingenommener<br/>Medikamente</b>             | Student      | 0.825             | 51        | 0.413         |

*Anmerkung.* Die Tabelle stellt die Ergebnisse der T-Test-Untersuchungen nach Student und Mann-Whitney der Einflussgrößen der Stuhlproben auf Unterschiede zwischen den Gruppen IPS vs. nND dar. Signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. *Abkürzungen.* df = Freiheitsgrade

In der Subgruppe „**IPS vs. nND: Speichelproben**“ wurden 27 IPS-Patient:innen und 36 nND-Patient:innen untersucht. Die Subgruppe war mit einem durchschnittlichen BMI von  $25.6 \pm 4.9$  kg/m<sup>2</sup> ebenfalls leicht übergewichtig. Der aktuelle Alkoholkonsum wurde im Durchschnitt mit  $0.6 \pm 0.5$  Punkten angegeben. Der Alkoholkonsum im letzten halben Jahr lag bei durchschnittlich  $1.5 \pm 1.5$  Punkten. Der Parameter Antibiotikaeinnahme in den letzten 6 Monaten wurde mit durchschnittlich  $0.3 \pm 0.5$  Punkten angegeben. Das MNA-Screeningergebnis betrug im Durchschnitt  $11.3 \pm 2.2$  Punkte. Durchschnittlich nahmen die Patient:innen der Subgruppe „IPS vs. nND: Speichelproben“  $6 \pm 4$  Medikamente pro Tag zu sich. Bis auf den Parameter Alter zeigten die aufgeführten einflussnehmenden Faktoren der Subgruppe keinen signifikanten Unterschied zwischen den IPS- und nND-Patient:innen. Im Mann-Whitney-U-Test zeigte sich, dass das Alter der IPS-Patient:innen (Median = 77)

signifikant niedriger war als das der nND-Patient:innen (Median = 80) war:  $U = 672$ ,  $p = 0.005$ . Die biseriale Rangkorrelation von 0.4 weist auf einen mittelstarken Effekt des Altersunterschieds hin. Weitere Informationen zu den einflussnehmenden Faktoren der Subgruppe „IPS vs. nND: Speichelproben“ können der Tabelle 3 und Anhang 3 entnommen werden.

**Tabelle 3:**

*Einflussfaktoren der Gruppe Speichelproben: IPS vs. nND*

| <b>Einflussfaktoren -<br/>Speichelproben: IPS<br/>vs. nND</b> | <b>Test</b>  | <b>T-/U-Werte</b> | <b>df</b> | <b>p-Wert</b> |
|---|--------------|-------------------|-----------|---------------|
| <b>Geschlecht</b>   | Mann-Whitney | 581               | -         | 0.077         |
| <b>Alter</b>  | Mann-Whitney | 672               | -         | 0.005*        |
| <b>BMI</b>  | Student      | -0.168            | 47        | 0.867         |
| <b>Alkoholkonsum</b>  | Mann-Whitney | 262.5             | -         | 0.264         |
| <b>Alkoholkonsum im<br/>letzten Jahr</b>                      | Mann-Whitney | 137               | -         | 0.740         |
| <b>Antibiotikaeinnahme<br/>in den letzten 6<br/>Monaten</b>   | Mann-Whitney | 184               | -         | 0.241         |
| <b>Obstipation</b>  | Mann-Whitney | 49.5              | -         | < .001        |
| <b>Diarrhoe</b>   | Mann-Whitney | 152.5             | -         | 0.957         |
| <b>wöchentliche<br/>Stuhlgänge</b>                            | Mann-Whitney | 170.5             | -         | 0.419         |
| <b>MNA:<br/>Screeningergebnis</b>                             | Mann-Whitney | 261               | -         | 0.587         |
| <b>Anzahl<br/>eingenommener<br/>Medikamente</b>               | Student      | -0.181            | 51        | 0.857         |

*Anmerkung.* Die Tabelle stellt die Ergebnisse der T-Test-Untersuchungen nach Student und Mann-Whitney der Einflussgrößen der Speichelproben auf Unterschiede zwischen den Gruppen IPS vs. nND dar. Signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. *Abkürzungen.* df = Freiheitsgrade

Die einflussnehmenden Faktoren der Subgruppe „**Stuhl- vs. Speichelproben**“, die zur Beantwortung der Hypothese 2 gebildet wurde, werden im Folgenden beschrieben. Die Patient:innen der Subgruppe hatten einen durchschnittlichen BMI von  $25.6 \pm 5$  kg/m<sup>2</sup> und waren somit ebenfalls leicht übergewichtig. Der aktuelle Alkoholkonsum wurde im Durchschnitt mit  $0.5 \pm 0.5$  Punkten angegeben. Der Alkoholkonsum im letzten halben Jahr lag bei durchschnittlich  $1.5 \pm 1.5$  Punkten. Der Parameter der Antibiotikaeinnahme in den letzten 6 Monaten betrug  $0.3 \pm 0.5$  Punkte. Für die Parameter der Stuhleigenschaften zeigte sich die Obstipation mit einem Durchschnitt

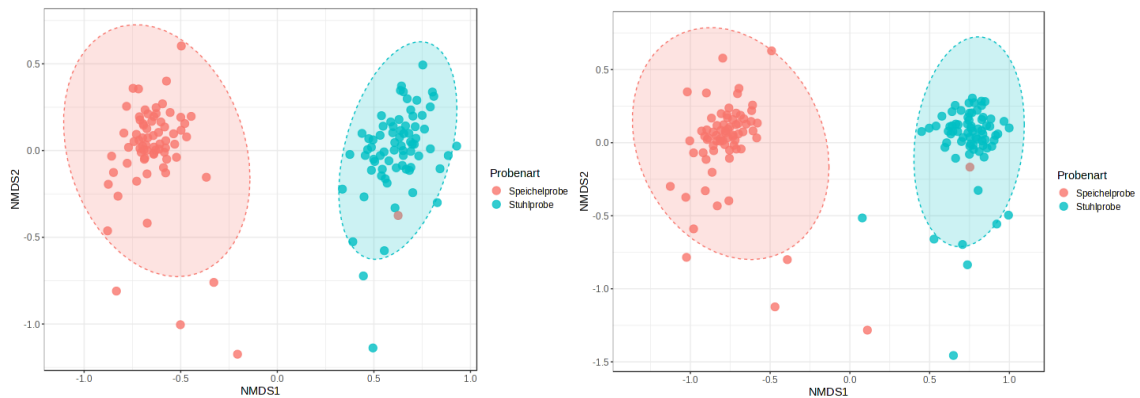
von  $0.9 \pm 0.9$  Punkten, die Diarrhöe mit einem Durchschnitt von  $0.2 \pm 0.6$  Punkten und die Anzahl der wöchentlichen Stuhlgänge mit einem Durchschnitt von  $6 \pm 3$  pro Woche. Das MNA-Screeningergebnis betrug im Durchschnitt  $10.9 \pm 2.4$  Punkte. Durchschnittlich nahmen die Patient:innen  $5 \pm 4$  Medikamente pro Tag zu sich. Weitere Informationen zu den einflussnehmenden Faktoren der Subgruppe „Stuhl- vs. Speichelproben“ können dem Anhang 1 entnommen werden.

### 3.3 Stuhl- vs. Speichelproben (Hypothese 1)

Zur Beurteilung der Hypothese 1 (Vergleich der Stuhl- und Speichelproben) wurde zunächst die Beta-Diversität mit dem Abstandsmaß nach *Bray-Curtis* berechnet. Für die Subgruppe „**Stuhl- vs. Speichelproben**“ wurde, wie in Kapitel 2.3.2.2 beschrieben, eine Ordinationsgrafik der NMDS erstellt. Diese ist in Abbildung 8 zu sehen, in welcher die Speichelproben rot und die Stuhlproben blau dargestellt sind. Jeder Punkt stellt eine Probe der 73 Patient:innen dar. Nach visueller Prüfung fiel die als Speichelprobe der COKI30108 kodierte Probe auf. Diese wurde als visueller Ausreißer mit größer drei Standardabweichungen vom Mittelwert erkannt und zusammen mit der korrespondierenden Stuhlprobe von COKI30108 für die weiteren Analysen entfernt. Daraufhin erfolgte eine PERMANOVA zur Darstellung der statistischen Signifikanz. Hier zeigte sich sowohl auf Gattungsebene ( $F = 211.8$ ,  $R^2 = 0.6$ ,  $p = 0.001$ ,  $FDR = 0.001$ ) als auch auf Speziesebene ( $F = 175$ ,  $R^2 = 0.5$ ,  $p = 0.001$ ,  $FDR = 0.001$ ) ein signifikanter Unterschied der Beta-Diversität zwischen den Stuhl- und Speichelproben. Das aufgeführte Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) weist darauf hin, dass > 50% der Variation in den Daten durch die Gruppenzugehörigkeit Stuhl- vs. Speichelproben erklärt wurde.

## Abbildung 8:

Beta-Diversität nach Bray-Curtis von Stuhl- und Speichelproben auf Gattungsebene (links) und Speziesebene (rechts)



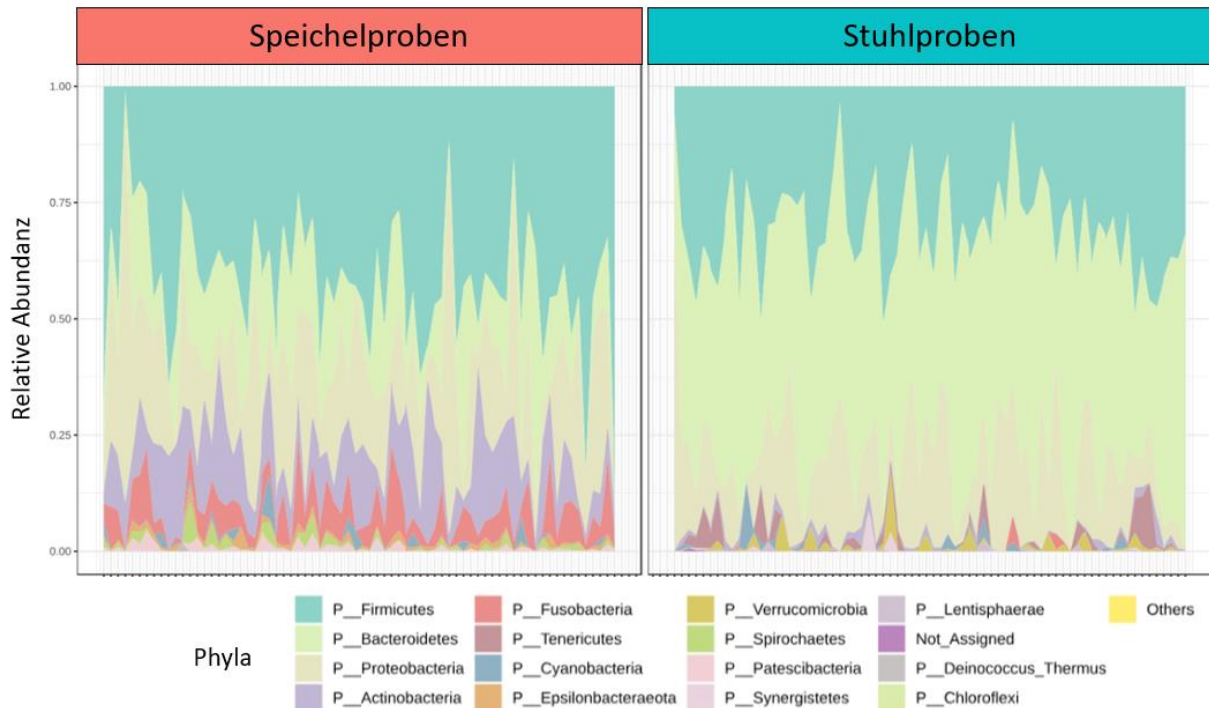
**Anmerkungen.** Die Ergebnisse der Beta-Diversität nach *Bray-Curtis* von „Stuhl- vs. Speichelproben“ wurden auf Gattungsebene (links) und auf Speziesebene (rechts) in einer NMDS-Ordinationsgrafik visuell dargestellt.

**Abkürzung.** NMDS = Nicht-metrische MultiDimensionale Skalierungen

Zur genaueren Differenzierung des Unterschieds zwischen den beiden Probenarten wurden die unterschiedlichen Abundanzen der Taxa betrachtet. Hier konnte auf Phylumebene vor allem ein Unterschied in der relativen Abundanz der *Firmicutes* und *Bacteroidetes* festgestellt werden. *Firmicutes* und *Bacteroidetes* waren in den Stuhlproben dominierend, wohingegen *Bacteroidetes* in den Speichelproben nur eine untergeordnete Rolle spielten. Dies ist in Abbildung 9 dargestellt.

## Abbildung 9:

Relative Abundanz der bakteriellen Phyla zwischen den Probenarten Stuhl- vs. Speichelproben

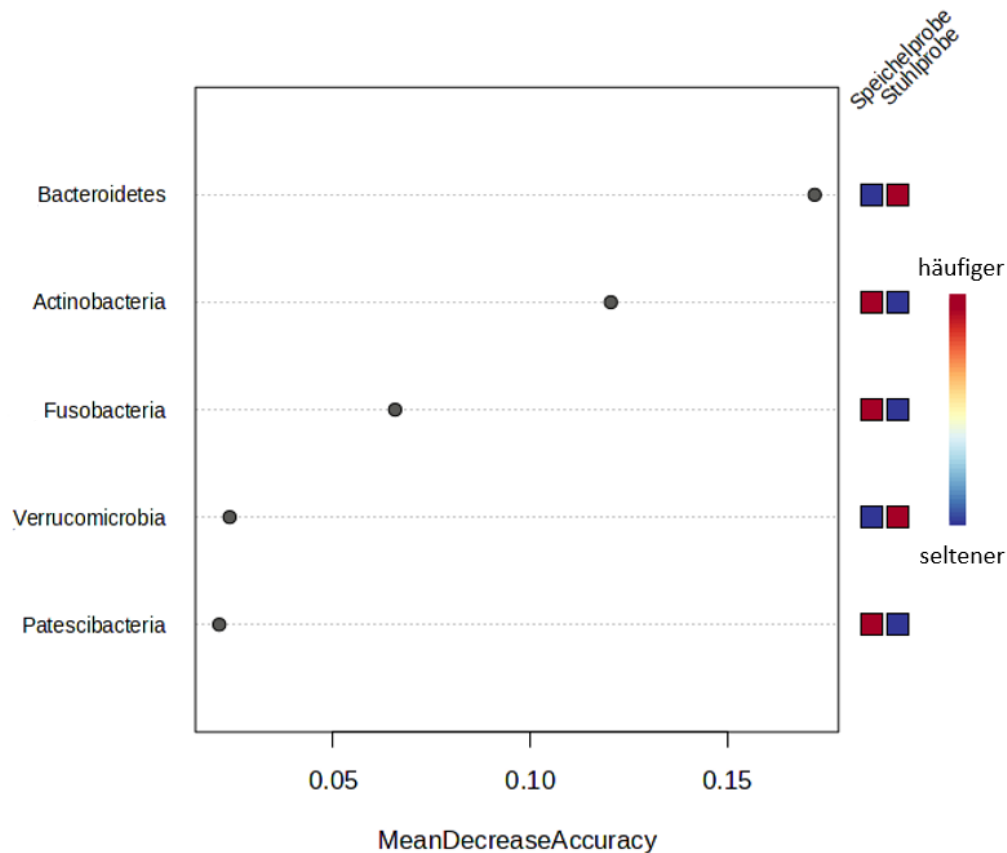


*Anmerkung.* Abgebildet ist die relative Abundanz der bakteriellen Phyla in einem gestapeltem Balkendiagramm. Auf der x-Achse sind die Proben der Patient:innen aus der Gruppe Stuhl- vs. Speichelproben zu sehen, auf der y-Achse die relative Abundanz der Mikrobiota.

Dies konnte bei einer *Random-Forest-Analyse* (siehe Abbildung 10) und einer EdgeR-Analyse (siehe Tabelle 4) bestätigt werden. Unter den Taxa, welche den größten Unterschied zwischen den Stuhl- und Speichelproben aufwiesen, waren bei der *Random-Forest-Analyse* *Bacteroidetes* auf dem ersten Platz. Hier zeigte sich ein solches vermehrtes Aufkommen von *Bacteroidetes* unter den Stuhlproben mit einem MDA von 0.17 und einem *out-of-bag* (OOB)-Fehler von nur 2%. *Actinobacteria*, welche auf Platz zwei der wichtigsten Taxa in der *Random-Forest-Analyse* zur Unterscheidung zwischen Stuhl- und Speichelproben aufgeführt waren, waren bei den Stuhlproben im Vergleich zu den Speichelproben seltener. *Fusobacteria* und *Patescibacteria* kamen bei den Stuhlproben im Vergleich zu den Speichelproben ebenfalls seltener vor. *Verrucomicrobiota* kamen bei den Stuhlproben hingegen gehäuft vor.

