

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Stress und orale Dysbiose: *Porphyromonas gingivalis* im Speichel von pflegenden
Angehörigen von Menschen mit Demenz

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Ithamar Haedo
aus Al-Malikiya, Syrien

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Oliver Tüscher

2. Gutachter: PD Dr. Jens Weusmann

Tag der Promotion: 30. März 2026

Nachnutzungslizenz: CC-BY-NC-ND-4.0

Für meine Familie.

Inhaltsverzeichnis

a. Abkürzungsverzeichnis	6
b. Abbildungsverzeichnis	7
c. Tabellenverzeichnis	8
1. Einleitung und Ziel der Dissertation	9
1.1 Alzheimer-Demenz.....	9
1.2 Parodontitis.....	9
1.2.1 Pathogenese	10
1.2.2 Diagnostik.....	12
1.2.3 Therapie	15
1.2.4 Risikofaktoren und Wechselwirkungen	15
1.3 Stress als gesundheitliches Risiko für Angehörige von Menschen mit Demenz	15
1.4 Problemstellung und Forschungsfragen.....	16
1.5 Zielsetzung	16
2. Literaturdiskussion.....	16
2.1 Relevanz des Mikrobioms für Parodontitis-Diagnostik und Stressforschung	16
2.2 Psychischer Stress und Parodontitis	19
2.3 Die Belastung von pflegenden Angehörigen.....	20
2.4 Alzheimer-Demenz und Parodontitis	20
2.5 Zusammenfassung	22
3. Material und Methoden.....	22
3.1 Material.....	22
3.1.1 Geräte	22
3.1.2 Chemikalien.....	23
3.1.3 Oligonukleotide.....	23
3.1.4 Peptide	24
3.1.5 Bakterien	24
3.2 Methoden.....	24
3.2.1 Rekrutierung der Probanden	24
3.2.2 Gewinnung von Daten	25
3.2.3 Gewinnung der Proben.....	26
3.2.4 Aufbereitung der Proben.....	26
3.2.5 Messung der Gesamtkeimmenge und der <i>P. gingivalis</i> -Menge mithilfe der <i>Real-Time</i> PCR.....	27
3.2.6 Gelelektrophorese	27
3.2.7 FRET-Assay zur Bestimmung der Gingipain Aktivität	28
3.2.8 Zahngesundheitsbefragung	30
3.2.9 Statistische Auswertung.....	30
4. Ergebnisse	31
4.1 Ergebnisse der Vortests zur Etablierung der Methoden.....	31
4.1.1 Auswahl geeigneter Oligonukleotid-Paare	31
4.1.2 Effizienz der <i>Real-Time</i> PCR.....	32

4.1.3 Bestimmung der Gingipain-Aktivität im Speichel mittels FRET	35
4.1.4 Wirkung von Gallocatechingallat auf Gingipaine im Speichel.....	36
4.2 Analyseergebnisse der Speichelproben der Probanden	37
4.2.1 Nachweis der Gesamtkeimmenge und <i>P. gingivalis</i> -Menge mithilfe einer <i>Real-Time</i> PCR	37
4.2.2 Detektion der Gingipain-Aktivität.....	38
4.2.3 Korrelation der Gingipain-Aktivität mit den Bakterienmengen	39
4.3 Die Abhängigkeit der Gingipain-Aktivität von biochemischen Stressmarkern	40
4.4 Zusammenhänge zwischen Parodontitis-Risikoeinschätzung, biochemischen Stressmarkern und Gingipain-Aktivität	42
4.4.1 Ergebnisse der Befragung zur Zahngesundheit.....	42
4.4.2 Korrelation der Parodontitis-Einschätzung mit den biochemischen Stressmarkern und der Gingipain-Aktivität	42
4.5 Betrachtung der Haarcortisol-Konzentration.....	43
5. Diskussion.....	45
5.1 Diskussion der Methoden.....	45
5.1.1 Probenentnahme	45
5.1.2 Probenaufbereitung	47
5.1.3 Analyse der Speichelproben	49
5.1.4 Erfassung des parodontalen Zustands	49
5.2 Diskussion der Ergebnisse.....	50
5.2.1 Auswahl geeigneter Oligonukleotid-Paare	50
5.2.2 Effizienz der <i>Real-Time</i> PCR.....	50
5.2.3 Nachweis der Gesamtkeimmenge und <i>P. gingivalis</i> -Menge mithilfe der <i>Real-Time</i> PCR	51
5.2.4 Bestimmung der Gingipain-Aktivität im Speichel mittels FRET	52
5.2.5 Wirkung von Gallocatechingallat auf Gingipaine im Speichel und Bestimmung des einzusetzenden Probenvolumens.....	52
5.2.6 Fehlende Korrelation der Gingipain-Aktivität mit den Bakterienmengen.....	53
5.2.7 Abhängigkeit der Gingipain-Aktivität von biochemischen Stressmarkern	53
5.2.8 Ergebnisse der Befragung zur Zahngesundheit.....	54
5.2.9 Korrelation der Parodontitis-Einschätzung mit den biochemischen Stressmarkern und der Gingipain-Aktivität	54
5.3 Schlussfolgerung	55
5.4 Weiterführende Fragestellung: Mögliche Übertragbarkeit der Alzheimer-Demenz zwischen Erkrankten und Angehörigen	55
6. Zusammenfassung	56
7. Literaturverzeichnis	58
8. Anhang	65
8.1 Befragung zur Zahngesundheit bei pflegenden Angehörigen von Menschen mit Demenz	65
8.2 Bepunktung des Fragebogens zur Zahngesundheit.....	67
9. Danksagung	70
10. Tabellarischer Lebenslauf	71

a. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
AIT	Antiinfektiöse Therapie
APP	Amyloid-Vorläuferprotein
Arg-Gingipain	Gingipain, Enzym aus <i>P. gingivalis</i> , welches Proteine nach Arginin-Resten spaltet
AUC	<i>Area Under the Curve</i>
BEV	Befundevaluation
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BMI	Body-Mass-Index
BOP	<i>Bleeding on Probing</i>
CAL	<i>Clinical Attachment Loss</i>
CRP	C-reaktives Protein
CST	<i>Chairside-Test</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
D	Simpson-Diversitätsindex
DG Paro	Deutsche Gesellschaft für Parodontologie e.V.
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DMS	Deutsche Mundgesundheitsstudie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dsDNA	Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
for	<i>forward</i>
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer/ Förster Resonanz Energie Transfer
GCG	Gallocatechingallat
GCF	<i>Gingival Crevicular Fluid</i>
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
HRV	Herzratenvariabilität
ICD-11	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i>
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
KI	Konfidenzintervall
LPS	Lipopolysaccharide
Lys-Gingipain	Gingipain, Enzym aus <i>P. gingivalis</i> , welches Proteine nach Lysin-Resten spaltet
AMCI	<i>Mild Cognitive Impairment</i>
MMP-13	Matrixmetalloproteinase-13
MMP-8	Matrixmetalloproteinase-8
MMP-9	Matrixmetalloproteinase-9
MMST	<i>Mini-Mental-Status-Test</i>
MMSE	<i>Mini-Mental-State-Exam</i>
OMV	<i>Outer Membrane Vesicles</i>

Abkürzung	Bedeutung
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PGE2	Prostaglandin E2
PSI	Parodontaler Screening Index
qPCR	<i>Realtime-PCR</i>
r	Korrelationskoeffizient
RANK	<i>Receptor Activator of NF-κB</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
<i>T. denticola</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>T. forsythia</i>	<i>Tanerella forsythia</i>
TAE	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan-Acetat-EDTA
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UPT	Unterstützende Parodontitistherapie
Vol.	Volumen
WT-Mäuse	Wildtyp-Mäuse
5xFAD Mäuse	Transgene Mäuse
ZpGA	Zentrum für psychische Gesundheit im Alter

b. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Anatomie des Parodonts – Gesunder Zahnhalteapparat.....	10
Abbildung 2: Entzündetes Zahnfleisch (Gingivitis).....	12
Abbildung 3: Entzündeter Zahnhalteapparat (Parodontitis).....	12
Abbildung 4: Muster der Probenentnahme.....	25
Abbildung 5: Schematische Darstellung von FRET	29
Abbildung 6: qPCR zur Etablierung der Methoden	32
Abbildung 7: qPCR der Verdünnungsreihe des Oligonukleotid-Paars U1.....	33
Abbildung 8: qPCR der Verdünnungsreihe des Oligonukleotid-Paars HYq4	34
Abbildung 9: Darstellung der Effizienzermittlung der Oligonukleotid-Paare	34
Abbildung 10: Bestimmung der Gingipain-Aktivität im Speichel mittels FRET-Methode	35
Abbildung 11: Wirkung von GCG auf Gingipaine im Speichel.....	37
Abbildung 12: Gesamtbakterienlast und <i>P. gingivalis</i> -Menge im Speichel der pflegenden Angehörigen	38
Abbildung 13: Korrelation der Aktivität von Arg- und Lys-Gingipainen im Speichel	39
Abbildung 14: Korrelation von Gingipain-Aktivität und Bakterienmenge	40
Abbildung 15: Korrelation zwischen biochemischen Stressmarkern und der Gingipain-Aktivität.....	41
Abbildung 16: Befragung zur Zahngesundheit	42
Abbildung 17: Korrelation der biochemischen Stressmarker und der Gingipain-Aktivität mit dem Fragebogen-basierten Risiko für das Vorliegen einer Parodontitis.....	43
Abbildung 18: Korrelation der Gingipain-Aktivität und normierten <i>P. gingivalis</i> -Menge mit der gemessenen Haarcortisol-Konzentration.....	44