## Abbildung 10:

### Random-Forest-Analyse der Stuhl- vs. Speichelproben



*Anmerkung.* Abgebildet sind die Ergebnisse der Random-Forest-Analyse der Stuhl- vs. Speichelproben auf Phylumebene. Angegeben sind die Ergebnisse entsprechend der *MeanDecreaseAccuracy* und welche der Mikrobiota häufiger (rot), bzw. seltener (blau) bei den Stuhlproben vorkommen.

All diese fünf in der *Random-Forest-Analyse* wichtigen Taxa zur Unterscheidung der Stuhl- und Speichelproben konnten bei der EdgeR-Analyse wiedergefunden werden. Hier wurden noch weitere Taxa identifiziert, die signifikant unterschiedlich vorkamen. Zu diesen zählen: *Spirochaetes*, *Epsilonbacteraeota*, *Lentisphaerae*, *Tenericutes*, *Deinococcus-Thermus*, *Synergistetes* und *Cyanobacteria*.

**Tabelle 4:***Ergebnisse der EdgeR-Analyse der Stuhl- vs. Speichelproben*

| Gattungen             | p-Werte               | LFC     | logCPM | FDR                   |
|-----------------------|-----------------------|---------|--------|-----------------------|
| P_Patescibacteria     | 3.125e <sup>-62</sup> | -5.788  | 11.245 | 5.312e <sup>-61</sup> |
| P_Spirochaetes        | 6.869e <sup>-60</sup> | -6.5841 | 11.639 | 5.839e <sup>-59</sup> |
| P_Verrucomicrobia     | 2.291e <sup>-57</sup> | 7.7845  | 12.368 | 1.298e <sup>-56</sup> |
| P_Bacteroidetes       | 5.728e <sup>-33</sup> | 2.3475  | 18.678 | 2.434e <sup>-32</sup> |
| P_Epsilonbacteraeota  | 1.203e <sup>-32</sup> | -4.3607 | 12.006 | 4.091e <sup>-32</sup> |
| P_Lentisphaerae       | 3.211e <sup>-32</sup> | 5.0633  | 9.5744 | 9.098e <sup>-32</sup> |
| P_Actinobacteria      | 1.616e <sup>-30</sup> | -3.1577 | 16.001 | 3.925e <sup>-30</sup> |
| P_Tenericutes         | 1.301e <sup>-18</sup> | 4.2359  | 12.354 | 2.457e <sup>-18</sup> |
| P_Fusobacteria        | 5.690e <sup>-13</sup> | -3.4838 | 14.524 | 9.674e <sup>-13</sup> |
| P_Deinococcus-Thermus | 5.198e <sup>-12</sup> | -2.9343 | 8.3635 | 8.034e <sup>-12</sup> |
| P_Synergistetes       | 2.924e <sup>-5</sup>  | 1.8252  | 11.0   | 4.143e <sup>-5</sup>  |
| P_Cyanobacteria       | 1.181e <sup>-4</sup>  | -1.9405 | 13.384 | 1.545e <sup>-4</sup>  |

*Anmerkung.* Die Tabelle stellt die Ergebnisse der durchgeführten EdgeR-Analyse der Stuhl- vs. Speichelproben auf Phylumebene dar. Aufgelistet sind Mikrobiota, welche signifikant (mit einem auf multiples Testen adjustierten *alpha* von 0.01) unterschiedlich in den Probearten vorkommen. Die Ergebnisse sind anhand der p-Werte sortiert, mit entsprechenden LFC-Werten.

*Abkürzungen.* FDR = *False Discovery Rate*, LFC = *Log Fold Change*, logCPM = *log Counts Per Million*, P\_ = *Phylum*

## 3.4 IPS vs. nND (Hypothese 2)

### 3.4.1 Alpha-Diversität (2a)

Die Alpha-Diversität wurde durch die sechs zuvor genannten Metriken *Richness*, *Chao1-Index*, *ACE*, *Pielou's Evenness*, *Shannon-Index* und *Simpson-Index* abgebildet. Im Folgenden werden die Subgruppen „IPS vs. nND: Stuhlproben“ und „IPS vs. nND: Speichelproben“ in Hinblick auf die Alpha-Diversität untersucht.

Von den sechs Alpha-Diversitätsmetriken der Subgruppe „**IPS vs. nND: Stuhlproben**“ lagen sowohl auf Gattungs- als auch auf Speziesebene die *Richness*, der *Chao1-Index* und der *ACE* normalverteilt vor. Die *Pielou's Evenness* lag nach Shapiro-Wilk auf Gattungsebene normalverteilt und auf Speziesebene nicht-normalverteilt vor. Der *Shannon-* und *Simpson-Index* lagen auf beiden Ebenen nicht-normalverteilt vor. Die

durchschnittliche *Richness* betrug  $69 \pm 21$  Gattungen und  $92 \pm 25$  Spezies. Der durchschnittliche ACE betrug auf Gattungsebene  $3.5 \pm 0.6$  und auf Spezialebene  $3.9 \pm 0.6$ . Die *Pielou's Evenness* nahm auf Gattungsebene durchschnittlich Werte von  $0.6 \pm 0.1$  und auf Spezialebene Werte von  $0.7 \pm 0.1$  an. Der *Shannon-Index* lag auf Gattungsebene im Mittel bei  $2.7 \pm 0.4$  und auf Spezialebene bei  $3.2 \pm 0.5$ . Der *Simpson-Index* lag im Durchschnitt auf Gattungsebene bei  $0.9 \pm 0.1$  und auf Spezialebene bei  $0.9 \pm 0.1$ .

Die Ergebnisse der anschließenden T-Test Analysen der Alpha-Diversitätsmetriken auf Gattungs- und Spezialebene werden nun vorgestellt und sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Hierbei zeigten sich vor allem signifikante Unterschiede zwischen IPS- und nND-Patient:innen bei der *Pielou's Evenness*, und das sowohl auf Gattungs- als auch auf Spezialebene. Der Mann-Whitney-U-Test ergab mit  $p = 0.017$  auf Gattungsebene einen Rangsummenwert von  $U = 446$ . Auf Spezialebene ergab der Mann-Whitney-U-Test mit  $p = 0.043$  einen Rangsummenwert von  $U = 424$ . Außerdem konnte auf Spezialebene ein signifikant verringerter ACE mit  $p = 0.031$  und einem T-Wert von 1.912 bei 50 Freiheitsgraden beobachtet werden. Diesem statistischen Trend folgend zeigten sich auch verringerte Werte für die Gruppe IPS des *Shannon-Index* auf Spezialebene mit  $p = 0.059$  und einen Rangsummenwert von  $U = 346$ . Auch auf Gattungsebene zeigten hinsichtlich der Trennung zwischen IPS und nND der *Shannon-Index* ( $U = 416$ ,  $p = 0.061$ ), wie auch der *Simpson-Index* ( $U = 415$ ,  $p = 0.073$ ) einem statistischen Trend folgend verringerte Werte. In Abbildung 11 sind die Ergebnisse der signifikanten Untersuchungen dargestellt.

**Tabelle 5:**

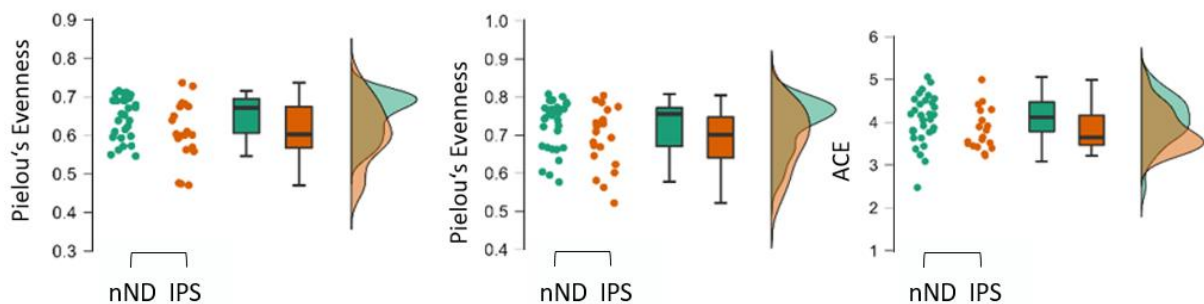
*Unterschiede in der Alpha-Diversität der Stuhlproben: IPS vs. nND auf Gattungsebene und Speziesebene*

| Alpha-Diversitätsmetriken                 | Test           | T/U           | T/U          | p             | p            |
|---|----------------|---------------|--------------|---------------|--------------|
|   |                | Gattungsebene | Speziesebene | Gattungsebene | Speziesebene |
| <b>Richness</b>                           | Student's T    | 0.509         | 0.846        | 0.307         | 0.201        |
| <b>Chao1-Index</b>                        | Student's T    | 0.509         | 0.846        | 0.307         | 0.201        |
| <b>Abundance-based-Coverage-Estimator</b> | Student's T    | 1.263         | 1.912        | 0.106         | 0.031        |
| <b>Pielou's Evenness</b>                  | Mann-Whitney U | 446           | 424          | 0.017         | 0.043        |
| <b>Shannon-Index</b>                      | Mann-Whitney U | 415           | 416          | 0.061         | 0.059        |
| <b>Simpson-Index</b>                      | Mann-Whitney U | 428           | 415          | 0.073         | 0.122        |

*Anmerkung.* Ergebnisse der Student/Mann-Whitney T-Test Untersuchungen der Alpha-Diversitätsmetriken der Stuhlproben auf Gattungsebene und Speziesebene. *Abkürzungen.* T = T-Wert; U = Rangsummenwert; p = p-Wert

**Abbildung 11:**

*Signifikante T-Test Analysen der Stuhlproben: IPS vs. nND der Pielou's Evenness und des ACE*



*Anmerkung.* Regenbogen-Plots der *Pielou's Evenness* auf Gattungsebene (links) und Speziesebene (Mitte) und des *Abundance-based-Coverage-Estimator* auf Speziesebene (rechts). IPS-Patient:innen sind rot dargestellt, nND-Patient:innen sind grün dargestellt.

*Abkürzungen.* IPS = Patient:innen mit idiopathischem Parkinson-Syndrom; nND = nicht-neurodegenerativ erkrankte Patient:innen; ACE = *Abundance-based-Coverage-Estimator*.

Nun werden die Ergebnisse der Korrelationen und T-Tests der einflussnehmenden Größen auf die signifikant unterschiedlichen Alpha-Diversitätsindizes (*Pielou's Evenness* (Gattungs- und Speziesebene) und ACE (Speziesebene)) vorgestellt.

Die daraufhin gerechneten Korrelationen zeigten für die *Pielou's Evenness* auf Gattungsebene keine signifikanten ordinal und metrisch skalierten Einflussgrößen. Im T-Test nach Mann-Whitney zeigte die Einflussgröße Geschlecht einen signifikanten Unterschied bei der *Pielou's Evenness*:  $U = 463$ ,  $p = 0.019$ . Eine ANCOVA-Analyse wurde durchgeführt, um potentielle Unterschiede in der *Pielou's Evenness* auf Gattungsebene (siehe Tabelle 6) zwischen den beiden Gruppen zu untersuchen, wobei der Einfluss von IPS vs. nND als Gruppenfaktor und das Geschlecht als Kovariable kontrolliert wurde. Die Mittelwerte und Standardabweichungen für *Pielou's Evenness* zeigten sich in der Gruppe nND mit  $M = 0.653$ ,  $SD = 0.056$ ,  $N = 32$  und in der Gruppe IPS mit  $M = 0.610$ ,  $SD = 0.077$ ,  $N = 20$ .

Die ANCOVA-Ergebnisse zeigten einen signifikanten Haupteffekt für IPS vs. nND ( $F(1, 49) = 5.630$ ,  $p = 0.022$ ,  $\eta^2 = 0.096$ ) und einen signifikanten Effekt für das Geschlecht ( $F(1, 49) = 4.088$ ,  $p = 0.049$ ,  $\eta^2 = 0.070$ ). Die Residuen wurden nicht signifikant beeinflusst (Summe der Quadratmittel = 0.195,  $df = 49$ , mittlere Quadratsumme = 0.004).

**Tabelle 6:**

*ANCOVA der Pielou's Evenness der Stuhlproben: IPS vs. nND auf Gattungsebene*

| Parameter   | Summe der Quadrate | df | Durschnitt der Quadrate | F     | p-Werte | $\eta^2$ |
|-------------|--------------------|----|-------------------------|-------|---------|----------|
| IPS vs. nND | 0.022              | 1  | 0.022                   | 5.630 | 0.022   | 0.096    |
| Geschlecht  | 0.016              | 1  | 0.016                   | 4.088 | 0.049   | 0.070    |
| Residuen    | 0.195              | 49 | 0.004                   | -     | -       | -        |

*Anmerkung.* Die Tabelle beinhaltet die Ergebnisse der Kovarianzanalysen (ANCOVA) der *Pielou's Evenness* auf Gattungsebene mit IPS vs. nND als Gruppenfaktor. Das Geschlecht, welches sich zuvor im T-Test als signifikant unterschiedlich dargestellt hatte, fließt als Kovariable in die ANCOVA mit ein. *Abkürzungen.*  $df$  = Freiheitsgrade;  $F$  = F-Statistik;  $\eta^2$  = Eta-Quadrat

Nun wurde die *Pielou's Evenness* auf Speziesebene betrachtet. Hier konnten sich in den Korrelationen und T-Tests keine signifikanten einflussnehmenden Größen identifizieren lassen. Daher wurde auch im Anschluss keine ANCOVA gerechnet.

Als nächstes wurde der ACE auf Speziesebene betrachtet. Von den betrachteten Einflussgrößen korrelierte der BMI signifikant mit dem ACE ( $r = 0.301$ ,  $p = 0.038$ ). Im

T-Test zeigte der Alkoholkonsum als Gruppenfaktor einen signifikanten Unterschied des ACE zwischen IPS- und nND-Patient:innen ( $t(47) = 2.44$ ,  $p = 0.019$ ). Nachfolgend wurde eine ANCOVA berechnet, bei der der ACE auf Speziesebene als abhängige Variable, IPS vs. nND als Gruppenfaktor und BMI und Alkoholkonsum als Kovariablen betrachtet wurden (siehe Tabelle 7). Die Mittelwerte und Standardabweichungen für diese ANCOVA zeigten sich, wie folgt: in der Gruppe nND mit  $M = 4.032$ ,  $SD = 0.558$ ,  $N = 30$  und in der Gruppe IPS mit  $M = 3.636$ ,  $SD = 0.593$ ,  $N = 16$ . Es zeigte sich kein signifikanter Haupteffekt für IPS vs. nND ( $F(1, 42) = 2.268$ ,  $p = 0.140$ ,  $\eta^2 = 0.045$ ). Auch für die Kovariablen zeigte sich kein signifikanter Einfluss durch den BMI ( $F(1, 42) = 2.554$ ,  $p = 0.117$ ,  $\eta^2 = 0.050$ ) oder den Alkoholkonsum ( $F(1, 42) = 4.077$ ,  $p = 0.050$ ,  $\eta^2 = 0.080$ ). Die Residuen wurden nicht signifikant beeinflusst (Summe der Quadratmittel = 12.398,  $df = 42$ , mittlere Quadratsumme = 0.295).

**Tabelle 7:**

*ANCOVA des ACE der Stuhlproben: IPS vs. nND auf Speziesebene*

| Parameter     | Summe der Quadrate | df | Durschnitt der Quadrate | F     | p-Werte | $\eta^2$ |
|---------------|--------------------|----|-------------------------|-------|---------|----------|
| IPS vs. nND   | 0.669              | 1  | 0.669                   | 2.268 | 0.140   | 0.045    |
| BMI           | 0.754              | 1  | 0.754                   | 2.554 | 0.117   | 0.050    |
| Alkoholkonsum | 1.203              | 1  | 1.203                   | 4.077 | 0.050   | 0.080    |
| Residuen      | 12.398             | 42 | 0.295                   | -     | -       | -        |

*Anmerkung.* Die Tabelle beinhaltet die Ergebnisse der Kovarianzanalysen (ANCOVA) des *Abundance-based-Coverage-Estimators* (ACE) auf Speziesebene mit IPS vs. nND als Gruppenfaktor. Der BMI, welcher zuvor signifikant mit dem ACE korrelierte, fließt als Kovariable in die ANCOVA mit ein. Ebenso der Alkoholkonsum, welcher sich zuvor zwischen den Gruppen IPS vs. nND im T-Test als signifikant unterschiedlich dargestellt hatte.

*Abkürzungen.*  $df$  = Freiheitsgrade;  $F$  = F-Statistik;  $\eta^2$  = Eta-Quadrat

In der Subgruppe „**IPS vs. nND: Speichelproben**“ lagen von den sechs Alpha-Diversitätsmetriken die Parameter *Richness*, *Chao1-Index*, *Pielou's Evenness* und *Shannon-Index* auf Gattungsebene nach Shapiro-Wilk normalverteilt vor. Der ACE und der *Simpson-Index* lagen nicht normalverteilt vor. Die durchschnittliche *Richness* betrug  $66 \pm 18$  Gattungen und  $101 \pm 28$  Spezies. Der durchschnittliche ACE betrug auf Gattungsebene  $3.5 \pm 0.7$  und auf Speziesebene  $4.1 \pm 0.9$ . Die *Pielou's Evenness* betrug durchschnittlich  $0.7 \pm 0.1$  auf Gattungsebene und  $0.7 \pm 0.1$  auf Speziesebene. Der *Shannon-Index* lag auf Gattungsebene im Mittel bei  $2.7 \pm 0.4$  und auf Speziesebene bei  $3.2 \pm 0.4$ . Der *Simpson-Index* lag im Durchschnitt auf Gattungsebene bei  $0.9 \pm 0.1$  und auf Speziesebene bei  $0.9 \pm 0$ .

In den Alpha-Diversitätsmetriken zeigten sich in den durchgeführten T-Tests keine signifikanten Unterschiede bei den Speichelproben im Hinblick auf die Unterteilung IPS vs. nND. Dies galt sowohl auf Gattungsebene als auch auf Speziesebene.

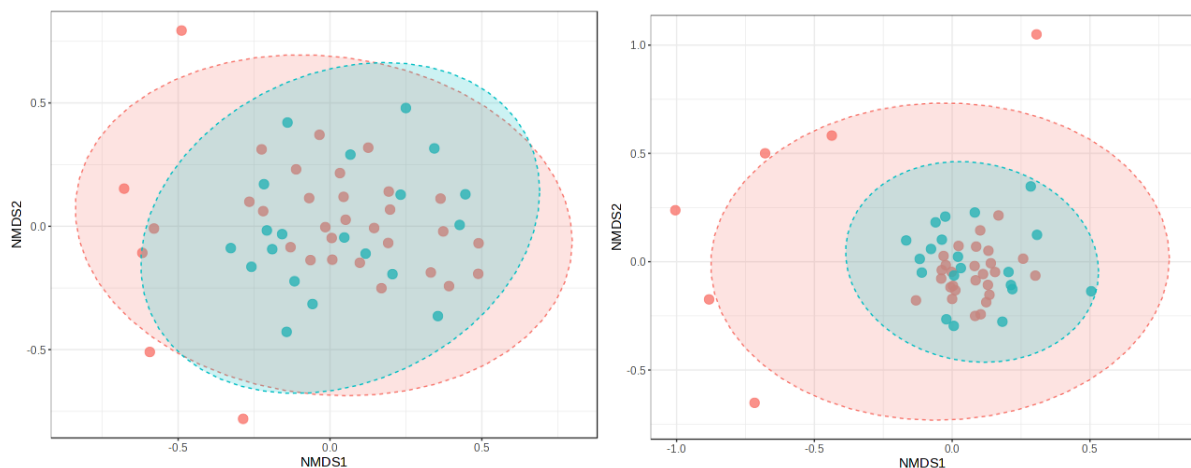
### 3.4.2 Beta-Diversität (2b)

Die Beta-Diversität zwischen den Gruppen IPS und nND wurde erneut sowohl anhand der Stuhl- als auch der Speichelproben berechnet. Als Abstandsmetrik wurde bei allen Rechnungen der *Bray-Curtis-Index* verwendet.

Die in der Gruppe „IPS vs. nND: Stuhlproben“ zunächst durchgeführte NMDS ist als Ordinationsgrafik in Abbildung 12 dargestellt. Hier sind IPS-Stuhlproben blau und nND-Stuhlproben rot dargestellt. Nach visueller Prüfung erfolgte die statistische Prüfung der NMDS auf Signifikanz. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde eine PERMANOVA gerechnet. Diese ergab sowohl auf Gattungsebene ( $F = 1.325$ ,  $p = 0.195$ ) als auch auf Speziesebene ( $F = 1.504$ ,  $p = 0.107$ ) keinen signifikanten Unterschied.

#### Abbildung 12:

*Beta-Diversität nach Bray-Curtis von „IPS vs. nND: Stuhlproben“ auf Gattungs- und Speziesebene*



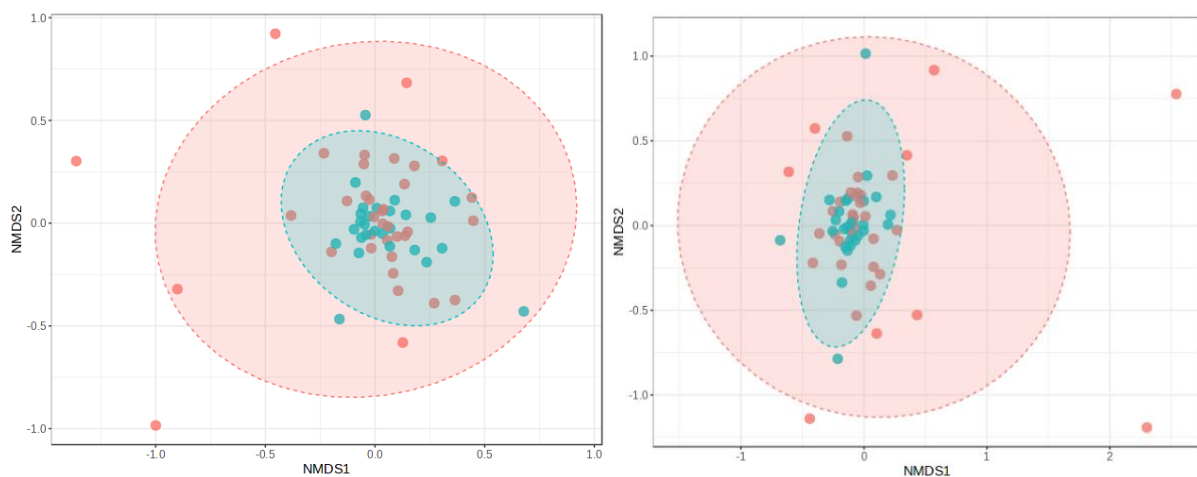
*Anmerkung.* Die Ergebnisse der Beta-Diversität nach *Bray-Curtis* von „IPS vs. nND: Stuhlproben“ wurden auf Gattungsebene (links) und auf Speziesebene (rechts) in einer NMDS-Ordinationsgrafik visuell dargestellt. Die IPS-Patient:innen sind blau und die nND-Patient:innen rot dargestellt.

*Abkürzungen.* IPS = Patient:innen mit idiopathischem Parkinson-Syndrom; nND = nicht-neurodegenerativ erkrankte Patient:innen

Ähnlich wurde für die Gruppe „**IPS vs. nND: Speichelproben**“ verfahren. Nachdem die Beta-Diversität zwischen den Gruppen IPS und nND in Form einer Ordinationsgrafik (siehe Abbildung 13) erstellt wurde, erfolgte die statistische Prüfung der Ergebnisse auf signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Auch hier zeigten die Ergebnisse der gerechneten PERMANOVA keinen signifikanten Unterschied, weder auf Gattungsebene ( $F = 0.324$ ,  $p = 0.929$ ) noch auf Speziesebene ( $F = 1.011$ ,  $p = 0.415$ ).

### Abbildung 13:

*Beta-Diversität nach Bray-Curtis von „IPS vs. nND: Speichelproben“ auf Gattung- und Speziesebene*



*Anmerkung.* Die Ergebnisse der Beta-Diversität nach *Bray Curtis* von „IPS vs. nND: Speichelproben“ wurden auf Gattungsebene (links) und auf Speziesebene (rechts) in einer NMDS-Ordinationsgrafik visuell dargestellt. Die IPS-Patient:innen sind blau und die nND-Patient:innen rot dargestellt.

*Abkürzungen.* IPS = Patient:innen mit idiopathischem Parkinson-Syndrom; nND = nicht-neurodegenerativ erkrankte Patient:innen

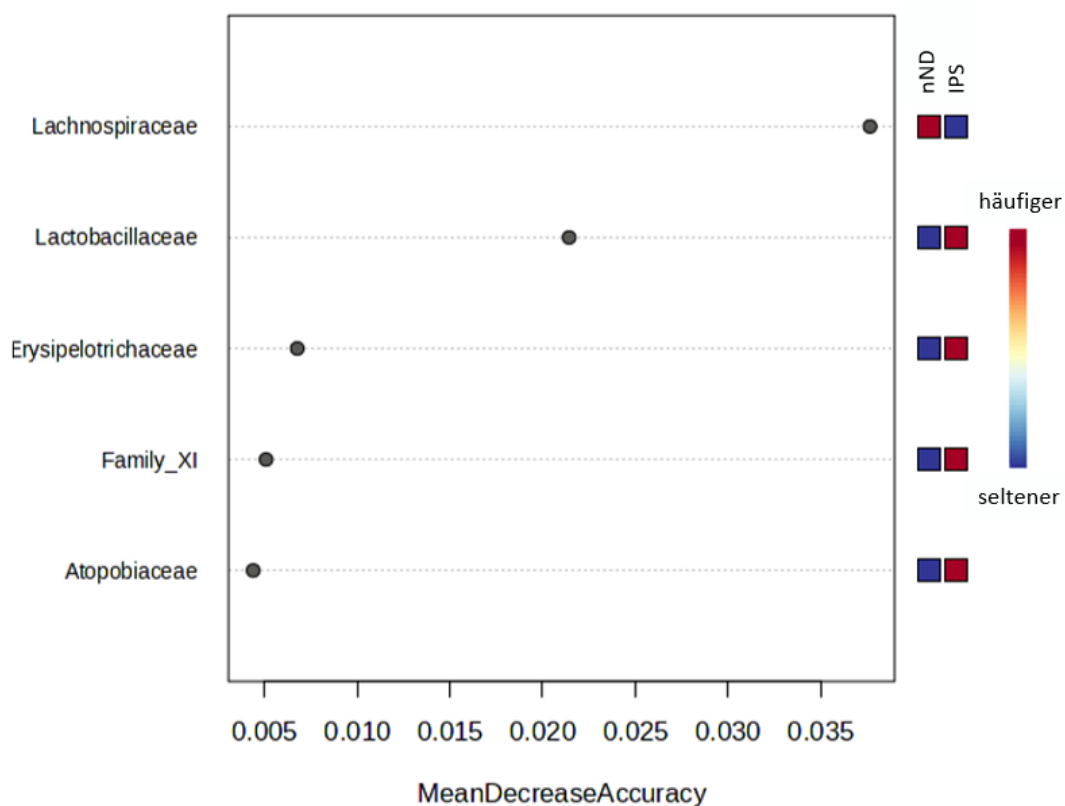
### 3.4.3 Random-Forest-Analyse (2c)

Die Analysen des *Random-Forst-Algorithmus* wurden ebenfalls anhand der Stuhl- und Speichelproben durchgeführt. Durch diesen Algorithmus können Taxa ermittelt werden, die den größten Einfluss auf die Unterscheidung der zwei Gruppen IPS und nND haben. Abgebildet sind die fünf wichtigsten bakteriellen Familien zur Unterscheidung IPS vs. nND anhand des MDA. Berechnet wurde die *Random-Forest-Analyse* auf Gattungsebene. Das Ergebnis für die Subgruppe „**IPS vs. nND: Stuhlproben**“ ist in Abbildung 14 zu sehen. Der MDA der fünf wichtigsten Familien

variierte zwischen 0.039 und 0.004. Die zwei wichtigsten Familien bildeten *Lachnospiraceae* und *Lactobacillaceae*. Die Familie der *Lachnospiraceae* kam in den Stuhlproben der IPS-Patient:innen seltener vor, wohingegen die Familie der *Lactobacillaceae* bei IPS-Patient:innen häufiger vorkamen. Ebenfalls häufiger prävalent waren die Familien *Erysipelotrichaceae*, *Family\_XI* (Ordnung *Clostridiales*) und *Atopobiaceae*. Der OOB-Fehler dieser Analyse lag bei 32%.

**Abbildung 14:**

*Random-Forest-Analyse der Stuhlproben auf Familienebene*



*Anmerkung.* Abgebildet sind die Ergebnisse der *Random-Forest-Analyse* der Stuhlproben auf Familienebene mit dem Faktor IPS vs. nND. Angegeben sind die Ergebnisse entsprechend der *MeanDecreaseAccuracy* und welche der Mikrobiotafamilien häufiger (rot) bzw. seltener (blau) bei den IPS-Patient:innen vorkommen.

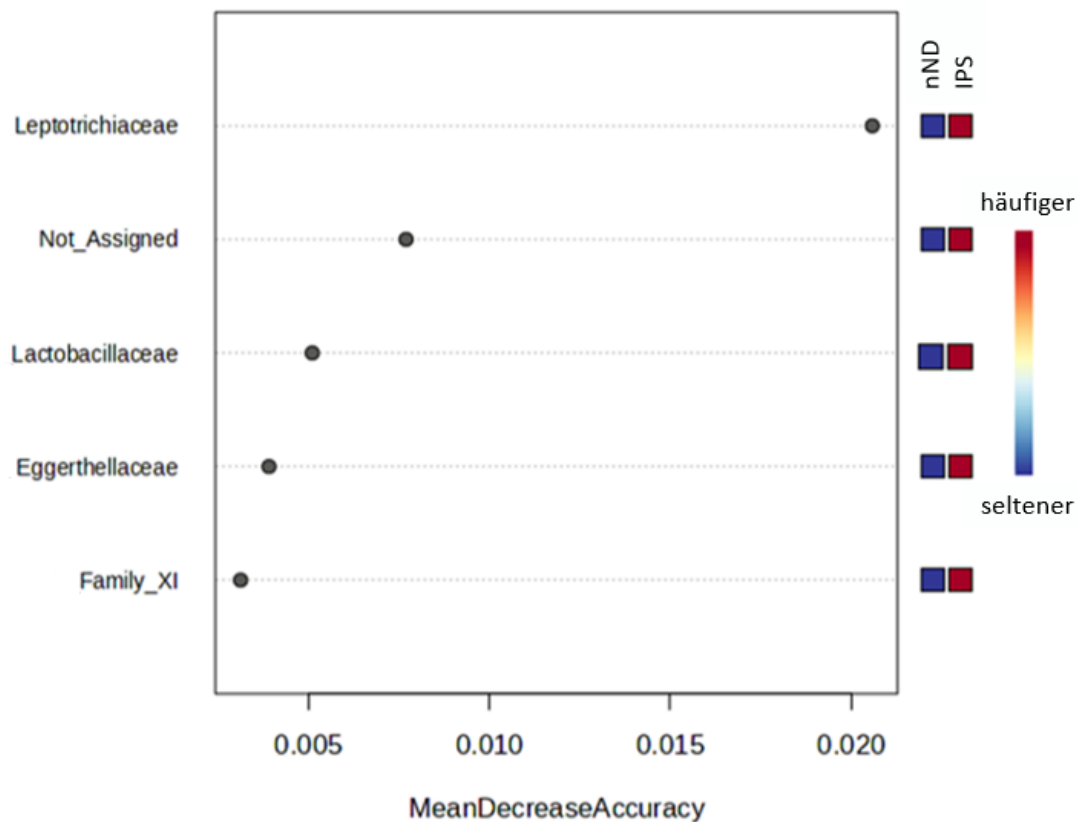
*Abkürzungen.* IPS = Patient:innen mit idiopathischem Parkinson-Syndrom; nND = nicht-neurodegenerativ erkrankte Patient:innen

Das Ergebnis der *Random-Forest-Analyse* für die Subgruppe „**IPS vs. nND: Speichelproben**“ ist in Abbildung 15 zu sehen. Hier zeigten sich die fünf wichtigsten Familien mit einem MDA zwischen 0.020 und 0.002. Den höchsten MDA wies die

Familie der *Leptotrichiaceae* auf. Diese kamen in den Speichelproben der IPS-Patient:innen gehäuft vor. Platz zwei belegte ein nicht näher klassifiziertes Bakterium. Auch hier war die Familie der *Lactobacillaceae* aufgeführt, welche bei den IPS-Patient:innen vermehrt vorkamen. Mit aufgeführt waren noch *Eggerthellaceae* (seltener bei IPS) und *Family\_XI* der Ordnung *Bacillales* (häufiger bei IPS). Der OOB-Fehler für diese Analyse lag bei 42%.

**Abbildung 15:**

*Random-Forest-Analyse der Speichelproben auf Familienebene*



*Anmerkung.* Abgebildet sind die Ergebnisse der *Random-Forest-Analyse* der Speichelproben auf Familienebene mit dem Faktor IPS vs. nND. Angegeben sind die Ergebnisse entsprechend der *MeanDecreaseAccuracy* und welche der Mikrobiotafamilien häufiger (rot) bzw. seltener (blau) bei den IPS-Patient:innen vorkommen.

*Abkürzungen.* IPS = Patient:innen mit idiopathischem Parkinson-Syndrom; nND = nicht-neurodegenerativ erkrankte Patient:innen

### 3.4.4 DESeq2-Analyse (2c)

Die DESeq2-Analysen wurden zur Bestimmung von quantitativen Unterschieden der Abundanz verschiedener bakterieller Familien zwischen IPS- und nND-Patient:innen durchgeführt.