Abbildung 19: Korrelation der Haarcortisol-Konzentration mit dem fragebogenbasierten Risiko für das Vorliegen einer Parodontitis 44

c. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Parodontaler Screening Index (PSI).....	13
Tabelle 2: Klassifikation der Parodontitis nach <i>Staging</i> und <i>Grading</i>	14
Tabelle 3: Ein- und Ausschlusskriterien für pflegende Angehörige	25
Tabelle 4: Pipettierschema Gelelektrophorese	28
Tabelle 5: Pipettierschema des FRET-Assays mit dem Inhibitor GCG.	30
Tabelle 6: Auswertungsschema der Zahngesundheitsbefragung	30

1. Einleitung und Ziel der Dissertation

Pflegende Angehörige von Menschen mit Alzheimer-Demenz sind durch ihren Alltag chronischem Stress ausgesetzt und stellen damit eine vulnerable Personengruppe dar (Fonareva et al., 2012; Cuijpers, 2005). Zudem weisen sie eine erhöhte Rate an körperlichen und psychischen Erkrankungen auf (Wuttke-Linnemann et al., 2019; Pinguart und Sorensen, 2003). Stress ist außerdem ein Faktor, der bei der Pathogenese vieler Erkrankungen eine Rolle spielt, so auch bei der Parodontitis, der Entzündung des Zahnhalteapparats (Ardila und Guzman, 2016). Dennoch nehmen nur die wenigsten Pflegenden Hilfe in Anspruch und bleiben deshalb über einen langen Zeitraum vom Gesundheitssystem unbemerkt (Ludecke et al., 2012; Brodaty et al., 2005).

Die Diagnostik der Parodontitis erfolgt primär klinisch, jedoch bieten sich auch mikrobiombasierte Biomarker als akkurate Untersuchungsmethode an. Neben der einfachen Handhabung und dem einfachen Gewinn von Speichelproben zeigte die Untersuchung des Speichel-Mikrobioms auf die drei bei der Pathogenese der Parodontitis relevanten Bakterien *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*) und *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) hohe diagnostische Genauigkeit (Dong et al., 2025). Um zu prüfen, ob Parodontitis bei pflegenden Angehörigen von Menschen mit Alzheimer-Demenz vermehrt auftritt, wurde für diese Arbeit eine Untersuchung des Speichel-Mikrobioms durchgeführt.

1.1 Alzheimer-Demenz

Demenz ist eine neurodegenerative, syndromale Erkrankung. Im Jahr 2021 wurden in Deutschland 440.000 neue Fälle bei Personen ab 65 Jahren registriert, wobei Frauen häufiger betroffen waren als Männer (Blotenberg und Thyrian, 2022). Definiert wird die Demenz nach der 11. Revision der internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*, ICD-11, Kapitel 6 Neurokognitive Störungen – Demenz) als eine neu auftretende, chronisch fortschreitende, neurologische Erkrankung, die charakterisiert ist durch ein Defizit in mindestens einer kognitiven Fähigkeit, wie zum Beispiel im Bereich des Gedächtnisses, der Lernfähigkeit und des Denkens. Es können jedoch auch die Orientierung, das Urteilsvermögen und das planende Handeln betroffen sein. Die Sinnesorgane und das Bewusstsein bleiben dabei unbeeinträchtigt. Die Ursachen von Demenz sind vielfältig und lassen sich generell in neurodegenerative und vaskuläre Faktoren unterteilen. Mit einem Anteil von 70 % ist die Alzheimer-Krankheit die häufigste Ursache für demenzielle Syndrome (Lieb und Frauenknecht, 2019; Deutsche Gesellschaft für Neurologie e.V. und Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, 2023). Die Alzheimer-Krankheit äußert sich vor allem durch Gedächtnisstörungen, die zunächst das Kurzzeitgedächtnis betreffen (Herzog et al., 2021). Histopathologisch ist sie gekennzeichnet durch Amyloid-Plaques aus A β -Peptiden und Neurofibrillenablagerungen aus Tau-Protein, die insbesondere im Hippocampus, im Temporallappen und im basalen Prosencephalon nachweisbar sind (Lieb und Frauenknecht, 2019). Obwohl die genaue Pathogenese der Alzheimer-Krankheit noch nicht vollständig geklärt ist, sind verschiedene Risikofaktoren bekannt. Zu den nicht beeinflussbaren Faktoren gehören das Alter, genetische Defekte und spezifische Genvarianten (Stocker et al., 2018). Beeinflussbare Risikofaktoren umfassen den Lebensstil, wie körperliche Inaktivität, Alkohol- und Tabakkonsum sowie eine geringe soziale Teilhabe (Livingston et al., 2020). Zusätzlich zeigt die Alzheimer-Krankheit eine Verbindung zu anderen Allgemeinerkrankungen, wie der hier untersuchten Parodontitis (Sadrameli et al., 2020).

1.2 Parodontitis

Die Parodontitis ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparats, wozu die Gingiva, das Desmodont, der Wurzelzement, sowie der Alveolarknochen gehören (siehe Abbildung 1). Die Prävalenz für eine moderate Parodontitis liegt laut der sechsten Deutschen Mundgesundheitsstudie 2025 (DMS 6) bei 46 % für jüngere Erwachsene (35-44 Jahre) und

bei 25 % für jüngere Senioren (65-74 Jahre). Von einer schweren Parodontitis sind 17,5 % der jüngeren Erwachsenen und 52,7 % der jüngeren Senioren betroffen. Die Gesamtprävalenz für Parodontitis bei jüngeren Senioren beträgt 85,2 %. Durch den demographischen Wandel ist mit einer Zunahme des parodontalen Behandlungsbedarfs zu rechnen (DMS 6).

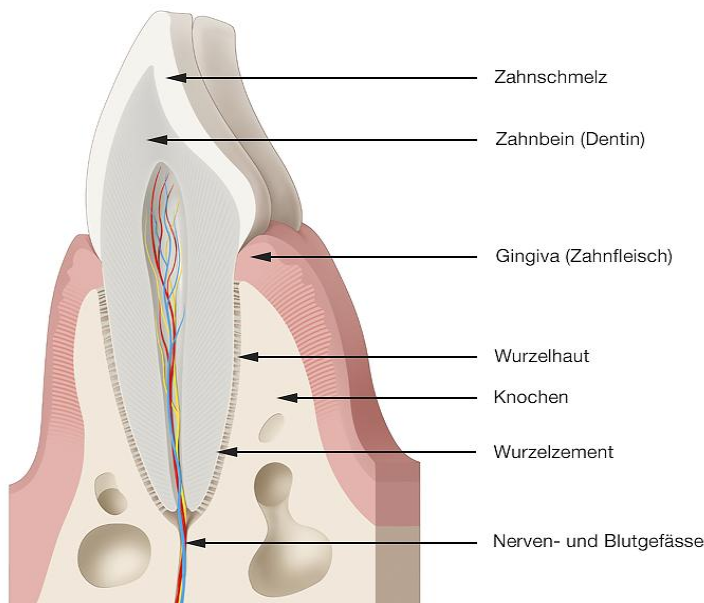


Abbildung 1: Die Anatomie des Parodonts – Gesunder Zahnhalteapparat

Die Abbildung zeigt einen Zahn mit seinem Zahnhalteapparat (Parodont) im Sagittalschnitt. Zum Parodont gehören das Zahnfleisch (Gingiva), die Wurzelhaut (Desmodont), der Wurzelzement (Cementum), sowie der Knochen (Alveolarknochen). Außerdem wird hier der Zahn, bestehend aus Zahnschmelz (Enamelum) und Zahnbein (Dentin), mit den zu- und wegführenden Nerven- und Blutgefäßen gezeigt. (DG Paro 2025)