In der Gruppe „**IPS vs. nND: Stuhlproben**“ mit 53 Patient:innen zeigte sich eine Familie von den 207 im Datensatz vorhandenen Familien mit einem auf multiples Testen adjustierten *alpha* von 0.01 signifikant unterschiedlich zwischen den IPS- und nND-Patient:innen. Das Ergebnis kann Tabelle 8 entnommen werden. Die Familie der *Lactobacillaceae* zeigte sich mit einem positiven LFC von 3.83 und einer Signifikanz von  $p = 1.08 \cdot 10^{-4}$  in der Gruppe der IPS-Patient:innen vermehrt.

#### Tabelle 8:

*Ergebnisse der DESeq2-Analyse der Stuhl- und Speichelproben auf Familienebene*

| Probentyp             | Familie              | p-Werte   | LFC    | logCPM | FDR    |
|-----------------------|----------------------|-----------|--------|--------|--------|
| <b>Stuhlproben</b>    | F_Lactobacillaceae   | 1.077 e-4 | 3.8317 | 0.9894 | 0.0074 |
| <b>Speichelproben</b> | F_Enterobacteriaceae | 0.0066    | 4.7304 | 1.7432 | 0.4525 |

*Anmerkung.* Die Tabelle stellt das Ergebnis der durchgeführten DESeq2-Analyse der Stuhl- und Speichelproben auf Familienebene dar. Aufgelistet sind die Mikrobiotafamilie, welche jeweils als einzige signifikant (mit einem auf multiples Testen adjustierten *alpha* von 0.01) unterschiedlich in den Gruppen IPS vs. nND der Stuhl- und Speichelproben vorkamen.

*Abkürzungen.* F\_ = Family, FDR = False Discovery Rate, LFC = Log Fold Change, logCPM = log Counts Per Million

In der Analyse der Gruppe „**IPS vs. nND: Speichelproben**“ mit 63 Patient:innen zeigte sich eine Familie von den 207 im Datensatz vorhandenen Familien mit einem auf multiples Testen adjustierten *alpha* von 0.01 signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Gruppen IPS vs. nND. Die Ergebnisse der DESeq2- Analysen der Speichelproben können ebenfalls Tabelle 8 entnommen werden. Hier zeigte sich die Familie der *Enterobacteriaceae* mit einem LFC von 4.73 und einer Signifikanz von  $p = 0.007$  in den Speichelproben der IPS-Patient:innen vermehrt.

## 4 DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde in einer norddeutschen Kohorte von stationär behandelten, geriatrischen multimorbiden Patient:innen untersucht, ob IPS-Patient:innen eine andere mikrobielle Zusammensetzung von Stuhl- und Speichelproben aufweisen als nND-Patient:innen. Es konnten in Hinblick auf bestimmte Parameter tatsächlich Unterschiede in dieser Kohorte detektiert werden. Welche Relevanz diese Unterschiede auch im Kontext anderer Studien aufweisen, wird in den folgenden Abschnitten diskutiert.

### 4.1 Hypothese 1

Zur Verifizierung der Ergebnisse der Stuhl- und Speichelprobenanalysen wurden die beiden Probenarten zunächst miteinander verglichen. Entsprechend den Erwartungen konnte hier ein hochsignifikanter Unterschied der Beta-Diversität nach *Bray-Curtis* festgestellt werden. Auch bei Betrachtung der Abundanz der Taxa auf Ordnungsebene wurde klar, dass sich die Abundanz verschiedener Mikrobiota entsprechend der Probenentnahmeorte stark voneinander unterscheidet. Dies bestätigt, wie zuvor berichtet, bestehende wissenschaftliche Erkenntnisse (Huttenhower, 2012).

Hier zeigten sich auf Phylumebene Unterschiede in der Abundanz der zwei großen Mikrobiotaordnungen *Firmicutes* und *Bacteroidetes* zwischen den beiden Probenarten. Während in den Stuhlproben *Firmicutes* und *Bacteroidetes* ungefähr zwei Drittel der relativen Abundanz der bakteriellen Phyla einnahmen, so war in den Speichelproben nur das Phylum *Firmicutes* dominierend. Die *Bacteroidetes* waren im Vergleich zu den Stuhlproben deutlich weniger abundant und spielten bei den Speichelproben eine weniger dominante Rolle als bei den Stuhlproben. Dies konnte anhand der *Random-Forest-* und *EdgeR-Analyse* bestätigt werden. Entsprechend der hohen Variabilität zwischen den beiden Probenarten waren noch weitere Phyla signifikant unterschiedlich stark zwischen den beiden Probeentnahmeorten vertreten. In der *Random-Forest-Analyse* zeigten sich auch *Actinobacteria* und *Fusobacteria* in den Speichelproben deutlich häufiger vertreten als in den Stuhlproben. In der *EdgeR-Analyse* zeigten sich mit der höchsten Signifikanz *Patescibacteria* und *Spirochaetes* in den Stuhlproben verringert. *Verrucomicrobiota*, welche ebenso wie die *Patescibacteria*

in der *Random-Forest-Analyse* vertreten waren, zeigten sich hingegen bei den Stuhlproben häufiger vertreten.

Die Ergebnisse dieser Studie entsprechen wissenschaftlichen Erkenntnissen über die hohe Variabilität der Zusammensetzung von Mikrobiota an unterschiedlichen Probeentnahmeorten. Das Darmmikrobiom scheint von *Firmicutes* und *Bacteroidetes* dominiert zu sein, wohingegen das orale Mikrobiom der Speichelproben deutlich diverser aufgestellt erscheint (Maki et al., 2021). In einer breit angelegten Metaanalyse von Maki et al. wurde das Mikrobiom gesunder Erwachsener anhand der unterschiedlichen Probeentnahmeorten verglichen. Hier zeigten *Bacteroidetes* in den Stuhlproben eine relative Abundanz von 50% - 60% und *Firmicutes* von 30% - 35%. Andere Phyla nahmen nur ungefähr 10% der restlichen Abundanz ein (Maki et al., 2021). Speichelproben zeigten sich bei der durchgeführten Studie deutlich diverser (Maki et al., 2021). Hier waren die *Firmicutes* mit 40% - 43% das dominierende Phylum, während *Bacteroidetes* lediglich ungefähr 20% der relativen Abundanz einnahmen. Andere Phyla wie *Proteobacteria*, *Actinobacteria* und *Fusobacteria*, gefolgt von anderen Phyla, welche in den Stuhlproben nicht vorkamen (*Spirochaetes* und *Acidobacteria*), nahmen deutlich mehr Raum ein als bei den Stuhlproben (Maki et al., 2021). Dies ist kohärent mit den Ergebnissen dieser Studie. Dadurch wird wiederum die Validität der folgenden Ergebnisse der Hypothese 2 dieser Arbeit unterstützt.

## 4.2 Hypothese 2

Bei der Untersuchung der **Stuhlproben** auf Gruppenunterschiede zwischen IPS vs. nND konnten bei der Betrachtung der Alpha- und Beta-Diversität bei den meisten Parametern keine signifikanten Unterschiede herausgearbeitet werden. Lediglich bei der *Pielou's Evenness* auf Gattungs- und Speziesebene und dem ACE auf Speziesebene konnte ein Unterschied detektiert werden. Dies deutet auf eine Abnahme der Gleichmäßigkeit der Verteilung der Mikrobiota in den Stuhlproben hin. In den daraufhin durchgeführten Analysen zur Beurteilung der auf das Mikrobiom einflussnehmenden Faktoren konnte gezeigt werden, dass die *Pielou's Evenness* auf Gattungsebene neben der Unterteilung zwischen IPS vs. nND auch durch den einflussnehmenden Faktor Geschlecht signifikant beeinflusst wurde. Auf

Speziesebene war der Unterschied allein durch den Faktor IPS vs. nND zu erklären. Andere einflussnehmende Faktoren hatten keinen Einfluss. Der Unterschied in der Gruppe IPS vs. nND bei der Betrachtung des ACE konnte unter Einbeziehung der einflussnehmenden Faktoren nicht erhärtet werden. Hier zeigte sich kein signifikanter Haupteffekt für IPS vs. nND. Somit scheint nur die *Pielou's Evenness* vor allem auf Speziesebene einen signifikanten Unterschied unter Einbeziehung der einflussnehmenden Faktoren vorzuweisen.

Bei der Untersuchung der Stuhlproben hinsichtlich Unterschieden in der Abundanz der Taxa konnte in der *Random-Forest-Analyse* mit niedrigen MDA-Werten von maximal 0.039 und einem OOB-Fehler von 32% ein vermindertes Vorkommen von *Lachnospiraceae* und ein vermehrtes Vorkommen von *Lactobacillaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Family\_XI* (Ordnung *Clostridiales*) und *Atopobiaceae* in den Stuhlproben der IPS-Patient:innen festgestellt werden. In der DESeq2-Analyse konnte allein die Familie der *Lactobacillaceae* mit einem signifikanten Unterschied zwischen IPS vs. nND identifiziert werden. Auch hier zeigte sich ein vermehrtes Vorkommen von *Lactobacillaceae* in den Stuhlproben der IPS-Patient:innen.

Bei den **Speichelproben** konnten bei der Betrachtung der Alpha- und Beta-Diversität keine Gruppenunterschiede zwischen IPS vs. nND detektiert werden. Unterschiede in der Abundanz konnten wiederum festgestellt werden. Bei der *Random-Forest-Analyse* konnte mit niedrigen MDA-Werten und einem OOB-Fehler von 42% ein vermehrtes Vorkommen von *Leptotrichiaceae*, *Lactobacillaceae* und *Family\_XI* (Ordnung *Bacillales*) in den Speichelproben der IPS-Patient:innen nachgewiesen werden. *Eggerthellaceae* und eine nicht näher klassifizierte Familie wurden hingegen mit einem verminderten Vorkommen in Verbindung gebracht. Hier fällt auf, dass sowohl bei den Stuhl- als auch den Speichelproben jeweils die Familie der *Lactobacillaceae* unter den fünf relevantesten Taxa zur Unterscheidung zwischen IPS vs. nND aufgeführt waren. Dabei kam die Familie der *Lactobacillaceae* bei den IPS-Patient:innen in den Stuhl- und Speichelproben jeweils vermehrt vor. In der DESeq2-Analyse der Speichelproben zeigte sich die Familie der *Enterobacteriaceae* bei IPS-Patient:innen ebenfalls vermehrt. Überschneidungen bei den relevanten Familien zwischen den Ergebnissen der *Random-Forest-Analyse* und der DESeq2-Analyse der Speichelproben gab es nicht.

## 4.3 Interpretation der Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der durchgeführten Analysen dieser spezifischen Kohorte in den wissenschaftlichen Kontext eingeordnet.

Allgemein ist es wichtig zu beachten, dass Vergleiche von durchgeführten klinischen Mikrobiomstudien stets Verzerrungen mit sich bringen, da Geographie, Lebensgewohnheiten und andere auf das Mikrobiom einflussnehmende Faktoren nicht gänzlich bei der Interpretation der unterschiedlichen Ergebnisse berücksichtigt werden können (Z.-J. Chen et al., 2021). Daher ist es wichtig, auf Vergleichbarkeit von Prozessabläufen der Mikrobiotaanalysen wie Probeentnahmeort, Lieferketten, Primerauswahl und Analyseverfahren zu achten (Boertien et al., 2019; Z.-J. Chen et al., 2021).

Zunächst wird die Alpha-Diversität betrachtet. Ob die Alpha-Diversität ein geeigneter Parameter zur Untersuchung von Unterschieden in der Mikrobiotazusammensetzung bei IPS-Patient:innen ist, ist nach wie vor umstritten (Z. Li et al., 2022; Plassais et al., 2021). In dieser spezifischen Kohorte konnte in der Gesamtheit aller Alpha-Diversitätsmetriken kein signifikanter Unterschied zwischen IPS-Patient:innen und nND-Patient:innen gefunden werden. Einzig wiesen die Stuhlproben eine signifikant verringerte Gleichmäßigkeit der Verteilung auf, die sich nicht durch andere einflussnehmende Faktoren erklären ließ. Es ist überraschend, dass sich in dieser inhomogenen, geriatrischen, multimorbiden Kohorte ein solcher Diversitätsunterschied überhaupt feststellen ließ. Das könnte für einen partiellen Diversitätsunterschied der Gleichmäßigkeit der Verteilung der Mikrobiota für die Subgruppe IPS vs. nND der Stuhlproben sprechen. Dies wird anhand der vorliegenden Daten insofern wahrscheinlicher, als das *Shannon-* und *Simpson-Index*, welche neben der Abundanz auch die Gleichmäßigkeit berücksichtigen, jeweils diesem statistischen Trend folgten (Cryan et al., 2020).

Da auch die Beta-Diversität keinen signifikanten Unterschied sowohl bei den Stuhl- als auch bei den Speichelproben feststellen konnte, unterstützt dies die Aussage, dass in dieser Kohorte von keinem generellen Diversitätsunterschied zwischen den Gruppen IPS vs. nND ausgegangen werden kann (Qian et al., 2020).

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Abundanz-Analysen in den wissenschaftlichen Kontext eingeordnet. Auch wenn die Aussagekraft der *Random-Forest-Analyse* schwer beeinträchtigt ist durch die niedrigen MDA-Werte und den

hohen OOB-Fehler vor allem in den Speichelproben, so sind einige Ergebnisse übereinstimmend mit bestehenden wissenschaftlichen Erkenntnissen.

Zunächst zur Familie der *Lachnospiraceae*, welche in den Stuhlproben der IPS-Patient:innen in verringerter Abundanz vorzufinden waren: *Lachnospiraceae* sind obligat anaerobe Bakterien und gehören zum Kernmikrobiom des Darms. Mit steigendem Alter nimmt die relative Häufigkeit der *Lachnospiraceae* im Darmmikrobiom zu (Vacca et al., 2020). Sie erfüllen eine wichtige Rolle in Fermentationsprozessen des Darmmikrobioms (Vacca et al., 2020). Außerdem besitzen *Lachnospiraceae* die Fähigkeit, Kohlenhydrate zu verstoffwechseln und Stoffe wie Acetat und Laktat zu Butyrat und Wasserstoff zu fermentieren (Torres-Miranda et al., 2022). Wie bereits zuvor erwähnt, spielen SCFAs wie Butyrat, Acetat und Propionat eine große Rolle im Darmmikrobiom und insbesondere auch für die humane Gesundheit (Engels et al., 2016). *Lachnospiraceae* gelten als eine der Hauptproduzenten von SCFAs und sind essentielle Mikrobiota für das metabolische Gleichgewicht im Darm (Torres-Miranda et al., 2022; Vacca et al., 2020). Ungleichgewicht in der Abundanz von *Lachnospiraceae* konnte in zahlreichen Studien mit metabolischen Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes Mellitus Typ 1 und 2, Lebererkrankungen, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, aber auch neurodegenerativen Erkrankungen wie IPS in Verbindung gebracht werden (Vacca et al., 2020).

In mehreren Metaanalysen konnte im Darmmikrobiom von IPS-Patient:innen eine Reduktion von SCFAs produzierenden *Lachnospiraceae* festgestellt werden (Proano et al., 2023; Romano et al., 2021; T. Shen et al., 2021). Dies stimmt mit dem Ergebnis dieser Studie überein. Es ist jedoch wichtig zu betonen, dass eine Reduktion von SCFAs nicht spezifisch für IPS ist, sondern generell im Rahmen entzündlicher Erkrankungen vorkommen kann (Wallen et al., 2020). Dies könnte auch dafür sprechen, dass eine Reduktion von SCFAs eher eine Folge aus der Erkrankung und weniger eine Ursache für die Entstehung von IPS ist (Hill-Burns et al., 2017).

Auch die Familie der *Erysipelotrichaceae* scheint mit IPS assoziiert zu sein. In dieser Studie war die Familie der *Erysipelotrichaceae* in der Darmmikrobiota von IPS-Patient:innen vermehrt vertreten. *Erysipelotrichaceae* sind gram-positive Bakterien und scheinen mit dem Auftreten metabolischer Störungen wie der nichtalkoholischen Steatohepatitis und dem Auftreten chronisch entzündlicher Darmerkrankungen assoziiert zu sein (Carter et al., 2021; Kaakoush, 2015). In einer Tierstudie an IPS-

Mäusen konnte eine erhöhte Abundanz an *Erysipelotrichaceae* im Zusammenhang mit einer fortschreitenden Symptomatik entdeckt werden (Lai et al., 2018). Auch im Mikrobiom von IPS-Patient:innen konnte die Familie der *Erysipelotrichaceae* vermehrt nachgewiesen werden (C. Li et al., 2019).

Im Folgenden wird die Familie der *Lactobacillaceae* im Zusammenhang mit IPS betrachtet. Dies ist eine weitere bakterielle Familie, bei der in zahlreichen Metaanalysen von einer starken Assoziation mit IPS ausgegangen wird (Boertien et al., 2019; Z.-J. Chen et al., 2021; Haikal et al., 2019; Hill-Burns et al., 2017; Z. Li et al., 2023; Romano et al., 2021). *Lactobacillaceae* waren in dieser spezifischen Kohorte bei den IPS-Patient:innen sowohl in den Stuhl- als auch in den Speichelproben von höherer Abundanz. In dieser Studie kann vor allem von einer signifikanten Erhöhung der *Lactobacillaceae* bei IPS-Patient:innen im Darmmikrobiom ausgegangen werden, da diese sowohl bei der *Random-Forest-Analysis* aufgeführt, als auch bei der DESeq2-Analyse als einzige Familie signifikant erhöht waren.

Die Familie der *Lactobacillaceae* gehört zum Phylum der *Firmicutes* und bildet die Familie der Milchsäurebakterien. Diese umfassen die Gattung *Lactobacillus*. Milchsäurebakterien sind gram-positive, nicht bewegliche, nicht-sporenbildende Mikroorganismen, welche fakultativ anaerob beziehungsweise aerotolerant und Katalase negativ sind (Engelhardt, 2018). Sie sind in der Lage, Kohlenhydrate in Milchsäure sowie Ethanol und Acetat zu fermentieren (Engelhardt, 2018). Sie kommen in bis zu 5000 verschiedenen Lebensmitteln vor und sind Bestandteil von den meisten Probiotika (Engelhardt, 2018).

Die Familie der *Lactobacillaceae* und insbesondere die Gattung *Lactobacillus* konnte in zahlreichen Studien in den Stuhlproben von IPS-Patient:innen in einer vermehrten Abundanz festgestellt werden. Milchsäurebakterien gelten allgemein als der menschlichen Gesundheit dienliche Bakterien (Z. Li et al., 2023). So konnte in Studien nachgewiesen werden, dass nach Einnahme von Probiotika mit Milchsäurebakterien Symptome des IPS, wie motorische Funktionen und Verstopfung verbessert werden konnten (Fang, 2019). Dies steht in gewisser Weise im Widerspruch zu den erhöhten *Lactobacillaceae* Abundanzen in den Stuhlproben von IPS-Patient:innen. Hierfür gibt es unterschiedliche Erklärungsansätze. Zum einen fanden Studien heraus, dass die *Lactobacillaceae* Abundanz mit erhöhten Entzündungsmarkern wie Neutrophilenanteil, Monozytenanteil und Monozytenanzahl im Blut signifikant korrelierten. Außerdem spielen *Lactobacillaceae* neben der Fermentation von

Kohlenhydraten auch eine Rolle in der Verstoffwechslung von COMT-Hemmern, welche in der IPS-Therapie häufig eingesetzt werden (Barichella et al., 2019; Hill-Burns et al., 2017; Weis et al., 2019).

Ähnlich wie bei der Theorie um die SCFAs ist hier noch nicht klar, ob die erhöhte Abundanz von *Lactobacillaceae* durch proinflammatorische Wirkung im Gastrointestinaltrakt Einfluss auf die Entstehung von IPS hat oder Ergebnis der Einnahme von IPS-Medikamenten wie COMT-Hemmern ist (Z. Li et al., 2023).

Zahlreiche Studien beschäftigen sich mit erhöhten *Lactobacillaceae*-Abundanzen im Darmmikrobiom. Weniger ist jedoch über erhöhte Abundanzen von *Lactobacillaceae* in Speichelproben aus der Mundhöhle bekannt. Während einige Studien keinen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen IPS und mikrobiellen Veränderungen der Mundhöhle feststellen konnten (Yay et al., 2024), so fanden andere Studien ähnliche mikrobielle Veränderungen in den Speichelproben wie in den Stuhlproben von IPS-Patient:innen. In einer Studie von Jo et al. (2022) wurde das orale Mikrobiom einer gesunden Kontrollgruppe mit dem von IPS-Patient:innen verglichen. Hier konnte eine erhöhte Abundanz von *Lactobacillus* aus der Familie der *Lactobacillaceae* entdeckt werden, welche sich vor allem unter den besonders stark erkrankten IPS-Patient:innen zeigte. Bei der in dieser Arbeit untersuchten Kohorte handelt es sich ebenfalls um IPS-Patient:innen mit fortgeschrittenen Krankheitsverläufen, die sich stationär im Rahmen einer geriatrischen-Komplex-Behandlung eine Verbesserung der IPS-Symptomatik erhofften. Außerdem konnte in der Studie von Jo et al. (2022) ein Zusammenhang mit einer erhöhten *Lactobacillus*-Abundanz in der Mundhöhle und einer vermehrten Anzahl pathogener Mikrobiota im Darmmikrobiom festgestellt werden. Dies würde für eine Interaktion zwischen dem Mikrobiom der Mundhöhle und dem Mikrobiom des Darms sprechen. So könnte bei einer erhöhten Abundanz von *Lactobacillaceae* im oralen Mikrobiom die Mikrobiota in größerer Zahl in den Darm migrieren und einen Einfluss auf das dortige Mikrobiom haben. Auch wurde in Studien die Hypothese aufgestellt, dass *Lactobacillus reuterii* möglicherweise die Freisetzung von  $\alpha$ -Syn über den *Nervus vagus* ins gastrointestinale Nervensystem erhöhen könnte, indem es die Frequenz der Aktionspotentiale afferenter Nervenbündel erhöht (Jo et al., 2022). Auch in anderen Studien konnten vermehrte Abundanzen von *Lactobacillus reuterii* in IPS-Patient:innen beobachtet werden, was jeweils mit einer Verschlechterung der motorischen Leistungsfähigkeit von IPS-Patient:innen korrelierte (Mihaila et al., 2019). Wie genau *Lactobacillaceae* einen Einfluss auf die Gesundheit und Lebensqualität von

IPS-Patient:innen haben, bleibt jedoch bislang unklar. Es bedarf weiterer Studien, um die komplexen Zusammenhänge von oralem und gastrointestinalem Mikrobiom auf die Entstehung beziehungsweise Verschlechterung von IPS aufzuklären. Fest steht, dass eine vermehrte Abundanz der Mikrobiota aus der Familie der *Lactobacillaceae* in zahlreichen Studien, so auch in dieser, mit IPS assoziiert waren und eine Basis für weitere Studien bieten kann.

Für eine vermehrtes Vorkommen von *Leptotrichiaceae* in Speichelproben von IPS-Patient:innen gibt es bisher keine wissenschaftlichen Erkenntnisse. Auch für eine erhöhte Abundanz der *Family\_XI* aus der Ordnung *Clostridiales* wurden kaum Studien mit diesem Ergebnis veröffentlicht. Eine Studie zeigte eine Assoziation von einer vermehrten Abundanz von *Family\_XI* und der Einnahme von Levodopa oder dem COMT-Hemmer Entacapon (Fan et al., 2022).

In der DESeq2-Analyse zeigte sich noch die Familie der *Enterobacteriaceae* in den Speichelproben der IPS-Patient:innen von einer signifikant höheren Abundanz.

*Enterobacteriaceae* sind eine Familie aus dem Phylum *Proteobacteria* und vor allem im Darmmikrobiom vorzufinden. Es handelt sich um gram-negative, fakultativ anaerobe Bakterien, die zum Teil pathogene Mikrobiota wie *Salmonellen*, *Shigellen*, *Klebsiellen* und *Escherichia* umfasst (Brenner & Farmer, 2015). Es gibt zahlreiche Studien, die ein erhöhtes Vorkommen von *Enterobacteriaceae* in der Darmmikrobiota von IPS-Patient:innen beschreiben (Z.-J. Chen et al., 2021; L. Shen, 2020; Unger et al., 2020). Einige Studien gehen von einer Korrelation der Schwere der motorischen Symptomatik mit der Abundanz von *Enterobacteriaceae* aus (Z.-J. Chen et al., 2021). Es wird angenommen, dass pathogene Mikrobiota aus der Familie der *Enterobacteriaceae* durch vermehrte Expression von LPS die Freisetzung von Entzündungsmediatoren verursachen, welche über die BBB hinweg Entzündungsreaktionen im ZNS und damit Neurodegeneration fördern (Caputi & Giron, 2018; Z.-J. Chen et al., 2021; V. M. Choi et al., 2016; Unger et al., 2020). Ähnlich wie bei den *Lactobacillaceae* scheint eine Assoziation zwischen erhöhten *Enterobacteriaceae* Abundanzen und Medikamenten der IPS-Therapie zu bestehen. Auch hier scheinen COMT-Hemmer eine zentrale Rolle zu spielen (Z.-J. Chen et al., 2021; Scheperjans et al., 2015). Somit scheinen im Darmmikrobiom *Enterobacteriaceae* aus ungeklärten und unterschiedlichen Gründen mit IPS assoziiert zu sein. In dieser Studie wurde jedoch eine in der DESeq2-Analyse signifikant erhöhte Abundanz von *Enterobacteriaceae* im Mikrobiom der Mundhöhle beobachtet. Eine

solche Erhöhung von *Enterobacteriaceae* im Mikrobiom der Mundhöhle ließ sich in anderen Studien nicht wiederfinden. Ein Erklärungsansatz für diese vermehrte Abundanz von *Enterobacteriaceae* in der Mundhöhle von IPS-Patient:innen könnte eine geringe Hygiene von IPS-Patient:innen sein. Aufgrund motorischer und kognitiver Einschränkungen sind suffiziente hygienische Maßnahmen wie Händewaschen oder Zahnreinigung von IPS-Patient:innen erschwert und könnten ein vermehrtes Vorkommen von fäkalen Mikrobiota wie *Enterobacteriaceae* im oralen Mikrobiom begünstigen (Batista, 2015; Schwarz et al., 2006).

## 4.4 Allgemeine Limitationen

Zunächst handelt es sich um eine retrospektive Studie, welche kein eigens für die Beantwortung der hier behandelten Hypothesen angelegtes Studienformat besitzt. Auf die sich daraus ergebenden Limitationen wird im Folgenden eingegangen.

Die Auswahl der *Biobanking* Patient:innen hing neben den erwähnten allgemeinen Ein- und Ausschlusskriterien der ComOn-Studie maßgeblich von der Motivation der Patient:innen ab. Da das ComOn-Basisassessment bereits eine große zeitliche, körperliche und geistige Belastung für die Patient:innen darstellte, wollten einige Patient:innen nicht mehr am zusätzlichen *Biobanking* teilnehmen. Neben der Motivation und Bereitschaft zur Teilnahme war auch eine gewisse kognitive Leistungsfähigkeit der Patient:innen notwendig. Da insbesondere für die Gewinnung der Stuhlproben eine zuverlässige Mitarbeit der Patient:innen von Nöten war, hat sich eine Kohorte, ohne definierte zusätzliche Ein- und Ausschlusskriterien gebildet.

Außerdem kam das strukturelle Problem hinzu, dass Stuhlproben, welche abends oder nachts abgegeben wurden, nicht vom Studienpersonal, sondern durch Pflegekräfte entnommen wurden, woraufhin die Stuhlproben zunächst für max. 24 Stunden bei Raumtemperatur zwischengelagert wurden. Somit kam es zu deutlichen Unterschieden in der Zwischenlagerungszeit der Stuhlproben, welcher nicht gesondert als beeinflussender Parameter erhoben wurde. Dies führte voraussichtlich zu Unterschieden in der Qualität der Stuhlproben. Außerdem konnte es vorkommen, dass nicht der erste auf Station abgeführte Stuhlgang verwendet wurde, da es gelegentlich vorkam, dass Patient:innen vergessen hatten den Stuhlgang auf dem eigens hierfür

bereitgestellten Toilettenstuhl zu verrichten oder aber vergaßen, anschließend Bescheid zu geben.

Auch bei den Speichelproben kam es zu spezifischen Limitationen. Die in dieser Arbeit als Speichelproben klassifizierten Proben sind im engeren Sinne keine reinen Speichelproben, da die Probengewinnung zum Teil auch mit Manipulation von Mundschleimhaut und Zahnplaques durch die Abstrichtupfer einherging. Dies führte zu einer gewissen Verzerrung und Durchmischung der Proben und zu Einschränkungen in der Beurteilbarkeit der Ergebnisse.

Aufgrund der großen Testbatterie des ComOn-Assessments konnte bei einigen Patient:innen ein Motivationsverlust verzeichnet werden. Insbesondere beim Ausfüllen der Fragebögen konnte somit nicht immer mit qualitativ gleichwertigen Angaben gerechnet werden, zumal einige Fragebögen von den Patient:innen selbst, also ohne Abfrage durch das Studienpersonal ausgefüllt wurden. In den eigens für das *Biobanking* konzipierten Fragebögen wurde unter anderem die Antibiotikaeinnahme in den letzten sechs Monaten abgefragt. Diese für die Beurteilung der Mikrobiomdaten durchaus relevante Einflussgröße wurde nicht objektiv nachverfolgt, sondern basierte auf den Erinnerungen und Aussagen der Patient:innen. Da dieser Faktor nicht auf äußerste Zuverlässigkeit überprüft wurde, wurde die Antibiotikaeinnahme in den letzten sechs Monaten in dieser Studie nicht als hartes Ausschlusskriterium, sondern als einflussnehmender Faktor in der Analyse der Daten berücksichtigt. Dies sollte dazu beitragen, eine noch stärkere Verzerrung der Ergebnisse durch fehlende oder eventuell falsche Angaben durch Patient:innen zu vermeiden.

Zudem sollte noch darauf hingewiesen werden, dass zur Erhebung des gesamten ComOn-Datensatzes zahlreiche unterschiedliche Untersucher:innen mitgearbeitet haben und trotz einer intensiven und standardisierten Schulung eine gewisse Variabilität in der Erhebung der Daten bestehen könnte.

Eine weitere bedeutende Limitation bildet die Stichprobengröße. Im Vergleich zu anderen Mikrobiomstudien war die Größe der untersuchten Subkohorten insbesondere bei der Analyse der Stuhlproben mit 20 IPS-Patient:innen und 33 nND-Patient:innen zum einen eher klein und zum anderen recht ungleich verteilt. Dies könnte zu Verzerrungen, vor allem in Hinblick auf Ausreißer, führen. Hinzu kam, da nicht von allen Patient:innen Angaben zu jedem Einflussfaktor gemacht wurden, konnten einige für das Mikrobiom relevante Einflussgrößen in den Analysen aufgrund unzureichender Stichprobengröße nicht verwendet werden. Hierzu zählt

beispielsweise der Nikotinkonsum. Da dieser einflussnehmende Faktor bei nicht einmal der Hälfte der Patient:innen vorlag, konnte er bei den Datenanalysen nicht berücksichtigt werden.

Über die in diese Arbeit einfließende Anzahl der Medikamente könnte in weiteren Studien auch qualitative Aspekte der unterschiedlichen Präparate wie beispielsweise Wirkstoff und Dosierung berücksichtigt werden. So gibt es bereits Studien, die unterschiedliche Auswirkungen der Einnahme bestimmter Medikamente auf das Mikrobiom beschreiben konnten. Neben den zuvor erwähnten, in dieser Kohorte häufig eingenommenen Medikamenten Levodopa und Carbidopa oder Benserazid scheinen auch weitere, häufig eingenommene Medikamente, wie beispielsweise Protonenpumpeninhibitoren, das Mikrobiom zu beeinflussen (Z.-J. Chen et al., 2021; Hill-Burns et al., 2017; Imhann et al., 2016).

Ein weiterer Aspekt, der in der Analyse der Daten nicht berücksichtigt wurde, ist die Ausprägung des IPS. Weder die Erkrankungsdauer noch das Hoehn & Yahr-Stadium oder andere Angaben zur Beurteilung der Schwere der Erkrankung wurden berücksichtigt. Aufgrund der stationären Behandlungsbedürftigkeit der Patient:innen ist in dieser Kohorte mit einer tendenziell schweren Beeinträchtigung durch IPS zu rechnen. Dies ist durch objektivierbare Parameter jedoch nicht bestätigt.

Einige der genannten Limitationen bieten gleichzeitig potentielle Ansätze für weitere, auf den Mikrobiomdaten dieser Studie aufbauende Fragestellungen. Wie bereits erwähnt, zeigten einige Studien einen Zusammenhang zwischen Ausprägung der Erkrankungsschwere und Ausmaß der Mikrobiomveränderung (Jo et al., 2022). Durch den umfassenden Datensatz der im Rahmen des ComOn-Assessments erhoben wurde, bestehen viele weitere Möglichkeiten zur Analyse und Interpretation der Mikrobiomveränderungen. Daten zur motorischen Funktion, Bioimpedanzmessungen, Blutproben oder kognitive Leistungsfähigkeit (Ergebnisse des MoCA) könnten in weiteren Studien auf Zusammenhänge mit den in dieser Studie entdeckten Mikrobiomveränderungen untersucht werden. Dies könnte weitere Erkenntnisse über das Mikrobiom als Einflussgröße auf die Ausprägung der Symptomatik von IPS in dieser spezifischen Kohorte und möglicherweise darüber hinaus liefern. Gerade auch Assoziationen zwischen leichter kognitiver Beeinträchtigung oder Demenz und mikrobiellen Veränderungen könnten in weiterführenden Studien mit dem vorhandenen Datensatz untersucht werden (Klee et al., 2024).