1.2.1 Pathogenese

Die Ätiologie der Parodontitis ist multifaktoriell bedingt, jedoch stehen orale Bakterien im Vordergrund. Durch einen Zusammenbruch des Gleichgewichts der oralen Flora kommt es zu einer zunehmenden Speziesvielfalt (Hasan und Palmer, 2014). Dies geht einher mit einer Besiedlung der Zahnoberflächen durch Bakterien, die sich zu einem Biofilm entwickeln (Donne und Dewilde, 2015). Zunächst kommt es zur Anheftung von freischwimmenden, planktonischen Bakterien, die einen Biofilm auf der Zahnoberfläche bilden. Wird dieser nicht durch entsprechende Mundhygienemaßnahmen entfernt, können sich weitere Bakterien, sogenannte Brückenbakterien, ansiedeln, sodass der Biofilm reift. Schließlich können sich auch Spätbesiedler in den Biofilm einbringen. Hasan und Palmer (2014) haben sich in ihrer Arbeit mit der Pathologie parodontaler Erkrankungen beschäftigt und fanden heraus, dass sich im gesunden Zustand vor allem aerobe, gram-positive Organismen innerhalb des Biofilms befinden. Dabei handelt es sich vor allem um Kokken und weniger um bewegliche Stäbchen. Zu den wichtigsten Vertretern zählen Streptokokken. Insgesamt ist die Zahl der Spezies geringer als im entzündeten Zustand. Durch weitere Ansiedlung von gram-positiven Stäbchen, vor allem Aktinomyzeten, kommt es zu einer initialen Entzündungsreaktion, die klinisch als Gingivitis bezeichnet wird (Abbildung 2). Eine Gingivitis ist eine Entzündung, die nur auf das Zahnfleisch begrenzt ist und sich durch Schwellung und Rötung der Gingiva äußert. Häufig kommt es zu spontanen und/oder durch Berührung oder Sondierung induzierten Blutungen (*Bleeding on Probing*, BOP). Dieser Zustand ist reversibel, was bedeutet, dass er durch geeignete Mundhygienemaßnahmen wieder rückgängig gemacht werden kann. Ein Biofilm, der über einen längeren Zeitraum reift, ruft eine dauerhafte Entzündung hervor und resultiert dann in einer Parodontitis. Im Gegensatz zum gesunden Zustand liegen hier vor allem

anaerobe, gram-negative Organismen, vorwiegend bewegliche Stäbchen, vor (Hasan und Palmer, 2014).

Insgesamt lässt sich also sagen, dass sich das orale symbiotische Mikrobiom mit Kommensalen durch einen Homöostase-Zusammenbruch zu einem dysbiotischen Mikrobiom mit Pathobionten entwickelt (Hajishengallis und Lamont, 2014). Dieser Zusammenbruch wird durch immunregulatorische Störungen, systemische Erkrankungen, Adipositas, Rauchen, Alter und mikrobielle Faktoren begünstigt (Hajishengallis und Lamont, 2014). Ein weiterer Faktor, der den Homöostase-Zusammenbruch fördert und für diese Arbeit besonders im Vordergrund steht, ist der psychische Stress (Hajishengallis und Lamont, 2014). Der mikrobielle Angriff löst eine immunologische Reaktion des Wirts aus, die wiederum durch Entzündungsmediatoren und Proteasen zum Abbau von Weichgewebe und Knochen führt, beziehungsweise den Metabolismus des Knochens stört. Die Entzündungsmediatoren, die eine entscheidende Rolle spielen, sind das Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), Prostaglandin E₂ (PGE₂), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Vertreter der Matrix Metalloproteinasen (MMP-8, MMP-9 und MMP-13) (Preshaw und Taylor, 2011). Zudem ist auch das Zusammenspiel des Transmembranrezeptors *Receptor Activator of NF- κ B* (RANK), der von Osteoklasten-Vorläufern exprimiert wird, mit dem entsprechenden Liganden *Receptor Activator of NF- κ B Ligand* (RANKL), der unter anderem von Osteoblasten produziert wird, von Bedeutung (Belibasakis und Bostanci, 2012). Durch die Entzündung wird vermehrt RANKL durch die Osteoblasten gebildet, welches an RANK auf den Präosteoklasten bindet und diese zur Differenzierung in reife Osteoklasten aktiviert, sodass es zu einer vermehrten Knochenresorption kommt (Cochran, 2008).

Nach Socransky et al. (1998) werden Mikroorganismen in sechs Komplexe eingeteilt, die mit den unterschiedlichen Stadien entzündlicher Veränderungen am Parodont assoziiert sind: Blau, Gelb, Violett, Grün, Orange und Rot. Besonders relevant für die Entwicklung einer Parodontitis sind nach dieser Klassifikation der orangene und der rote Komplex. Zum orangenen Komplex zählen unter anderem *P. intermedia* und *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*). Zum roten Komplex zählen *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *Treponema denticola* (*T. denticola*). Wie bereits erläutert, weiß man jedoch heute, dass durch eine Dysbiose im Prinzip alle Mikroorganismen eine Rolle im Krankheitsprozess spielen. Die *Keystone*-Theorie hebt jedoch bestimmte Pathogene hervor, die die Virulenz des gesamten Mikrobioms maßgeblich steigern und die Immunabwehr schwächen können (Hajishengallis et al., 2012). Zu diesen *Keystone*-Pathogenen zählt *P. gingivalis* (Socransky et al., 1998). Dieses obligat anaerobe, gramnegative und asaccharolytische Bakterium kann in Epithelzellen und in das Gewebe der Gingiva eindringen (Sakanaka et al., 2016). *P. gingivalis* weist zahlreiche Virulenzfaktoren auf, darunter die als Gingipain bezeichneten Proteasen, die Peptidylarginindeiminase, die Serinphosphatase und Fimbrien (Sakanaka et al., 2016; Zenobia und Hajishengallis, 2015). Diese ermöglichen es dem Bakterium, die Virulenz des gesamten Biofilms erheblich zu erhöhen.

Wie bereits erwähnt, wird im frühen Stadium der Parodontitis ein Abbau von Kollagenfasern sichtbar, was zu einer Zunahme der Sondierungstiefen zwischen Zahn und Zahnfleisch führt (Bosshardt, 2018). Diese Taschen können gemessen werden und dienen als diagnostische Marker für den Schweregrad der Erkrankung (Gemeinsamer Bundesausschuss, PAR-Richtlinie 2020). Signal- und Botenstoffe des Immunsystems aktivieren Osteoklasten, was im weiteren Verlauf zu einem kontinuierlichen Abbau des Knochens führt (Bosshardt, 2018; Cochran, 2008). Mit zunehmendem Knochenabbau und der Vertiefung der Zahnfleischtaschen sammeln sich vermehrt Bakterien an, die Plaque bilden. Dies verstärkt die Immunantwort, fördert die Osteoklastenbildung und beschleunigt den Knochenabbau weiter (Cochran, 2008). Die durch die chronische Entzündung verursachten Gewebeschäden führen schließlich zum irreversiblen Verlust des Parodonts, einschließlich der parodontalen Fasern und des Alveolarknochens (Bosshardt, 2018) (siehe Abbildung 3). Da dieser Prozess meist schmerzfrei verläuft, bleibt die Erkrankung häufig lange Zeit unentdeckt. Regelmäßige zahnärztliche Kontrollen und die Anwendung des Parodontalen Screening Index (PSI) zur Überprüfung von Zahnfleischtaschen sind entscheidend, um Parodontitis frühzeitig zu erkennen (siehe Kapitel 1.2.2).

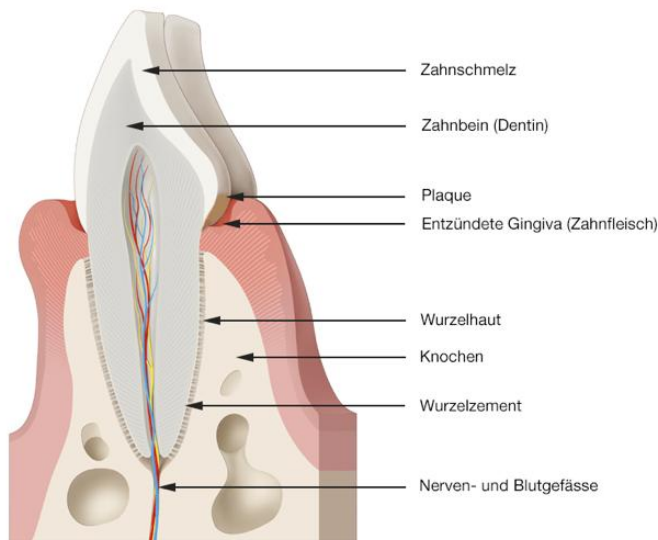


Abbildung 2: Entzündetes Zahnfleisch (Gingivitis)

Die Abbildung zeigt im Vergleich zum gesunden Zustand (siehe Abbildung 1) das entzündete Zahnfleisch (Gingivitis). Es kommt zur Rötung und Schwellung der Gingiva. Die Entzündung ist nur auf die Gingiva beschränkt. (DG Paro 2025)

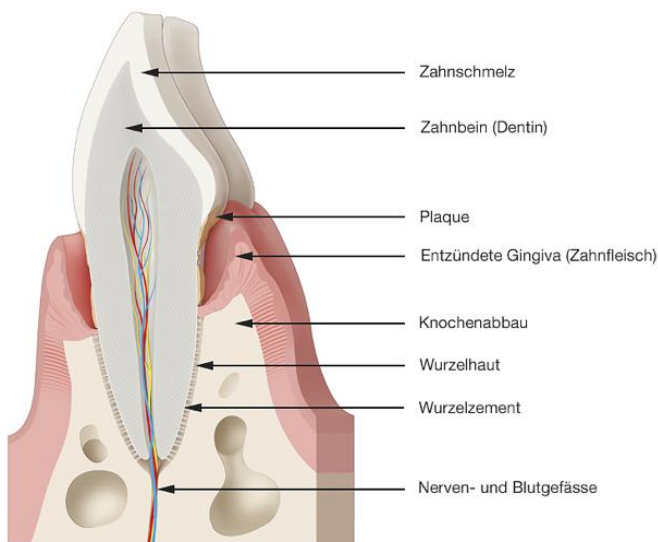


Abbildung 3: Entzündeter Zahnhalteapparat (Parodontitis)

Im Vergleich zu Abbildung 2 ist hier die Entzündung auf den gesamten Zahnhalteapparat ausgedehnt. Es kommt zum Abbau von Kollagenfasern und Knochen, wodurch sich die Sondierungstiefen der Zahnfleischtaschen erhöhen. (DG Paro 2025)

1.2.2 Diagnostik

Die Diagnostik der Parodontitis erfolgt klinisch. Zunächst führt man alle zwei Jahre im Rahmen der zahnärztlichen Kontrolle ein Screening durch, um den PSI (siehe Tabelle 1) zu bestimmen (PAR-Richtlinie zum PSI, DG Paro 2020). Dieser Index kann erste Anzeichen für das Vorliegen einer Gingivitis oder Parodontitis geben. Bei Verdacht auf Parodontitis wird zusätzlich ein detaillierter Parodontal-Status erhoben, welcher Michigan-Status genannt wird (PAR-Richtlinie, DG Paro 2020). Dieser umfasst die Sondierungstiefen der Zahnfleischtaschen, die den klinischen *Attachement-Verlust* (*Clinical Attachment Loss*, CAL) angeben, das Ausmaß der gingivalen Rezession und die Blutungspunkte an den Sondierungsstellen der Zahnfleischtaschen. Zudem werden die Lockerungsgrade und der Furkationsbefall bestimmt, welcher angibt, inwieweit die Furkationsstellen der Zahnwurzeln der mehrwurzeligen Seitenzähne freiliegen. Außerdem werden der röntgenologische Knochenabbau und der Zahnverlust aufgrund von Parodontitis erfasst. Schließlich werden die Risikofaktoren Rauchen und Diabetes abgefragt. Auf dieser Grundlage erfolgt eine Einstufung in das sogenannte *Staging* und *Grading* (Papapanou et al., 2018) (siehe Tabelle 2).

Alternativ dazu lässt sich der parodontale Zustand mit einem Fragebogen ermitteln, der die Symptome und Risikofaktoren der Parodontitis abfragt. Folglich kann eine Einschätzung über das Vorliegen von Parodontitis vorgenommen werden. Die Ermittlung unter Verwendung eines

Fragebogens ist im Gegensatz zur klinischen Untersuchung nicht invasiv, nicht schmerzhaft und letztlich auch mit weniger Aufwand für die Probanden verbunden.

Außerdem hat sich gezeigt, dass die Untersuchung von Speichelproben und subgingivalen Proben mittels mikrobiombasierter Biomarker zur Diagnose von Parodontitis eine hohe Genauigkeit aufweist (Dong et al., 2025). Bei den Speichelproben zeigten die drei Bakterien des roten Komplexes *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *P. intermedia* die höchste diagnostische Genauigkeit mit Sensitivitäten von 89,2 %, 89,2 % und 86,5 % und Spezifitäten von 94,6 %, 86,5 % und 83,8 %. Auf Grundlage dessen, wurden für diese Arbeit Speichelproben der pflegenden Angehörigen auf das Vorliegen von *P. gingivalis* untersucht.



Code 0	Code 1	Code 2	Code 3	Code 4
schwarzes Band bleibt vollständig sichtbar (ST < 3,5 mm)			schwarzes Band bleibt teilweise sichtbar (ST 3,5 mm – 5,5 mm)	schwarzes Band verschwindet ganz (ST > 5,5 mm)
keine Blutung	Blutung auf Sondieren	Zahnstein und/oder defekte Restaurationsränder		
kein Zahnstein und keine defekten Restaurationsränder	kein Zahnstein und keine defekten Restaurationsränder			
mögliche Diagnosen und Handlungsempfehlungen				
gesund	Gingivitis	Gingivitis	Parodontitis	Parodontitis
<ul style="list-style-type: none"> keine Therapie notwendig weitere präventive Betreuung 	<ul style="list-style-type: none"> Instruktionen zur Verbesserung der individuellen Mundhygiene professionelle Entfernung supragingivaler/gingivaler Beläge auf Zahn- und Wurzeloberfläche (PZR) kann hilfreich sein 	<ul style="list-style-type: none"> professionelle Entfernung supragingivaler/gingivaler Beläge auf Zahn- und Wurzeloberfläche (PZR) Instruktionen zur Verbesserung der individuellen Mundhygiene Korrektur plaque-retentiver Restaurationsränder 	<ul style="list-style-type: none"> analog Code 2 plus: vollständige parodontale Befunderhebung sobald ein Sextant einen Code 3 zugewiesen bekommt als Basis der weiteren Therapieplanung 	<ul style="list-style-type: none"> vollständige parodontale Befunderhebung sobald ein Sextant einen Code 3 zugewiesen bekommt als Basis der weiteren Therapieplanung

© Deutsche Gesellschaft für Parodontologie e.V. (DG PARO) 5. überarbeitete Auflage Oktober 2022

Tabelle 1: Parodontaler Screening Index (PSI)

Diese Tabelle zeigt die Codierung für den PSI an. Die Sondierung wird mit einer sogenannten WHO-Sonde durchgeführt, die oben links zu sehen ist. ST steht für die Sondierungstiefe. (Aus der PAR-Richtlinie zum PSI, DG Paro 2020)

Parodontitis: Staging



Parodontitis-Stadium STAGING		Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV
Schweregrad	interdentaler CAL an Stellen mit höchstem Verlust	1 - 2 mm	3 - 4 mm	≥ 5 mm	≥ 5 mm
	KA	< 15 %	15 - 33 %	> 33 %	
	Zahnverlust aufgrund von Parodontitis	kein Zahnverlust		≤ 4 Zähne	≥ 5 Zähne
Komplexität	lokal	<ul style="list-style-type: none"> · ST ≤ 4 mm · vorwiegend horizontaler KA 	<ul style="list-style-type: none"> · ST 5 mm · vorwiegend horizontaler KA 	zusätzlich zu Stadium II: <ul style="list-style-type: none"> · ST ≥ 6 mm · vertik. KA ≥ 3 mm · FB Grad II oder III 	zusätzlich zu Stadium III: <ul style="list-style-type: none"> komplexe Rehabilitation erforderlich aufgrund von: <ul style="list-style-type: none"> · mastikatorischer Dysfunktion · sekundärem okklusalen Trauma (Zahnbeweglichkeit ≥ Grad 2) · Zahnwanderung · ausgeprägtem Kammdefekt · Biss Höhenverlust · < 20 Restzähnen (10 okkludierende Paare)
		für jedes Stadium Ausmaß als lokalisiert (< 30 % der Zähne betroffen), generalisiert oder Molaren-Inzisivi-Muster beschreiben			
Ausmaß und Verteilung	wird zur genaueren Beschreibung des Staging verwendet	für jedes Stadium Ausmaß als lokalisiert (< 30 % der Zähne betroffen), generalisiert oder Molaren-Inzisivi-Muster beschreiben			

Papapanou, Sanz et al., 2018 Konsensus-Bericht, Tonetti et al., 2018 Fall-Definition

Parodontitis: Grading

Parodontitis GRADING			GRAD A: langsame Progressionsrate	GRAD B: moderate Progressionsrate	GRAD C: rasche Progressionsrate
Primäre Kriterien	direkte Evidenz für Progression	longitudinale Daten für KA oder CAL	kein Verlust	< 2 mm über 5 Jahre	≥ 2 mm über 5 Jahre
	indirekte Evidenz für Progression	KA (%)/Alter	< 0,25	0,25 - 1,0	> 1,0
		Phänotyp	· erheblicher Biofilm mit geringer parodontaler Destruktion	· Zerstörung proportional zum Biofilm	· Zerstörung unproportional zum Biofilm
Modifikatoren	Risikofaktoren	Rauchen	Nichtraucher	Raucher < 10 Zig./Tag	Raucher ≥ 10 Zig./Tag
		Diabetes	kein Diabetiker, normoglykämisch	HbA1c < 7,0 % bei Patienten mit Diabetes	HbA1c ≥ 7,0 % bei Patienten mit Diabetes

Tabelle 2: Klassifikation der Parodontitis nach Staging und Grading

Die Parodontitis wird individuell entsprechend dem Schweregrad, der Komplexität und dem Ausmaß der Verteilung einem bestimmten Stadium zugeordnet. Je höher das Stadium, umso höher der Schweregrad. Das Grading dient der Einteilung nach der Progressionsrate der Parodontitis. Hier sind sowohl direkte und indirekte Evidenzen, sowie das Vorliegen von Risikofaktoren von Bedeutung.