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Folgende potentiell Mikrobiom-assoziierte Faktoren stehen im Verdacht, einen Einfluss auf die Entstehung oder Progression des Idiopathischen Parkinson-Syndroms zu haben: Aszension von alpha-Synuklein-Aggregaten entlang des *Nervus vagus*, erhöhte intestinale Permeabilität, Einfluss der *short-chain-fatty-acids* auf physiologische Prozesse, proinflammatorische Reaktionen durch Lipopolysaccharide potentiell pathogener Mikrobiota, Mikrogliazell-Aktivierung im zentralen Nervensystem sowie direkte Synthese von neuroaktiven Substanzen durch bestimmte Mikrobiota.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob Diversitäts- und Abundanzunterschiede in der Mikrobiota von Stuhl- und Speichelproben von geriatrischen Patient:innen mit Idiopathischem Parkinson-Syndrom im Vergleich zu geriatrischen nicht-neurodegenerativen Patient:innen zu finden sind. Die untersuchte Kohorte setzte sich aus norddeutschen multimorbiden geriatrischen Patient:innen zusammen, welche stationär behandelt wurden.

Die Daten wurden im Rahmen der ComOn-Studie erfasst und retrospektiv analysiert. Aus 93 Studienteilnehmer:innen wurden Subgruppen zur Beantwortung der Fragestellungen gebildet. Hierfür wurden die Alpha- und Betadiversität bestimmt, sowie *Random-Forest*- und DESeq2/EdgeR-Analysen der Mikrobiota der Stuhl- und Speichelproben durchgeführt. Die Ergebnisse wurden auf Auswirkungen durch weitere das Mikrobiom beeinflussende Faktoren untersucht.

Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen die Annahme, dass eine Interaktion von Mikrobiom und Neurodegeneration beim Idiopathischen Parkinson-Syndrom über die Darm-Hirn-Achse bestehen könnte. Während im Hinblick auf die Mikrobiom-Diversität kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden konnte, so zeigte sich vor allem ein signifikant vermehrtes Vorkommen von *Lactobacillaceae* in der Darmmikrobiota von Patient:innen mit Idiopathischem Parkinson-Syndrom. Dies würde sowohl die Theorie unterstützen, dass es unter dem Einfluss von dopaminerger Parkinsonmedikation zu einer vermehrten Abundanz von *Lactobacillaceae* kommt, als auch, dass *Lactobacillaceae* direkt als ursächlicher Pathomechanismus die Entstehung von IPS beeinflussen könnten.

Zu weiteren in Studien detektierten Mikrobiomveränderungen beim Idiopathischem Parkinson-Syndrom zählen die Reduktion von *short-chain-fatty-acids* produzierenden *Lachnospiraceae* und ein vermehrtes Aufkommen von *Enterobacteriaceae*, welche

Lipopolysaccharide produzierende pathogene Mikrobiota umfassen. Diese Veränderungen konnten auch in der untersuchten Kohorte mit Idiopathischem Parkinson-Syndrom nachgewiesen werden. Außerdem legen die Ergebnisse dieser Studie nahe, dass eine Interaktion zwischen dem Mikrobiom der Mundhöhle und dem Mikrobiom des Darms besteht.

Während Alpha- und Beta-Diversität keine geeigneten Marker zur Untersuchung von Mikrobiomveränderungen mit Idiopathischem Parkinson-Syndrom zu sein scheinen, lassen sich zwischen der Kohorte mit Idiopathischem Parkinson-Syndrom und der Kontrollgruppe (nicht-neurodegenerative Patient:innen) Abundanz-Unterschiede finden, welche bereits in anderen Studien (in zumeist früheren Stadien des Idiopathischen Parkinson-Syndroms) beschrieben und diskutiert wurden. Dies spricht für einen spezifischen Zusammenhang zwischen Mikrobiomveränderungen über die verschiedenen Stadien der Erkrankung hinweg. Es sind weiterführende Untersuchungen insbesondere mit Einbindung von detaillierten klinischen Parametern notwendig, um die Mikrobiomzusammensetzung der untersuchten Kohorte noch besser analysieren und interpretieren zu können.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Adam, H., Gopinath, S. C. B., Md Arshad, M. K., Adam, T., Parmin, N. A., Husein, I., & Hashim, U. (2023). An update on pathogenesis and clinical scenario for Parkinson's disease: diagnosis and treatment. *3 Biotech, 13*(5), 142. <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03553-8>
- Ascherio, A., & Schwarzschild, M. A. (2016). The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *The Lancet Neurology, 15*(12), 1257–1272. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30230-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30230-7)
- Bang, C., & Heinzl, S. (2023). Zusammenhänge zwischen Mikrobiom und Neurodegeneration. *Der Nervenarzt, 94*(10), 885–891. <https://doi.org/10.1007/s00115-023-01537-w>
- Barichella, M., Severgnini, M., Cilia, R., Cassani, E., Bolliri, C., Caronni, S., Ferri, V., Canello, R., Ceccarani, C., Faierman, S., Pinelli, G., De Bellis, G., Zecca, L., Cereda, E., Consolandi, C., & Pezzoli, G. (2019). Unraveling gut microbiota in Parkinson's disease and atypical parkinsonism. *Movement Disorders, 34*(3), 396–405. <https://doi.org/10.1002/mds.27581>
- Batista, L. M. , P. de O. M. T. , M. W. B. , & B. P. L. (2015). Oral hygiene in patients with Parkinson's disease. *RJ Med J, 98*(11), 7–35.
- Bäuerl, C., Selma-Royo, M., Mera-Balseca, A. G., Collado, M. C., & Perez-Martinez, G. (2018). Gut Microbiota in Elderly's Health. In *Handbook of Immunosenescence* (S. 1–32). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-64597-1\\_163-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-64597-1_163-1)
- Bencsik, A., Muselli, L., Leboindre, M., Lakhdar, L., & Baron, T. (2014). Early and Persistent Expression of Phosphorylated  $\alpha$ -Synuclein in the Enteric Nervous System of A53T Mutant Human  $\alpha$ -Synuclein Transgenic Mice. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 73*(12), 1144–1151. <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000137>
- Berg, D., Postuma, R. B., Adler, C. H., Bloem, B. R., Chan, P., Dubois, B., Gasser, T., Goetz, C. G., Halliday, G., Joseph, L., Lang, A. E., Liepelt-Scarfone, I., Litvan, I., Marek, K., Obeso, J., Oertel, W., Olanow, C. W., Poewe, W., Stern, M., & Deuschl, G. (2015). MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Movement Disorders, 30*(12), 1600–1611. <https://doi.org/10.1002/mds.26431>
- Boertien, J. M., Pereira, P. A. B., Aho, V. T. E., & Scheperjans, F. (2019). Increasing Comparability and Utility of Gut Microbiome Studies in Parkinson's Disease: A Systematic Review. *Journal of Parkinson's Disease, 9*(s2), S297–S312. <https://doi.org/10.3233/JPD-191711>

- Braak, H., de Vos, R. A. I., Bohl, J., & Del Tredici, K. (2006). Gastric  $\alpha$ -synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neuroscience Letters*, *396*(1), 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.11.012>
- Braak, H., Del Tredici, K., Bratzke, H., Hamm-Clement, J., Sandmann-Keil, D., & Rüb, U. (2002). Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *Journal of Neurology*, *249*(0), 1–1. <https://doi.org/10.1007/s00415-002-1301-4>
- Braak, H., Ghebremedhin, E., Rüb, U., Bratzke, H., & Del Tredici, K. (2004). Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell and Tissue Research*, *318*(1), 121–134. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0956-9>
- Braak, H., Tredici, K. Del, Rüb, U., de Vos, R. A. I., Jansen Steur, E. N. H., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, *24*(2), 197–211. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00065-9](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00065-9)
- Breid, S., Bernis, M. E., Babila, J. T., Garza, M. C., Wille, H., & Tamgüney, G. (2016). Neuroinvasion of  $\alpha$ -Synuclein Prionoids after Intraperitoneal and Intraglossal Inoculation. *Journal of Virology*, *90*(20), 9182–9193. <https://doi.org/10.1128/JVI.01399-16>
- Breiman, L. (2001). Random Forests. Machine Learning. In *Machine Learning* (Bd. 45, S. 5–32). <https://doi.org/10.1023/A:1010933404324>
- Brenner, D. J., & Farmer, J. J. (2015). Enterobacteriaceae. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (S. 1–24). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00222>
- Burke, R. E., Dauer, W. T., & Vonsattel, J. P. G. (2008). A critical evaluation of the Braak staging scheme for Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, *64*(5), 485–491. <https://doi.org/10.1002/ana.21541>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, *13*(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S. M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J. A., Smith, G., & Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME journal*, *6*(8), 1621–1624. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>

Caputi, V., & Giron, M. (2018). Microbiome-Gut-Brain Axis and Toll-Like Receptors in Parkinson's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(6), 1689. <https://doi.org/10.3390/ijms19061689>

Carter, J. K., Bhattacharya, D., Borgerding, J. N., Fiel, M. I., Faith, J. J., & Friedman, S. L. (2021). Modeling dysbiosis of human NASH in mice: Loss of gut microbiome diversity and overgrowth of Erysipelotrichales. *PLOS ONE*, *16*(1), e0244763. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244763>

Cersosimo, M. G. (2015). Gastrointestinal Biopsies for the Diagnosis of Alpha-Synuclein Pathology in Parkinson's Disease. *Gastroenterology Research and Practice*, *2015*, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2015/476041>

Chao, A. (1984). Nonparametric estimation of the number of classes in a population. In *Nonparametric estimation of the number of classes in a population*. (S. 265–270). Scand. J. Stat. 11.

Chao, A., & Chiu, C. (2016). Species Richness: Estimation and Comparison. In *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online* (S. 1–26). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat03432.pub2>

Chen, Y., Xu, J., & Chen, Y. (2021). Regulation of Neurotransmitters by the Gut Microbiota and Effects on Cognition in Neurological Disorders. *Nutrients*, *13*(6), 2099. <https://doi.org/10.3390/nu13062099>

Chen, Z.-J., Liang, C.-Y., Yang, L.-Q., Ren, S.-M., Xia, Y.-M., Cui, L., Li, X.-F., & Gao, B.-L. (2021). Association of Parkinson's Disease With Microbes and Microbiological Therapy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.619354>

Chiang, H.-L., & Lin, C.-H. (2019). Altered Gut Microbiome and Intestinal Pathology in Parkinson's Disease. *Journal of Movement Disorders*, *12*(2), 67–83. <https://doi.org/10.14802/jmd.18067>

Choi, J. G., Kim, N., Ju, I. G., Eo, H., Lim, S.-M., Jang, S.-E., Kim, D.-H., & Oh, M. S. (2018). Oral administration of *Proteus mirabilis* damages dopaminergic neurons and motor functions in mice. *Scientific Reports*, *8*(1), 1275. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19646-x>

Choi, V. M., Herrou, J., Hecht, A. L., Teoh, W. P., Turner, J. R., Crosson, S., & Wardenburg, J. B. (2016). Activation of *Bacteroides fragilis* toxin by a novel bacterial protease contributes to anaerobic sepsis in mice. *Nature Medicine*, *22*(5), 563–567. <https://doi.org/10.1038/nm.4077>

Chong, J., Liu, P., Zhou, G., & Xia, J. (2020). Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. *Nature Protocols*, *15*(3), 799–821. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0264-1>

- Clairembault, T., Leclair-Visonneau, L., Coron, E., Bourreille, A., Le Dily, S., Vavasseur, F., Heymann, M.-F., Neunlist, M., & Derkinderen, P. (2015). Structural alterations of the intestinal epithelial barrier in Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, *3*(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s40478-015-0196-0>
- Corrêa-Oliveira, R., Fachi, J. L., Vieira, A., Sato, F. T., & Vinolo, M. A. R. (2016). Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clinical & Translational Immunology*, *5*(4). <https://doi.org/10.1038/cti.2016.17>
- Cresci, G. A., & Bawden, E. (2015). Gut Microbiome. *Nutrition in Clinical Practice*, *30*(6), 734–746. <https://doi.org/10.1177/0884533615609899>
- Cryan, J. F., O'Riordan, K. J., Sandhu, K., Peterson, V., & Dinan, T. G. (2020). The gut microbiome in neurological disorders. *The Lancet Neurology*, *19*(2), 179–194. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30356-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30356-4)
- Dalile, B., Van Oudenhove, L., Vervliet, B., & Verbeke, K. (2019). The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *16*(8), 461–478. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0157-3>
- de Lartigue, G., de La Serre, C. B., & Raybould, H. E. (2011). Vagal afferent neurons in high fat diet-induced obesity; intestinal microflora, gut inflammation and cholecystokinin. *Physiology & Behavior*, *105*(1), 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.02.040>
- De Vadder, F., Grasset, E., Mannerås Holm, L., Karsenty, G., Macpherson, A. J., Olofsson, L. E., & Bäckhed, F. (2018). Gut microbiota regulates maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(25), 6458–6463. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720017115>
- Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.). (2023). Parkinson-Krankheit, S2k-Leitlinie. *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. [https://register.awmf.org/assets/guidelines/030-010I\\_Parkinson\\_Krankheit\\_2023-11\\_1.pdf](https://register.awmf.org/assets/guidelines/030-010I_Parkinson_Krankheit_2023-11_1.pdf)
- Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ) in der Helmholtz-Gemeinschaft. (2024). *Krebsinformationsdienst; Mikrobiom-Immuntherapie-Krebs*. <https://www.krebsinformationsdienst.de/fachkreise/nachrichten/2024/mikrobiom-immuntherapie-krebs.php>
- DiSabato, D. J., Quan, N., & Godbout, J. P. (2016). Neuroinflammation: the devil is in the details. *Journal of Neurochemistry*, *139*(S2), 136–153. <https://doi.org/10.1111/jnc.13607>

- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., & Relman, D. A. (2005). Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*, *308*(5728), 1635–1638. <https://doi.org/10.1126/science.1110591>
- Elbaz, A., Bower, J. H., Maraganore, D. M., McDonnell, S. K., Peterson, B. J., Ahlskog, J. E., Schaid, D. J., & Rocca, W. A. (2002). Risk tables for parkinsonism and Parkinson's disease. *Journal of Clinical Epidemiology*, *55*(1), 25–31. [https://doi.org/10.1016/S0895-4356\(01\)00425-5](https://doi.org/10.1016/S0895-4356(01)00425-5)
- Engelhardt, H. (2018). Lactobacillus – Evolution und Kulturgeschichte. *Biologie in unserer Zeit*, *48*(6), 400–406. <https://doi.org/10.1002/biuz.201810663>
- Engels, C., Ruscheweyh, H.-J., Beerenwinkel, N., Lacroix, C., & Schwab, C. (2016). The Common Gut Microbe *Eubacterium hallii* also Contributes to Intestinal Propionate Formation. *Frontiers in Microbiology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00713>
- Erny, D., Hrabě de Angelis, A. L., Jaitin, D., Wieghofer, P., Staszewski, O., David, E., Keren-Shaul, H., Mhlahkoiv, T., Jakobshagen, K., Buch, T., Schwierzeck, V., Utermöhlen, O., Chun, E., Garrett, W. S., McCoy, K. D., Diefenbach, A., Staeheli, P., Stecher, B., Amit, I., & Prinz, M. (2015). Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nature Neuroscience*, *18*(7), 965–977. <https://doi.org/10.1038/nn.4030>
- Fan, H., Sheng, S., & Zhang, F. (2022). New hope for Parkinson's disease treatment: Targeting gut microbiota. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, *28*(11), 1675–1688. <https://doi.org/10.1111/cns.13916>
- Fang, X. (2019). Microbial treatment: the potential application for Parkinson's disease. *Neurological Sciences*, *40*(1), 51–58. <https://doi.org/10.1007/s10072-018-3641-6>
- Forsythe, P., Bienenstock, J., & Kunze, W. A. (2014). *Vagal Pathways for Microbiome-Brain-Gut Axis Communication* (S. 115–133). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_5)
- Fox, G. E., Magrum, L. J., Balch, W. E., Wolfe, R. S., & Woese, C. R. (1977). Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *74*(10), 4537–4541. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.10.4537>
- Fusco, W., Lorenzo, M. B., Cintoni, M., Porcari, S., Rinninella, E., Kaitsas, F., Lener, E., Mele, M. C., Gasbarrini, A., Collado, M. C., Cammarota, G., & Ianiro, G. (2023). Short-Chain Fatty-Acid-Producing Bacteria: Key Components of the Human Gut Microbiota. *Nutrients*, *15*(9), 2211. <https://doi.org/10.3390/nu15092211>