CAL = klinischer Attachmentverlust, FB = Furkationsbeteiligung, HbA1c = glykiertes Hämoglobin, KA = röntgenologischer Knochenabbau, ST = Sondierungstiefe, Zig. = Zigaretten. (Aus der S3-Leitlinie der DGZMK und DG Paro zur Therapie der Parodontitis, 2020).

1.2.3 Therapie

Die Therapie der Parodontitis wird in der S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund-, und Kieferkrankheiten (DGZMK) und der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie (DG Paro) vom Dezember 2020 festgelegt. Sie zielt hauptsächlich auf den mikrobiellen Bereich der Erkrankung ab. Die Behandlung erfolgt in vier Therapiestufen. Die erste Therapiestufe beinhaltet die Motivation des Patienten zur Verhaltensänderung, die Kontrolle von Risikofaktoren, die Mundhygiene-Instruktion und die Entfernung von supragingivalem Biofilm. In der zweiten Stufe werden supra- und subgingival gelegene Beläge mechanisch mittels Ultraschall- oder Handinstrumenten entfernt (Antiinfektiöse Therapie, AIT). Außerdem können lokale Antiseptika adjuvant angewandt werden. Eine systemische Antibiotikatherapie erfolgt nur selten und wird nur bei bestimmten Patientengruppen in Erwägung gezogen, etwa bei jungen Erwachsenen mit einer generalisierten Parodontitis Stadium III/IV und rascher Progressionsrate (Grad C). Drei bis sechs Monate nach der AIT erfolgt die Befundevaluation (BEV), bei der die Taschen nochmals nachgemessen werden, um den Effekt der bisherigen Therapie einschätzen zu können. Nach der BEV kann bei hohen Sondierungstiefen und schlechtem Ansprechen auf die AIT eine chirurgische Therapie indiziert sein, was der dritten Therapiestufe entspricht. Andernfalls erfolgt nach der BEV eine unterstützende Parodontitistherapie (UPT), welche die vierte Therapiestufe darstellt. Im Rahmen dieser Therapiestufe werden die Sondierungstiefen und die Blutungsstellen nochmals gemessen, gegebenenfalls ein neuer Parodontal-Status erhoben und eine subgingivale Instrumentierung bei noch tief gebliebenen Zahnfleischtaschen durchgeführt. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die erneute Motivation und Instruktion zur häuslichen Mundhygiene, sowie das Minimieren von beeinflussbaren Risikofaktoren, wie zum Beispiel dem Rauchen.

1.2.4 Risikofaktoren und Wechselwirkungen

Neben dem mikrobiologischen Aspekt gibt es auch einige beeinflussbare und nicht-beinflussbare Risikofaktoren, die das Entstehen und die Progression einer Parodontitis begünstigen. Rauchen führt zu tieferen Zahnfleischtaschen, höherem Knochen- und Zahnverlust, sowie zu einer schlechteren Therapieantwort (Bergstrom, 2004; Tomar und Asma, 2000) und stellt somit einen wichtigen Risikofaktor dar. Ein weiterer Aspekt ist der Diabetes mellitus. Dieser ist verbunden mit einer erhöhten Prävalenz, Inzidenz und einem erhöhten Schweregrad der Parodontitis (Deschner et al., 2011). Zudem führt Diabetes mellitus zu einer beschleunigten Progression der Erkrankung (Deschner et al., 2011). Jedoch korrelieren auch einige andere systemische Erkrankungen mit der Parodontitis, darunter Morbus Alzheimer (Sadrameli et al., 2020), rheumatoide Arthritis (de Oliveira Ferreira et al., 2019) und Adipositas (Suvan et al., 2011). Zudem ist Parodontitis mit einer schlechteren Endothelfunktion und höheren Intima-Media-Wanddicke der Arteria carotis (Orlandi et al., 2014) sowie einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, wie etwa Herzinfarkt, Schlaganfall oder der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (Wang et al., 2019; Yang et al., 2018), assoziiert. Auch eine Über- und Fehlbelastung bei Mastikation und Parafunktionen kann zu Parodontitis beitragen (Harrel et al., 2006). Ein weiterer Aspekt ist die genetische Veranlagung, wodurch eine Vererbung von Parodontitis möglich sein kann (Loe et al., 1986). Letztlich ist auch mentaler Stress ein Faktor, der berücksichtigt werden sollte. Inadäquate Stressverarbeitung sowie Depression und Isolation sind mit Parodontitis und einer schlechteren Therapieantwort assoziiert (Sheiham und Nicolau, 2005).

1.3 Stress als gesundheitliches Risiko für Angehörige von Menschen mit Demenz

Wie bereits erwähnt, spielt insbesondere Stress eine wichtige Rolle und stellt ein wesentliches gesundheitliches Risiko für Angehörige von Menschen mit Demenz dar. Neben der erhöhten körperlichen Belastung, ist ein Großteil von pflegenden Angehörigen chronischem Stress ausgesetzt. Dieser kann mit entsprechend assoziierten Erkrankungen einhergehen (McEwen, 1998) und auch das Risiko erhöhen, psychisch zu erkranken (Pinquart und Sorensen, 2003; Wuttke-Linnemann et al., 2019). Daher werden sie auch als „unsichtbare, zweite Patientinnen

und Patienten“ bezeichnet (Brodaty und Donkin, 2009). Schon bei Menschen mit milden kognitiven Beeinträchtigungen (*Mild Cognitive Impairment*, MCI) wurde bei den Lebenspartnern eine erhöhte Prävalenz von Depression beobachtet (Seeher et al., 2013). Stress kann anhand von subjektiven Angaben, aber auch anhand von physiologischen Markern gemessen werden (Wuttke-Linnemann et al., 2022a; Wuttke-Linnemann et al., 2022b). Besonders wichtig sind hierbei das Hormon Cortisol, welches die Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHN-Achse) anzeigt, und das Enzym Alpha-Amylase, welches die Aktivität des autonomen Nervensystems widerspiegelt.

1.4 Problemstellung und Forschungsfragen

Der demographische Wandel macht eine zunehmende Bedeutung von Morbus Alzheimer und Parodontitis unausweichlich. Bereits bekannt ist, dass die Menge von *P. gingivalis* im Speichel mit einem erhöhten Alzheimer-Risiko assoziiert ist (Sadrameli et al., 2020) und bei Parodontitis-Patienten durch Stress reguliert wird (Ardila und Guzman, 2016; Sheiham und Nicolau, 2005). Pflegende Angehörige von Menschen mit Demenz wurden in bisherigen Studien jedoch kaum berücksichtigt, obwohl sie ähnliche Lebensbedingungen wie Alzheimer-Patienten aufweisen. Da sie häufig chronischem Stress ausgesetzt sind (Cuijpers, 2005), was mit einer erhöhten Rate an körperlichen und psychischen Erkrankungen einhergeht (Wuttke-Linnemann et al., 2019; Pinquart und Sorensen, 2003), stellen sie eine gefährdete Personengruppe dar. Trotz dessen bleibt ein Großteil vom Gesundheitssystem unbemerkt, da sie selten professionelle Hilfe in Anspruch nehmen.

Vor diesem Hintergrund ergeben sich folgende Forschungsfragen:

- 1) Inwieweit korreliert die Menge an *P. gingivalis* bei pflegenden Angehörigen von Menschen mit Demenz mit Stress?
- 2) Inwiefern kann hier eine erhöhte Prävalenz von Parodontitis beobachtet werden?

1.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die *P. gingivalis*-Last bei pflegenden Angehörigen, die unter hoher Stressbelastung stehen, anhand von Speichelproben zu untersuchen und parodontale Symptome zu identifizieren. Es ist zu betonen, dass ein vertieftes Verständnis von Stress- und Resilienz-Mechanismen im Alltag pflegender Angehöriger erforderlich ist.

Insgesamt würde dies dabei helfen, betroffene Personen frühzeitig zu identifizieren und rechtzeitig Interventionen anzubieten.

2. Literaturdiskussion

Die vorliegende Literaturdiskussion beleuchtet den aktuellen Forschungsstand zur Rolle des Speichel-Mikrobioms bei pflegenden Angehörigen von Menschen mit Alzheimer-Demenz, mit besonderem Fokus auf die Zusammenhänge zwischen chronischem Stress, mikrobieller Dysbiose und Parodontitis als mögliche Gesundheitsfolge.

2.1 Relevanz des Mikrobioms für Parodontitis-Diagnostik und Stressforschung

Wie eingangs erläutert, spielt das Mikrobiom bei der Pathogenese und Progression der Parodontitis eine entscheidende Rolle (Curtis et al., 2020). Dementsprechend rücken mikrobiombasierte Biomarker als diagnostische Mittel immer weiter in den Fokus.

Zum einen können entzündliche und immunologische Marker wie MMP, IL-1 β und C-reaktives Protein (CRP) untersucht werden. In einer Studie (Kinney et al., 2011) wurden 79 Teilnehmende über einen Zeitraum von zwölf Monaten beobachtet. Die Probanden erhielten keine parodontalen Behandlungen oder Antibiotikatherapien in den letzten drei Monaten und mussten mindestens noch 20 Zähne haben. Zudem wurden sie in zwei Gruppen eingeteilt. Zum einen gab es die Gruppe „Gesundheit und Gingivitis“ und zum anderen die Gruppe

„Parodontitis“. Basierend auf klinischen Parametern wurden sie in die Subgruppen Gesundheit, Gingivitis, milde Parodontitis und moderate bis schwere Parodontitis eingeteilt. Außerdem wurde in eine Beobachtungs- (Monate eins bis sechs) und eine Genesungsphase (Monate sechs bis zwölf) eingeteilt. Die Speichelproben wurden alle zwei Monate durch passive Speichelfluss-Sammlung von unstimuliertem Speichel in sterilen Röhrchen gewonnen. Die Biomarker-Analyse erfolgte mittels *Proteinarrays* und *Enzyme-linked Immunosorbant Assay* (ELISA), um 14 verschiedene Entzündungs- und Knochenstoffwechselbezogene Marker zu quantifizieren. Zur Serum-Analyse wurde eine Blutentnahme nach sechs und nach zwölf Monaten durchgeführt. MMP-8 und IL-1 β wurden sowohl im Speichel als auch im Serum gemessen. Probanden mit einer moderaten bis schweren Parodontitis zeigten etwa 16-fach höhere Werte für MMP-8 und etwa achtfach höhere Werte für IL-1 β . Während der Genesungsphase zeigte sich im Speichel von Teilnehmenden mit moderater bis schwerer Parodontitis eine signifikante Reduktion von MMP-8 auf etwa ein Viertel und IL-1 β auf etwa ein Zehntel nach zwölf Monaten im Vergleich zum Ausgangswert ($p < 0,05$). Insgesamt lässt sich sagen, dass MMP-8 mit einer Sensitivität von 86,9 %, einer Spezifität von 79,2 % und einem *Area Under the Curve* (AUC)-Wert von 0,89 einen relevanten diagnostischen Marker darstellt.

Kinney et al. (2011) untersuchten neben den Speichel- und Serumproben auch den subgingivalen Plaque-Biofilm. Diese Proben wurden nach sechs und nach zwölf Monaten mittels Papierspitzen aus den Zahnfleischtaschen entnommen. Durch die Anwendung der *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (qPCR) wurden unter anderem *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* detektiert. Während der Genesungsphase haben sich die Zahlen der parodontalen Pathogene im Vergleich zu den Anfangswerten signifikant reduziert ($p < 0,05$). Die Pathogene und die Biomarker aus dem Speichel konnten bei 24 von 34 Probanden, was etwa 70 % entspricht, aus der Gruppe mit der raschen Progression zur Vorhersage des Vorliegens von Parodontitis genutzt werden.

Auch in einer Studie von Saygun et al. (2011) untersuchten die Autoren die Beziehung zwischen infektiösen Erregern im Speichel und dem Parodontalstatus, um die Rolle von mikrobiellen Biomarkern aus dem Speichel für die Diagnostik von Parodontalerkrankungen zu bewerten. Die Studie umfasste 48 Probanden, die in zwei Gruppen unterteilt wurden. Während in Gruppe 1 Probanden mit gesundem Parodont untersucht wurden, bestand Gruppe 2 aus Patienten mit chronischer Parodontitis. Für die Untersuchung wurden Speichelproben durch passive Speichelfluss-Sammlung in sterilen Röhrchen gewonnen, während die Plaque-Proben durch sterile Küretten von den Zähnen und Zahnfleischrändern entnommen wurden. Die Detektion von *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* erfolgte auch hier mittels Polymerasekettenreaktion (PCR). Patienten mit Parodontitis wiesen signifikant höhere Konzentrationen von *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* im Speichel auf ($p < 0,05$). Mit Sensitivitäten von 89,2 %, 89,2 % und 86,5 %, sowie Spezifitäten von 94,6 %, 86,5 %, 83,8 % und AUC-Werten von über 0,80 zeigten diese drei Pathogene die höchste diagnostische Genauigkeit. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) hingegen war nicht geeignet, um Parodontitis nachzuweisen, da die Zahl der Amplifikate nur bei Probanden mit aggressiver Parodontitis höher war als bei gesunden Personen. Die Sensitivität für dieses Pathogen betrug 48,8 % und die Spezifität 80,9 % mit einem AUC-Wert von 0,65.

Außerdem wurden auch subgingivale Biomarker auf diagnostische Genauigkeit untersucht (Zaric et al., 2022). In die Studie eingeschlossen wurden 32 Probanden mit einer generalisierten Parodontitis in Stadium II-IV und 33 systemisch und parodontal gesunde Probanden. Die Speichelproben von unstimuliertem Speichel wurden auch hier durch die Spuck-Technik in sterilen Röhrchen gesammelt. Außerdem wurden subgingivale Proben durch Insertion von Papierspitzen in die drei tiefsten Zahnfleischtaschen mit positivem BOP gesammelt. Ziel war es, die Endotoxin-Aktivität zu messen und in Korrelation mit dem Vorliegen von Parodontitis zu bringen. Die Endotoxin-Aktivität meint dabei die Menge an Endotoxinen, die von gramnegativen Bakterien freigesetzt werden und eine immunologische Reaktion auslösen können. Lipopolysaccharide (LPS) stellen eine Form von Endotoxinen dar. Dabei handelt es sich um Kohlenhydrat-Lipid-Verbindungen, die die äußere Zellmembran von gramnegativen Bakterien bilden und diese vor äußeren Noxen schützen. Im Kontext der

Parodontitis können erhöhte Endotoxin-Spiegel im subgingivalen Biofilm und im Speichel auf eine bakterielle Infektion hinweisen und damit als Biomarker für Diagnose und Überwachung der Erkrankung dienen. Für die Analyse wurden LPS aus dem Speichel und aus den subgingivalen Plaque-Proben mit einem entsprechenden Kit extrahiert und anschließend mittels *Endpoint fluorescent recombinant Factor C Assay* gemessen. Die Analyse ergab, dass die subgingivale Endotoxin-Aktivität signifikant mit der lokalen Zahnfleischtaschentiefe korreliert (Korrelations-Koeffizient (r) = 0,63; 95 % Konfidenzintervall (KI): [0,48; 0,75]; $p < 0,0001$). Außerdem zeigten 31 von 32 Parodontitis-Patienten nach der Therapie signifikant niedrigere Werte für die Endotoxin-Aktivität ($p = 0,0003$). Die Studie hat ergeben, dass die subgingivale Endotoxin-Aktivität mit einer Sensitivität von 90,6 % und einer Spezifität von 87,9 % eine hohe diagnostische Leistung aufweist. Im Vergleich dazu ist die Endotoxin-Aktivität im Speichel als diagnostischer Marker mit einer Sensitivität von 69 % und einer Spezifität von 61 % unterlegen. Außerdem haben die subgingivale und die saliväre Endotoxin-Aktivität nicht miteinander korreliert ($r = 0,17$; KI: [-0,06; 0,37]; $p = 0,12$).

Arweiler et al. (2020) verglichen einen *chairside-Test* (CST) für fünf parodontal relevante Pathogene mit der qPCR: *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans* und *P. intermedia*. Es nahmen insgesamt 125 Personen teil, darunter 100 Personen mit Parodontitis und 25 parodontal Gesunde. Von jedem Teilnehmenden wurden zwei Proben des Sulkusfluids mittels Papierspitzen entnommen. Die Proben wurden sowohl mit dem CST als auch mit der qPCR analysiert, wobei Letztere als Referenzmethode diente. Für die Durchführung des CST wurde die Probe zunächst in die Testkassette gegeben. Basierend auf der *Lateral-Flow-Technologie* erschienen nach einer bestimmten Inkubationszeit farbliche Testlinien, die das Vorhandensein der Pathogene zeigten. Die Ergebnisse wurden anschließend mit den Ergebnissen der qPCR verglichen, um die diagnostische Genauigkeit zu evaluieren. Für *T. denticola* ergab der CST mit etwa 86 % die höchste Sensitivität. *P. gingivalis* wurde mit einer Sensitivität von etwa 77 % detektiert. Bei der qPCR waren diese Werte höher. 85 % Sensitivität für *T. denticola* und 74 % für *P. gingivalis*. In Relation zu den klinischen Parametern Taschentiefe und CAL zeigte der CST eine Sensitivität von etwa 85 % und die qPCR eine Sensitivität von 94 %.