- Gao, Y., Lu, Y., Liang, X., Zhao, M., Yu, X., Fu, H., & Yang, W. (2024). CD4+ T-Cell Senescence in Neurodegenerative Disease: Pathogenesis and Potential Therapeutic Targets. *Cells*, *13*(9), 749. <https://doi.org/10.3390/cells13090749>
- 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>
- Haikal, C., Chen, Q.-Q., & Li, J.-Y. (2019). Microbiome changes: an indicator of Parkinson's disease? *Translational Neurodegeneration*, *8*(1), 38. <https://doi.org/10.1186/s40035-019-0175-7>
- Hasegawa, S., Goto, S., Tsuji, H., Okuno, T., Asahara, T., Nomoto, K., Shibata, A., Fujisawa, Y., Minato, T., Okamoto, A., Ohno, K., & Hirayama, M. (2015). Intestinal Dysbiosis and Lowered Serum Lipopolysaccharide-Binding Protein in Parkinson's Disease. *PLOS ONE*, *10*(11), e0142164. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142164>
- Heinzel, S., Aho, V. T. E., Suenkel, U., von Thaler, A., Schulte, C., Deuschle, C., Paulin, L., Hantunen, S., Brockmann, K., Eschweiler, G. W., Maetzler, W., Berg, D., Auvinen, P., & Scheperjans, F. (2021). Gut Microbiome Signatures of Risk and Prodromal Markers of Parkinson Disease. *Annals of Neurology*, *90*(3). <https://doi.org/10.1002/ana.26128>
- Heinzel, S., Berg, D., Binder, S., Ebersbach, G., Hickstein, L., Herbst, H., Lorrain, M., Wellach, I., Maetzler, W., Petersen, G., Schmedt, N., Volkmann, J., Woitalla, D., & Amelung, V. (2018). Do We Need to Rethink the Epidemiology and Healthcare Utilization of Parkinson's Disease in Germany? *Frontiers in Neurology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00500>
- Hill-Burns, E. M., Debelius, J. W., Morton, J. T., Wissemann, W. T., Lewis, M. R., Wallen, Z. D., Peddada, S. D., Factor, S. A., Molho, E., Zabetian, C. P., Knight, R., & Payami, H. (2017). Parkinson's disease and Parkinson's disease medications have distinct signatures of the gut microbiome. *Movement Disorders*, *32*(5), 739–749. <https://doi.org/10.1002/mds.26942>
- Holmqvist, S., Chutna, O., Bousset, L., Aldrin-Kirk, P., Li, W., Björklund, T., Wang, Z.-Y., Roybon, L., Melki, R., & Li, J.-Y. (2014). Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats. *Acta Neuropathologica*, *128*(6), 805–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1343-6>

- Hughes, J. B., Hellmann, J. J., Ricketts, T. H., & Bohannon, B. J. M. (2001). Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(10), 4399–4406. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4399-4406.2001>
- Hüllemann, P., & Baron, R. (2019). Schmerzen. In *Neurogeriatrie* (S. 271–292). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-57358-7\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-662-57358-7_16)
- Huttenhower, C. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, *486*(7402), 207–214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>
- Imhann, F., Bonder, M. J., Vich Vila, A., Fu, J., Mujagic, Z., Vork, L., Tigchelaar, E. F., Jankipersadsing, S. A., Cenit, M. C., Harmsen, H. J. M., Dijkstra, G., Franke, L., Xavier, R. J., Jonkers, D., Wijmenga, C., Weersma, R. K., & Zhernakova, A. (2016). Proton pump inhibitors affect the gut microbiome. *Gut*, *65*(5), 740–748. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310376>
- Jo, S., Kang, W., Hwang, Y. S., Lee, S. H., Park, K. W., Kim, M. S., Lee, H., Yoon, H. J., Park, Y. K., Chalita, M., Lee, J. H., Sung, H., Lee, J.-Y., Bae, J.-W., & Chung, S. J. (2022). Oral and gut dysbiosis leads to functional alterations in Parkinson’s disease. *npj Parkinson’s Disease*, *8*(1), 87. <https://doi.org/10.1038/s41531-022-00351-6>
- Kaakoush, N. O. (2015). Insights into the Role of Erysipelotrichaceae in the Human Host. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00084>
- Kaelberer, M. M., Buchanan, K. L., Klein, M. E., Barth, B. B., Montoya, M. M., Shen, X., & Bohórquez, D. V. (2018). A gut-brain neural circuit for nutrient sensory transduction. *Science*, *361*(6408). <https://doi.org/10.1126/science.aat5236>
- Kelly, L. P., Carvey, P. M., Keshavarzian, A., Shannon, K. M., Shaikh, M., Bakay, R. A. E., & Kordower, J. H. (2014). Progression of intestinal permeability changes and alpha-synuclein expression in a mouse model of Parkinson’s disease. *Movement Disorders*, *29*(8), 999–1009. <https://doi.org/10.1002/mds.25736>
- Kers, J. G., & Saccenti, E. (2022). The Power of Microbiome Studies: Some Considerations on Which Alpha and Beta Metrics to Use and How to Report Results. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.796025>
- Keshavarzian, A., Green, S. J., Engen, P. A., Voigt, R. M., Naqib, A., Forsyth, C. B., Mutlu, E., & Shannon, K. M. (2015). Colonic bacterial composition in Parkinson’s disease. *Movement Disorders*, *30*(10), 1351–1360. <https://doi.org/10.1002/mds.26307>
- Killinger, B. A., Madaj, Z., Sikora, J. W., Rey, N., Haas, A. J., Vepa, Y., Lindqvist, D., Chen, H., Thomas, P. M., Brundin, P., Brundin, L., & Labrie, V. (2018). The

- vermiform appendix impacts the risk of developing Parkinson's disease. *Science Translational Medicine*, 10(465). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aar5280>
- Kim, B.-R., Shin, J., Guevarra, R. B., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K.-H., Lee, J.-H., Kim, H. B., & Isaacson, R. E. (2017). Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(12), 2089–2093. <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>
- Kim, C., Lv, G., Lee, J. S., Jung, B. C., Masuda-Suzukake, M., Hong, C.-S., Valera, E., Lee, H.-J., Paik, S. R., Hasegawa, M., Masliah, E., Eliezer, D., & Lee, S.-J. (2016). Exposure to bacterial endotoxin generates a distinct strain of  $\alpha$ -synuclein fibril. *Scientific Reports*, 6(1), 30891. <https://doi.org/10.1038/srep30891>
- Kim, S., & Jazwinski, S. M. (2018). The Gut Microbiota and Healthy Aging: A Mini-Review. *Gerontology*, 64(6), 513–520. <https://doi.org/10.1159/000490615>
- Klee, M., Aho, V. T. E., May, P., Heintz-Buschart, A., Landoulsi, Z., Jónsdóttir, S. R., Pauly, C., Pavelka, L., Delacour, L., Kaysen, A., Krüger, R., Wilmes, P., & Leist, A. K. (2024). Education as Risk Factor of Mild Cognitive Impairment: The Link to the Gut Microbiome. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*. <https://doi.org/10.14283/jpad.2024.19>
- Kohn, A. J. (1977). Pielou, E. C. 1975. Ecological diversity. John Wiley & Sons, New York, viii + 165 p. \$14.95. *Limnology and Oceanography*, 22(1), 174–174. <https://doi.org/10.4319/lo.1977.22.1.0174b>
- Lai, F., Jiang, R., Xie, W., Liu, X., Tang, Y., Xiao, H., Gao, J., Jia, Y., & Bai, Q. (2018). Intestinal Pathology and Gut Microbiota Alterations in a Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) Mouse Model of Parkinson's Disease. *Neurochemical Research*, 43(10), 1986–1999. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2620-x>
- Lamprey, R. N. L., Chaulagain, B., Trivedi, R., Gothwal, A., Layek, B., & Singh, J. (2022). A Review of the Common Neurodegenerative Disorders: Current Therapeutic Approaches and the Potential Role of Nanotherapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1851. <https://doi.org/10.3390/ijms23031851>
- Lapage, S., Sneath, P., Lessel, E., Skerman, V., Seeliger, H., & Clark, W. (1992). *International Code of Nomenclature of Bacteria* (Nummer 10). ASM Press. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8817/>
- Lemos, L. N., Fulthorpe, R. R., Triplett, E. W., & Roesch, L. F. W. (2011). Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. *Journal of Microbiological Methods*, 86(1), 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.03.014>
- Li, C., Cui, L., Yang, Y., Miao, J., Zhao, X., Zhang, J., Cui, G., & Zhang, Y. (2019). Gut Microbiota Differs Between Parkinson's Disease Patients and Healthy Controls in

- Northeast China. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12.  
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00171>
- Li, Z., Liang, H., Hu, Y., Lu, L., Zheng, C., Fan, Y., Wu, B., Zou, T., Luo, X., Zhang, X., Zeng, Y., Liu, Z., Zhou, Z., Yue, Z., Ren, Y., Li, Z., Su, Q., & Xu, P. (2023). Gut bacterial profiles in Parkinson's disease: A systematic review. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 29(1), 140–157. <https://doi.org/10.1111/cns.13990>
- Li, Z., Zhou, J., Liang, H., Ye, L., Lan, L., Lu, F., Wang, Q., Lei, T., Yang, X., Cui, P., & Huang, J. (2022). Differences in Alpha Diversity of Gut Microbiota in Neurological Diseases. *Frontiers in neuroscience*, 16.  
<https://doi.org/10.3389/FNINS.2022.879318>
- Lin, J.-C., Lin, C.-S., Hsu, C.-W., Lin, C.-L., & Kao, C.-H. (2016). Association Between Parkinson's Disease and Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 22(5), 1049–1055. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000735>
- Liu, B., Fang, F., Pedersen, N. L., Tillander, A., Ludvigsson, J. F., Ekbom, A., Svenningsson, P., Chen, H., & Wirdefeldt, K. (2017). Vagotomy and Parkinson disease. *Neurology*, 88(21), 1996–2002.  
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003961>
- 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), 550.  
<https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lübke, N., Ernst, F., & Meinck, M. (2015). Was ist Geriatrie? In *Kompendium Begutachtungswissen Geriatrie* (S. 1–5). Springer Berlin Heidelberg.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-662-44296-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-44296-8_1)
- Lyte, M. (2014). Microbial endocrinology. *Gut Microbes*, 5(3), 381–389.  
<https://doi.org/10.4161/gmic.28682>
- Mai, T., & Ketter, A.-K. (2022). Bewohner\*innen mit Parkinson-Syndrom in der stationären Altenhilfe. *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie*, 55(5), 399–405.  
<https://doi.org/10.1007/s00391-021-01874-y>
- Maki, K. A., Kazmi, N., Barb, J. J., & Ames, N. (2021). The Oral and Gut Bacterial Microbiomes: Similarities, Differences, and Connections. *Biological Research For Nursing*, 23(1), 7–20. <https://doi.org/10.1177/1099800420941606>
- McClellan, P. L., Parthasarathy, V., Faivre, E., & Hölscher, C. (2011). The Diabetes Drug Liraglutide Prevents Degenerative Processes in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience*, 31(17), 6587–6594.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0529-11.2011>

- Meneses, G., Bautista, M., Florentino, A., Díaz, G., Acero, G., Besedovsky, H., Meneses, D., Fleury, A., Del Rey, A., Gevorkian, G., Fragoso, G., & Sciutto, E. (2016). Electric stimulation of the vagus nerve reduced mouse neuroinflammation induced by lipopolysaccharide. *Journal of Inflammation*, *13*(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s12950-016-0140-5>
- Mihaila, D., Donegan, J., Barns, S., LaRocca, D., Du, Q., Zheng, D., Vidal, M., Neville, C., Uhlig, R., & Middleton, F. A. (2019). The oral microbiome of early stage Parkinson's disease and its relationship with functional measures of motor and non-motor function. *PLOS ONE*, *14*(6), e0218252. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218252>
- Mollenhauer, B., Locascio, J. J., Schulz-Schaeffer, W., Sixel-Döring, F., Trenkwalder, C., & Schlossmacher, M. G. (2011).  $\alpha$ -Synuclein and tau concentrations in cerebrospinal fluid of patients presenting with parkinsonism: a cohort study. *The Lancet Neurology*, *10*(3), 230–240. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70014-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70014-X)
- Mor, D. E., Daniels, M. J., & Ischiropoulos, H. (2019). The usual suspects, dopamine and alpha-synuclein, conspire to cause neurodegeneration. *Movement Disorders*, *34*(2), 167–179. <https://doi.org/10.1002/mds.27607>
- Morais, L. H., Schreiber, H. L., & Mazmanian, S. K. (2021). The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(4), 241–255. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00460-0>
- Neubart, R. (2018). *Repetitorium Geriatrie* (R. Neubart, Hrsg.). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-56479-0>
- Nishiwaki, H., Ito, M., Ishida, T., Hamaguchi, T., Maeda, T., Kashihara, K., Tsuboi, Y., Ueyama, J., Shimamura, T., Mori, H., Kurokawa, K., Katsuno, M., Hirayama, M., & Ohno, K. (2020). Meta-Analysis of Gut Dysbiosis in Parkinson's Disease. *Movement Disorders*, *35*(9), 1626–1635. <https://doi.org/10.1002/mds.28119>
- Nowossadeck, E. (2012). Demografische Alterung und Folgen für das Gesundheitswesen. *GBE kompakt. Zahlen und Trends aus der Gesundheitsberichterstattung des Bundes*, *3*(2).
- Nuzum, N. D., Loughman, A., Szymlek-Gay, E. A., Hendy, A., Teo, W.-P., & Macpherson, H. (2020). Gut microbiota differences between healthy older adults and individuals with Parkinson's disease: A systematic review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *112*, 227–241. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.02.003>
- Oksanen, Blanchet F. G., Kindt R., Legendre P., Minchin P. R., & O'Hara R. B., et al. (2022, Oktober 11). *R package: vegan*. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>

- Peng, X., Luo, Z., He, S., Zhang, L., & Li, Y. (2021). Blood-Brain Barrier Disruption by Lipopolysaccharide and Sepsis-Associated Encephalopathy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.768108>
- Plassais, J., Gbikpi-Benissan, G., Figarol, M., Scheperjans, F., Gorochov, G., Derkinderen, P., & Cervino, A. C. L. (2021). Gut microbiome alpha-diversity is not a marker of Parkinson's disease and multiple sclerosis. *Brain communications*, *3*(2). <https://doi.org/10.1093/BRAINCOMMS/FCAB113>
- Poretzky, R., Rodriguez-R, L. M., Luo, C., Tsementzi, D., & Konstantinidis, K. T. (2014). Strengths and Limitations of 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing in Revealing Temporal Microbial Community Dynamics. *PLoS ONE*, *9*(4), e93827. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093827>
- Postuma, R. B., Berg, D., Stern, M., Poewe, W., Olanow, C. W., Oertel, W., Obeso, J., Marek, K., Litvan, I., Lang, A. E., Halliday, G., Goetz, C. G., Gasser, T., Dubois, B., Chan, P., Bloem, B. R., Adler, C. H., & Deuschl, G. (2015). MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *30*(12), 1591–1601. <https://doi.org/10.1002/mds.26424>
- Proano, A. C., Viteri, J. A., Orozco, E. N., Calle, M. A., Costa, S. C., Reyes, D. V., German-Montenegro, M., Moncayo, D. F., Tobar, A. C., & Moncayo, J. A. (2023). Gut Microbiota and Its Repercussion in Parkinson's Disease: A Systematic Review in Occidental Patients. *Neurology International*, *15*(2), 750–763. <https://doi.org/10.3390/neurolint15020047>
- Przedborski, S. (2017). Neurodegeneration. In *Neuroimmune Pharmacology* (S. 345–354). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-44022-4\\_22](https://doi.org/10.1007/978-3-319-44022-4_22)
- 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>
- Rackaityte, E., & Lynch, S. V. (2020). The human microbiome in the 21st century. *Nature Communications*, *11*(1), 5256. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18983-8>
- Ranjan, R., Abhinay, A., & Mishra, M. (2018). Can oral microbial infections be a risk factor for neurodegeneration? A review of the literature. *Neurology India*, *66*(2), 344. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.227315>
- Rocca, W. A. (2018). The future burden of Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *33*(1), 8–9. <https://doi.org/10.1002/mds.27114>
- Romano, S., Savva, G. M., Bedarf, J. R., Charles, I. G., Hildebrand, F., & Narbad, A. (2021). Meta-analysis of the Parkinson's disease gut microbiome suggests

alterations linked to intestinal inflammation. *npj Parkinson's Disease*, 7(1), 27.  
<https://doi.org/10.1038/s41531-021-00156-z>

Rosario, D., Bidkhor, G., Lee, S., Bedarf, J., Hildebrand, F., Le Chatelier, E., Uhlen, M., Ehrlich, S. D., Proctor, G., Wüllner, U., Mardinoglu, A., & Shoaie, S. (2021). Systematic analysis of gut microbiome reveals the role of bacterial folate and homocysteine metabolism in Parkinson's disease. *Cell Reports*, 34(9).  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108807>

Sampson, T. R., Debelius, J. W., Thron, T., Janssen, S., Shastri, G. G., Ilhan, Z. E., Challis, C., Schretter, C. E., Rocha, S., Gradinaru, V., Chesselet, M.-F., Keshavarzian, A., Shannon, K. M., Krajmalnik-Brown, R., Wittung-Stafshede, P., Knight, R., & Mazmanian, S. K. (2016). Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell*, 167(6), 1469-1480.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.018>

Schäffer, E., & Berg, D. (2021). Frühzeichen der Parkinson-Erkrankung. *DGNeurologie*, 4(4), 295–303. <https://doi.org/10.1007/s42451-021-00352-4>

Schapira, A. H. V., Chaudhuri, K. R., & Jenner, P. (2017). Non-motor features of Parkinson disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(7), 435–450.  
<https://doi.org/10.1038/nrn.2017.62>

Scheperjans, F. (2015). Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Movement Disorders*, 30(3), 350–358.  
<https://doi.org/10.1002/mds.26069>

Scheperjans, F., Aho, V., Pereira, P. A. B., Koskinen, K., Paulin, L., Pekkonen, E., Haapaniemi, E., Kaakkola, S., Eerola-Rautio, J., Pohja, M., Kinnunen, E., Murros, K., & Auvinen, P. (2015). Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Movement Disorders*, 30(3), 350–358.  
<https://doi.org/10.1002/mds.26069>

Schwarz, J., Heimhilger, E., & Storch, A. (2006). Increased periodontal pathology in Parkinson's disease. *Journal of Neurology*, 253(5), 608–611.  
<https://doi.org/10.1007/s00415-006-0068-4>

Searles Nielsen, S., Bammler, T. K., Gallagher, L. G., Farin, F. M., Longstreth, W., Franklin, G. M., Swanson, P. D., & Checkoway, H. (2013). Genotype and age at Parkinson disease diagnosis. *International journal of molecular epidemiology and genetics*, 4(1), 61–69.