Die systematische Übersichtsarbeit von Dong et al. aus dem Jahr 2025 verglich die oben genannten Studien und damit die untersuchten Biomarker hinsichtlich ihrer Eignung als diagnostische Marker. Die Autoren heben *P. gingivalis* aufgrund der von Saygun et al. (2011) berichteten Sensitivität von 89,2 % und Spezifität von 94,6 % als speichelbasierten Biomarker hervor. Bei den subgingivalen Biomarkern wird die Endotoxin-Aktivität (Zaric et al. 2022) als vielversprechender diagnostischer Ansatz gesehen (Sensitivität 90,6 %, Spezifität 87,9 %). Jedoch zeigt der CST die höchste diagnostische Leistung (Sensitivität 85 %, Spezifität 100 %) (Arweiler et al., 2020). Er bietet damit eine praktische Möglichkeit zur Früherkennung von Parodontitis und zur individuellen Risikobewertung in der klinischen Praxis.

Insgesamt lässt sich sagen, dass mikrobiombasierte Biomarker vielversprechende Möglichkeiten für eine nicht-invasive Diagnostik eröffnen.

Auch für die Stressforschung ist das Mikrobiom von hoher Relevanz. In einer Studie aus dem Jahr 2023 wurden die Auswirkungen von physischem und psychologischem Stress auf die Zusammensetzung des oralen Mikrobioms untersucht (Stoy et al., 2023). Die Studie schloss 37 Probanden ein, welche Medizinstudenten im zweiten und dritten Studienjahr waren. Um physischen und psychischen Stress zu simulieren, wurde das *Intensive Surgical Skills Week* Programm genutzt. Dieses ist ein Simulationstraining für militärische Medizinstudenten, welches Massenunfallereignisse simuliert und die Teilnehmenden in verschiedenen Rollen innerhalb eines Teams agieren lässt. Es wurde zu sieben Zeitpunkten ein Fragebogen ausgefüllt und eine Speichelprobe aus dem *Planum buccale* (Innenseite der Wange) anhand von Watteträgern entnommen. Die Proben wurden mittels 16S-rRNA-Sequenzierung analysiert, um die Zusammensetzung des oralen Mikrobioms zu untersuchen. Anschließend wurde eine PCR durchgeführt. Die Alpha-Diversität, welche die Vielfalt innerhalb jeder einzelnen Probe beschreibt, wurde zu Beginn, in der Mitte und am Ende der Datenerhebung erfasst. Dazu wurde der Simpson-Diversitätsindex (D) bestimmt. Je höher der Wert, desto größer ist die Diversität. Es hat sich gezeigt, dass die Diversität insgesamt von Beginn ($D \approx 0,65$) bis zum Ende ($D \approx 0,74$) der Datenerhebung gestiegen ist. Außerdem zeigte sich,

dass die Artenvielfalt bei Studierenden im dritten Studienjahr am Ende der Datenerhebung um etwa 30 % höher war als zu Beginn ($p = 0,008$).

Psychologischer Stress verändert also die Diversität und das Verhältnis von Pathobionten und Kommensalen. Zudem kann psychologischer Stress die Proliferation von Bakterien wie *P. gingivalis* fördern. Dabei wirkt sich Stress über hormonelle Veränderungen, wie zum Beispiel über erhöhte Cortisolspiegel, auf das Mikrobiom aus. In der Studie von Ardila und Guzmán (2016) wurde die Assoziation zwischen parodontalen Pathogenen und dem Cortisollevel untersucht. 75 Patienten mit chronischer Parodontitis wurden eingeschlossen. Die Cortisolmessung im Serum erfolgte mittels *Immunoassay*. Die mikrobiologische Analyse von *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* und *A. actinomycetemcomitans* erfolgte durch PCR. Zum einen ergab sich eine positive Korrelation von hohen Cortisolwerten mit dem Vorkommen von *P. gingivalis* ($r = 0,237$; $p < 0,01$). Zum anderen fanden sich in 81 % der 26 Patienten mit Hypercortisolämie *P. gingivalis*, wovon 86 % eine schwere, chronische Parodontitis aufwiesen ($p < 0,001$). Damit legt die Studie nahe, dass erhöhte Cortisolspiegel, die durch Stress induziert werden, mit einer höheren Prävalenz von *P. gingivalis* bei Patienten mit chronischer Parodontitis verbunden sind.

Außerdem führt Cortisol zu signifikanten Veränderungen in der Genexpression des oralen Mikrobioms (Duran-Pinedo et al., 2018). Diese betrafen insbesondere Gene, die mit der bakteriellen Virulenz verknüpft sind. Fusobakterien, insbesondere *Leptotrichia goodfellowii*, wiesen eine erhöhte Transkriptionsaktivität auf. Des Weiteren zeigten *P. gingivalis* und *T. denticola* eine erhöhte Expression von Genen, die für Toxine und andere Virulenzfaktoren kodieren, wie zum Beispiel Lysin- und Arginase-Gingipaine, LPS und Chemotaxis-Gene. Jedoch sind weitere Studien erforderlich, um die genauen Mechanismen zu verstehen.

2.2 Psychischer Stress und Parodontitis

Wie in 1.2.4 bereits erwähnt, wird die Entstehung von Parodontalerkrankungen durch soziale und psychologische Faktoren begünstigt (Sheiham und Nicolau, 2005). Stress, Depression und Angst nehmen negativen Einfluss auf das Immunsystem und können somit das Risiko für Parodontitis erhöhen. Besonders bei chronischem Stress kann die Funktion von Immunzellen wie den neutrophilen Granulozyten beeinträchtigt werden, was die Entstehung von chronischen Entzündungen fördert (Sheiham und Nicolau, 2005).

Außerdem wurde eine positive Korrelation zwischen dem Cortisolspiegel im Speichel und dem CAL beobachtet (Hilgert et al., 2006). Die Studie untersuchte 235 Probanden im Alter von mindestens 50 Jahren. Die Stresssymptome wurden mit dem *Lipp's Inventory of Stress Symptoms for Adults* erfasst. Die Cortisolspiegel wurden aus den Speichelproben bestimmt, während der Parodontalstatus durch klinische Untersuchung erfasst wurde. Die Studie ergab, dass Personen mit höheren Cortisolwerten im Vergleich zu Personen mit niedrigeren Cortisolwerten eine 5,1-mal höhere Wahrscheinlichkeit haben einen durchschnittlichen CAL von ≥ 4 mm aufzuweisen. Außerdem haben sie eine 6,9-mal höhere Wahrscheinlichkeit, dass mindestens 30 % ihrer Zahnfleischtaschen einen CAL von ≥ 5 mm aufweisen. Damit sind höhere Cortisolspiegel signifikant mit einer schlechteren parodontalen Gesundheit assoziiert. Neben dem Speichel, kann auch die Sulkusflüssigkeit zur Diagnostik verwendet werden (Buduneli et al., 2024; Guentsch et al., 2011; Wassall und Preshaw, 2016). Bei der Sulkusflüssigkeit handelt es sich um ein Sekret, welches sich im Sulkus, dem Raum zwischen Gingiva und Zahnschmelz, befindet und sowohl mechanische Spülfunktion als auch antimikrobielle Funktionen zum Schutz des Parodonts übernimmt. Sie enthält Entzündungsmediatoren, Enzyme, Antikörper sowie bakterielle Produkte und Stoffwechselprodukte (Guentsch et al., 2011). Veränderungen in der Zusammensetzung der Sulkusflüssigkeit können auf parodontale Entzündungen hinweisen (Buduneli et al., 2024). Cakmak et al. (2016) untersuchten in einer Arbeit die Konzentrationen der Stresshormone Cortisol und Dehydroepiandrosteron (DHEA) in der Sulkusflüssigkeit und im Speichel bei Patienten mit generalisierter, aggressiver Parodontitis, chronischer Parodontitis, sowie bei parodontal gesunden Individuen (Cakmak et al., 2016). Insgesamt wurden 92 Probanden in die Studie eingeschlossen. Davon waren 31 parodontal Gesunde, 27 mit generalisierter,

aggressiver Parodontitis und 34 mit chronischer Parodontitis. Die Sulkusflüssigkeit-Proben wurden mittels *Filter Paper Strips* gesammelt. Außerdem wurden klinische Parameter wie Sondierungstiefen und CAL erfasst. Es konnte beobachtet werden, dass die Cortisol- und DHEA-Werte in der Gruppe mit generalisierter, aggressiver Parodontitis signifikant höher waren als für die anderen beiden Gruppen ($p < 0,05$). Zudem waren die Werte bei der Gruppe mit chronischer Parodontitis signifikant höher als bei der gesunden Kontrollgruppe ($p < 0,05$).

2.3 Die Belastung von pflegenden Angehörigen

Pflegende Angehörige sind durch ihren Alltag einem hohen Grad an Belastung ausgesetzt. Im Vergleich zu nicht-pflegenden Angehörigen zeigen sie eine signifikant schlechtere psychische Gesundheit (Janson et al., 2022; Pinquart und Sorensen, 2003). Die häufigsten Probleme sind Depression, subjektiver Stress (Pinquart und Sorensen, 2003) und Angstzustände (Brodaty und Donkin, 2009). Das Risiko für die Entwicklung einer Depression bei pflegenden Angehörigen von Menschen mit Demenz liegt zwischen 3 und 57 % (Collins und Kishita, 2020). Isolation und die Vernachlässigung sozialer Kontakte verstärken diese Belastungen. Neben der psychischen Belastung leiden pflegende Angehörige auch unter einer schlechteren physischen Gesundheit. Insbesondere eine erhöhte Krankheitsanfälligkeit und chronische Erschöpfung sind hierbei zu nennen.