Sheikh Sajjadih, M.-R., Kuznetsova, L. V., & Bojenko, V. B. (2012). Dysbiosis in ukrainian children with irritable bowel syndrome affected by natural radiation. *Iranian journal of pediatrics*, 22(3), 364–368.

- Shen, L. (2020). Gut, oral and nasal microbiota and Parkinson's disease. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01313-4>
- Shen, T., Yue, Y., He, T., Huang, C., Qu, B., Lv, W., & Lai, H.-Y. (2021). The Association Between the Gut Microbiota and Parkinson's Disease, a Meta-Analysis. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.636545>
- Sorrells, S. F., Paredes, M. F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K. W., James, D., Mayer, S., Chang, J., Auguste, K. I., Chang, E. F., Gutierrez, A. J., Kriegstein, A. R., Mathern, G. W., Oldham, M. C., Huang, E. J., Garcia-Verdugo, J. M., Yang, Z., & Alvarez-Buylla, A. (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*, 555(7696), 377–381. <https://doi.org/10.1038/nature25975>
- Statistisches Bundesamt. (2022, Juli 27). Krankheitskosten pro Kopf gleichen sich zwischen Männern und Frauen weiter an. *Pressemitteilung: Nr. 316*.
- Statistisches Bundesamt. (2023, Juni 7). Demografischer Wandel: Anteil der Bevölkerung ab 65 Jahren von 1950 bis 2021 von 10 % auf 22 % gestiegen. *Pressemitteilung Nr. N033*.
- Svensson, E., Horváth-Puhó, E., Thomsen, R. W., Djurhuus, J. C., Pedersen, L., Borghammer, P., & Sørensen, H. T. (2015). Vagotomy and subsequent risk of Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 78(4), 522–529. <https://doi.org/10.1002/ana.24448>
- Synofzik, M., & Maetzler, W. (2015). Gelingendes Altern: Was können Neurologie und Geriatrie beitragen? *Der Nervenarzt*, 86(4), 475–480. <https://doi.org/10.1007/s00115-014-4194-4>
- Thukral, A. K. (2017). A review on measurement of Alpha diversity in biology. *Agricultural Research Journal*, 54(1), 1. <https://doi.org/10.5958/2395-146X.2017.00001.1>
- Torres-Miranda, A., Vega-Sagardía, M., & Garrido, D. (2022). Probiotics, Microbiome and the Concept of Cross-Feeding. In *Comprehensive Gut Microbiota* (S. 199–220). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819265-8.00055-3>
- Trautmann, T., Bang, C., Franke, A., Vincent, D., Reinshagen, K., & Boettcher, M. (2020). The Impact of Oral Sodium Chloride Supplementation on Thrive and the Intestinal Microbiome in Neonates With Small Bowel Ostomies: A Prospective Cohort Study. *Frontiers in Immunology*, 11, 1421. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01421>
- Troci, A., Zimmermann, O., Esser, D., Krampitz, P., May, S., Franke, A., Berg, D., Leyboldt, F., Stürner, K. H., & Bang, C. (2022). B-cell-depletion reverses dysbiosis

- of the microbiome in multiple sclerosis patients. *Scientific reports*, 12(1), 3728.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-07336-8>
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2007). The Human Microbiome Project. *Nature*, 449(7164), 804–810.  
<https://doi.org/10.1038/nature06244>
- Tysnes, O., Kenborg, L., Herlofson, K., Steding-Jessen, M., Horn, A., Olsen, J. H., & Reichmann, H. (2015). Does vagotomy reduce the risk of Parkinson's disease? *Annals of Neurology*, 78(6), 1011–1012. <https://doi.org/10.1002/ana.24531>
- Uemura, N., Yagi, H., Uemura, M. T., Hatanaka, Y., Yamakado, H., & Takahashi, R. (2018). Inoculation of  $\alpha$ -synuclein preformed fibrils into the mouse gastrointestinal tract induces Lewy body-like aggregates in the brainstem via the vagus nerve. *Molecular Neurodegeneration*, 13(1), 21.  
<https://doi.org/10.1186/s13024-018-0257-5>
- Ullah, H., Arbab, S., Tian, Y., Liu, C., Chen, Y., Qijie, L., Khan, M. I. U., Hassan, I. U., & Li, K. (2023). The gut microbiota–brain axis in neurological disorder. *Frontiers in Neuroscience*, 17. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1225875>
- Unger, M., Becker, A., Keller, A., Schäfer, K.-H., Schwiertz, A., & Oertel, W. H. (2020). Die Rolle des Darmmikrobioms beim idiopathischen Parkinson-Syndrom. *Der Nervenarzt*, 91(12), 1085–1095. <https://doi.org/10.1007/s00115-020-01011-x>
- Unger, M., Org Spiegel, J., Dillmann, K.-U., Grundmann, D., Philippeit, H., Bürmann, J., Faßbender, K., Schwiertz, A., & Sch, K.-H. (2016). *Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinson's disease and age-matched controls*. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.08.019>
- Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). Defining the human microbiome. *Nutrition Reviews*, 70, S38–S44. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x>
- Vacca, M., Celano, G., Calabrese, F. M., Portincasa, P., Gobbetti, M., & De Angelis, M. (2020). The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae. *Microorganisms*, 8(4), 573. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040573>
- Vellas, B., Guigoz, Y., Garry, P. J., Nourhashemi, F., Benaïm, D., Lauque, S., & Albaredo, J. L. (1999). The Mini Nutritional Assessment (MNA) and its use in grading the nutritional state of elderly patients. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 15(2), 116–122. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(98\)00171-3](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(98)00171-3)
- Verma, D., Garg, P. K., & Dubey, A. K. (2018). Insights into the human oral microbiome. *Archives of Microbiology*, 200(4), 525–540.  
<https://doi.org/10.1007/s00203-018-1505-3>

- Villumsen, M., Aznar, S., Pakkenberg, B., Jess, T., & Brudek, T. (2019). Inflammatory bowel disease increases the risk of Parkinson's disease: a Danish nationwide cohort study 1977–2014. *Gut*, *68*(1), 18–24. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-315666>
- von Campenhausen, S., Bornschein, B., Wick, R., Bötzel, K., Sampaio, C., Poewe, W., Oertel, W., Siebert, U., Berger, K., & Dodel, R. (2005). Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *European Neuropsychopharmacology*, *15*(4), 473–490. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2005.04.007>
- Wallen, Z. D., Appah, M., Dean, M. N., Sesler, C. L., Factor, S. A., Molho, E., Zabetian, C. P., Standaert, D. G., & Payami, H. (2020). Characterizing dysbiosis of gut microbiome in PD: evidence for overabundance of opportunistic pathogens. *npj Parkinson's Disease*, *6*(1), 11. <https://doi.org/10.1038/s41531-020-0112-6>
- Weimers, P., Halfvarson, J., Sachs, M. C., Saunders-Pullman, R., Ludvigsson, J. F., Peter, I., Burisch, J., & Olén, O. (2019). Inflammatory Bowel Disease and Parkinson's Disease: A Nationwide Swedish Cohort Study. *Inflammatory Bowel Diseases*, *25*(1), 111–123. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy190>
- Weis, S., Schwiertz, A., Unger, M. M., Becker, A., Faßbender, K., Ratering, S., Kohl, M., Schnell, S., Schäfer, K. H., & Egert, M. (2019). Effect of Parkinson's disease and related medications on the composition of the fecal bacterial microbiota. *NPJ Parkinson's disease*, *5*(1). <https://doi.org/10.1038/S41531-019-0100-X>
- Whittaker R.H. (1975). *Communities and Ecosystems* (2nd editoin). MacMillan Publishing Company, Inc.
- Willis, A. D. (2019). Rarefaction, Alpha Diversity, and Statistics. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02407>
- Yay, E., Yilmaz, M., Toygar, H., Balci, N., Alvarez Rivas, C., Bolluk Kılıç, B., Zirh, A., Paster, B. J., & Kantarci, A. (2024). Oral and gut microbial profiling in periodontitis and Parkinson's disease. *Journal of Oral Microbiology*, *16*(1). <https://doi.org/10.1080/20002297.2024.2331264>
- Zacharias, H. U., Kaleta, C., Cossais, F., Schaeffer, E., Berndt, H., Best, L., Dost, T., Glüsing, S., Groussin, M., Poyet, M., Heinzl, S., Bang, C., Siebert, L., Demetrowitsch, T., Leypoldt, F., Adelung, R., Bartsch, T., Bosy-Westphal, A., Schwarz, K., & Berg, D. (2022). Microbiome and Metabolome Insights into the Role of the Gastrointestinal–Brain Axis in Parkinson's and Alzheimer's Disease: Unveiling Potential Therapeutic Targets. *Metabolites*, *12*(12), 1222. <https://doi.org/10.3390/metabo12121222>

Zheng, D., Liwinski, T., & Elinav, E. (2020). Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Research, 30*(6), 492–506. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0332-7>

Zhou, S., Li, B., Deng, Y., Yi, J., Mao, G., Wang, R., Zeng, W., Liu, B., Wu, D., & Liu, F. (2023). Meta-analysis of the relations between gut microbiota and pathogens and Parkinson's disease. *Advances in Clinical and Experimental Medicine, 32*(6), 613–621. <https://doi.org/10.17219/acem/157193>

# 7 APPENDIX

## Anhang 1:

### *Einflussgrößen der Subgruppe: Stuhl- vs. Speichelproben*

| Deskriptive Statistik: Einflussgrößen der Gruppe Stuhl- vs. Speichelproben | Geschlecht | Alter  | BMI    | Alkoholkonsum | Alkoholkonsum im letzten halben Jahr | Antibiotikaeinnahme in den letzten 6 Monaten | Obstipation | Diarrhoen | Anzahl wöchentlicher Stuhlgänge | MNA: Sreening- Ergebnis | Anzahl eingenommener Medikamente |
|--|------------|--------|--------|---------------|--------------------------------------|--|-------------|-----------|---------------------------------|-------------------------|----------------------------------|
| <b>vorhanden</b>   | 72         | 71     | 50     | 58            | 35                                   | 35   | 35          | 36        | 35                              | 49                      | 55                               |
| <b>fehlend</b>   | 0          | 1      | 22     | 14            | 37                                   | 37   | 37          | 36        | 37                              | 23                      | 17                               |
| <b>Mittelwert</b>  | 0.549      | 78.113 | 25.613 | 0.500         | 1.486                                | 0.314  | 0.857       | 0.167     | 6.343                           | 10.939                  | 5.255                            |
| <b>Std. Deviation</b>  | 0.501      | 7.656  | 4.990  | 0.504         | 1.463                                | 0.471  | 0.944       | 0.561     | 3.067                           | 2.384                   | 4.106                            |
| <b>Normalverteilung nach Shapiro-Wilk (p-Wert)</b>                         | < .001     | 0.516  | 0.245  | < .001        | < .001                               | < .001                                       | < .001      | < .001    | 0.016                           | 0.002                   | 0.006                            |

*Anmerkung.* Aufgelistet sind die das Mikrobiom beeinflussenden Faktoren in der Subgruppe Stuhl- vs. Speichelproben.

## Anhang 2:

### *Einflussgrößen in der Subgruppe der Stuhlproben: IPS vs. nND*

| Deskriptive Statistik: Einflussgrößen der Gruppe Stuhlproben | Geschlecht | Alter  | BMI    | Alkoholkonsum | Alkoholkonsum im letzten halben Jahr | Antibiotikaeinnahme in den letzten 6 Monaten | Obstipation | Diarrhoen | Anzahl wöchentlicher Stuhlgänge | MNA: Sreening- Ergebnis | Anzahl eingenommener Medikamente |
|--|------------|--------|--------|---------------|--------------------------------------|--|-------------|-----------|---------------------------------|-------------------------|----------------------------------|
| <b>vorhanden</b>   | 53         | 52     | 49     | 50            | 34                                   | 35   | 34          | 35        | 34                              | 47                      | 53                               |
| <b>fehlend</b>   | 0          | 1      | 4      | 3             | 19                                   | 18   | 19          | 18        | 19                              | 6                       | 0                                |
| <b>Mittelwert</b>  | 0.538      | 78.635 | 26.521 | 0.540         | 1.588                                | 0.343  | 0.941       | 0.257     | 5.824                           | 11.191                  | 6.698                            |
| <b>Std. Deviation</b>  | 0.503      | 7.113  | 5.566  | 0.503         | 1.540                                | 0.482  | 0.919       | 0.611     | 2.886                           | 2.213                   | 3.755                            |
| <b>Normalverteilung nach Shapiro-Wilk (p-Wert)</b>           | < .001     | 0.625  | 0.082  | < .001        | < .001                               | < .001                                       | < .001      | < .001    | 0.011                           | 0.004                   | 0.332                            |

*Anmerkung.* Aufgelistet sind die das Mikrobiom beeinflussenden Faktoren in der Subgruppe der Stuhlproben: IPS vs. nND

*Abkürzungen.* IPS = Patient:innen mit idiopathischem Parkinson-Syndrom; nND = nicht-neurodegenerativ erkrankte Patient:innen

### Anhang 3:

#### *Einflussgrößen in der Subgruppe der Speichelproben: IPS vs. nND*

| Deskriptive Statistik:<br>Einflussgrößen<br>der Gruppe<br>Speichelproben | Geschlecht | Alter  | BMI    | Alkoholkonsum | Alkoholkonsum<br>im letzten Jahr | Antibiotikaeinnahme<br>in den letzten 6<br>Monaten | MNA:<br>Screening<br>Ergebnis | Anzahl<br>eingenommener<br>Medikamente |
|--|------------|--------|--------|---------------|----------------------------------|--|-------------------------------|--|
| <b>vorhanden</b>   | 63         | 62     | 49     | 50            | 35                               | 36   | 48                            | 53                                     |
| <b>fehlend</b>   | 0          | 1      | 14     | 13            | 28                               | 27   | 15                            | 10                                     |
| <b>Mittelwert</b>  | 0.500      | 78.161 | 25.578 | 0.560         | 1.514                            | 0.333  | 11.292                        | 6.057                                  |
| <b>Std. Deviation</b>  | 0.504      | 7.953  | 4.866  | 0.501         | 1.541                            | 0.478  | 2.153                         | 3.805                                  |
| <b>Normalverteilung<br/>nach Shapiro-<br/>Wilk (p-Wert)</b>              | < .001     | 0.006  | 0.120  | < .001        | < .001                           | < .001   | 0.002                         | 0.160                                  |

*Anmerkung.* Aufgelistet sind die das Mikrobiom beeinflussenden Faktoren in der Subgruppe der Speichelproben: IPS vs. nND

*Abkürzungen.* IPS = Patient:innen mit idiopathischem Parkinson-Syndrom; nND = nicht-neurodegenerativ erkrankte Patient:innen

## 8 DANKSAGUNG

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich auf dem Weg zur Abgabe meiner Thesis begleitet und unterstützt haben. Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Walter Maetzler für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und Betreuung meiner Dissertation. Für die stetige Unterstützung bei der Erhebung der klinischen Daten, sowie der Ausarbeitung und Unterstützung meiner Dissertation danke ich allen Mitgliedern der ComOn-Arbeitsgruppe der Neurogeriatrie des UKSH in Kiel. Besonders hervorzuheben sind meine Betreuer:innen Johanna Geritz, Julius Welzel und Corinna Bang. Zudem gebührt ein besonderer Dank Katharina Niemann, die als meine Vorgängerin im Bereich des *Biobankings* der ComOn-Studie, mir stets mit Rat und Tat bei der Einarbeitung, Datenerhebung und Datenanalyse zur Seite stand. Außerdem möchte ich mich in meinem persönlichen Umfeld bei meiner Familie, meinen Eltern Christa Steurethaler und Martin Lützelschwab und meinem Bruder Jannis Lützelschwab für die professionelle sowie emotionale Unterstützung während meiner Dissertation bedanken. Meiner Frau und ebenfalls Doktorandin der Arbeitsgruppe, Mareen Birkenbach, möchte ich ganz besonders für die unglaubliche Unterstützung während der letzten Jahre bis zur Fertigstellung dieser Thesis danken.