Ein weiterer Aspekt ist, dass die Pflege von Demenzpatienten im Vergleich zur Pflege von anderen Patienten mit einer deutlich stärkeren Belastung der psychischen Gesundheit einhergeht. Die physiologischen, funktionellen und psychosozialen Auswirkungen der Pflege von Demenzpatienten wurden beispielsweise in einer Studie von Fonareva und Oken (2014) untersucht. Diese hat ergeben, dass pflegende Angehörige häufig eine Dysregulation in der HHN-Achse aufweisen. Dabei handelt es sich um ein komplexes System zwischen Hypophyse, Hypothalamus und Nebennierenrinde, welches einige Körperfunktionen und -reaktionen, vor allem die Stressreaktion, beeinflusst. Chronischer Stress hat dadurch einen negativen Einfluss auf das Immunsystem und erhöht Entzündungsmediatoren, was zu einer stärkeren Anfälligkeit für Krankheiten führt. Darüber hinaus konnte allgemein bei pflegenden Angehörigen ein um 23 bis 30 % erhöhtes Risiko für die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen festgestellt werden (Janson et al., 2022). Außerdem beschreiben die Autoren eine um 40 % höhere Wahrscheinlichkeit für eine frühzeitige Mortalität, welche den Tod vor dem Erreichen des durchschnittlichen Sterbealters der Bevölkerung meint, in Deutschland vor dem 75. Lebensjahr (Kreft, 2025).

2.4 Alzheimer-Demenz und Parodontitis

Eine systematische Übersichtsarbeit von Asher et al. (2022) zeigt, dass es ein um 21 % erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Alzheimer-Demenz bei Patienten mit Parodontitis gibt. Wie eingangs erläutert, induziert Parodontitis eine systemische Entzündung, die durch erhöhte Zytokinpiegel charakterisiert ist. Sadrameli et al. haben in ihrer Studie aus dem Jahr 2020 den Zusammenhang zwischen Parodontitis und dem erhöhten Risiko für Alzheimer untersucht. Dazu werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Zum einen hat sich ergeben, dass chronische Parodontitis als systemische Entzündung zu einer langfristigen Erhöhung von proinflammatorischen Zytokinen wie $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und IL-6 führt. Diese Entzündungsmediatoren können die Blut-Hirn-Schranke (BHS) permeabel für entzündliche Moleküle machen, was den Eintritt dieser ins Gehirn erleichtert (Sadrameli et al., 2020). Somit stünden sie auch mit neurodegenerativen Prozessen in Verbindung. Hinzu kommt, dass chronische Entzündungen zur Aktivierung von Mikroglia führen, was wiederum neuroinflammatorische Degeneration fördert (Sadrameli et al., 2020). Zum anderen könnte auch die direkte bakterielle Invasion eine Rolle spielen. Es konnte das Vorhandensein von Gingipainen im Gehirn von Alzheimer-Patienten nachgewiesen werden, woraus sich schließen lässt, dass *P. gingivalis* in das Hirngewebe gelangen kann (Dominy et al., 2019). 51 von 53 Gehirnproben von Alzheimer-Patienten, entsprechend 96 %, waren positiv auf Arg-Gingipain und 49 von 54 Proben, also 91 %, waren positiv auf Lys-Gingipain. Zudem war die Menge an

Arg-Gingipainen in Gehirnproben von Menschen mit Alzheimer-Demenz etwa um ein Achtfaches und Lys-Gingipaine etwa um ein Vierfaches höher als bei den Kontrollproben aus nicht-dementen Personen ($p < 0,0001$).

Auch Nara et al. (2021) haben sich ausführlich mit der Bedeutung von *P. gingivalis* für die Pathogenese der Alzheimer-Demenz beschäftigt. Sie stellten die Hypothese auf, dass die äußeren Membranvesikel (*Outer Membrane Vesicles*, OMV) von *P. gingivalis* dabei eine zentrale Rolle spielen. OMV sind Vesikel, die von der äußeren Membran gramnegativer Bakterien abgegeben werden. Sie dienen unter anderem der chemischen Kommunikation der Bakterien untereinander und mit artfremden Mikroorganismen. Außerdem enthalten OMV eine Vielzahl von bakteriellen Virulenzfaktoren, darunter Proteasen, wie zum Beispiel Gingipaine, LPS, sowie Toxine (Nara et al., 2021). Ein zentrales Thema der Studie ist die mögliche Neuropathogenese durch die OMV. Durch OMV können Virulenzfaktoren von *P. gingivalis* die Mucosa penetrieren und sich subepithelial anlagern (Furuta et al., 2009). Wie bereits erwähnt, werden LPS ebenfalls durch OMV transportiert. Dies ist von besonderer Relevanz, da LPS eine entscheidende Rolle bei entzündlichen Prozessen spielt und mit neuroinflammatorischen Mechanismen in Verbindung gebracht wird (Nara et al., 2021).

Unklar ist jedoch noch, wie das Bakterium und seine Metabolite die BHS passieren können. Eine Theorie ist, dass sich *P. gingivalis* über LPS Zugang verschaffen kann (Lee et al., 2008). Lee et al. (2008) untersuchten den Einfluss von Neuroinflammation, die durch LPS induziert wurde, auf die kognitive Funktion und die β -Amyloid-Produktion bei Mäusen. Dazu wurde den Mäusen intraperitoneal LPS verabreicht und anschließend wurden verschiedene Tests durchgeführt. Zum einen wurde ein Verhaltenstests zur Bewertung des Gedächtnisses durchgeführt und zum anderen wurden biochemische Analysen zur Untersuchung der β - und γ -Sekretase-Aktivitäten vorgenommen, die an der Bildung von A β aus dem Amyloid-Vorläuferprotein (APP) beteiligt sind. Zudem wurde die Expression des APP untersucht. Schließlich wurden auch histologische Analysen im Sinne von immunhistochemischen Färbungen zur Detektion von A β und zur Detektion der Aktivierung von Astrozyten im Hippocampus und der Großhirnrinde angewandt. Die Studie ergab, dass Mäuse, die eine LPS-Injektion erhielten im Vergleich zu der Kontrollgruppe, bei der sterile Kochsalzlösung injiziert wurde, eine signifikante Gedächtnisstörung in den Verhaltenstests zeigten ($p < 0,05$). Zudem hat sich ergeben, dass wiederholte LPS-Injektionen zu einer um etwa 50 % erhöhten Ansammlung von A β im Hippocampus ($p < 0,05$) und zu einer gesteigerten Aktivität der β -Sekretase auf etwa ein 3,5-faches und der γ -Sekretase auf etwa ein 1,4-faches im Hippocampus führten ($p < 0,05$). Die Autoren kommen daher zu dem Schluss, dass eine systemische Entzündung bei der Entwicklung und der Progression von Alzheimer-Demenz eine Rolle spielen könnte.

Eine weitere Hypothese ist, dass OMV die Permeabilität der BHS erhöhen (Han et al., 2019). In einem Mausmodell wurden OMV von *P. gingivalis* intravenös injiziert. Mittels Fluoreszenzmarkierung und Immunhistochemie konnte nachgewiesen werden, dass die OMV die BHS überwinden und ins Gehirn gelangen. Außerdem zeigten Mäuse, die mit OMVs behandelt wurden, eine verstärkte Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten, was auf eine neuroinflammatorische Reaktion hindeutet. Dies konnten sie aus der Analyse der Zytokin-Produktion von Makrophagen nach der Behandlung mit OMV schließen. Intakte OMV verursachten eine etwa dreimal stärkere Hochregulation des Zytokins TNF- α als die mit Nuklease behandelten OMV-Lysate ($p \leq 0,01$).

Darüber hinaus greifen die Autoren Nara et al. (2021) die cholinerge Hypothese auf und stellen einen möglichen Zusammenhang zwischen einer *P. gingivalis*-Infektion und der Beeinträchtigung des cholinergen Systems her. Dieses ist entscheidend für die Bereiche Gedächtnis und Lernen. Eine der Hauptursachen für den Gedächtnisverlust bei der Alzheimer-Demenz ist der Mangel an Acetylcholin, einem wichtigen Neurotransmitter. Die Autoren schlagen vor, dass die durch die OMV induzierten neuroinflammatorischen Prozesse möglicherweise zu einer Degeneration von cholinergen Neuronen im Gehirn führen könnten, was zu einem Abfall des Acetylcholin-Spiegels führt und damit das Auftreten klassischer Alzheimer-Symptome zur Folge hat.

Insgesamt betrachtet ist noch weitere Forschung erforderlich, um die Zusammenhänge zwischen Parodontitis und Alzheimer-Demenz vollständig zu verstehen.

2.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bisherige Forschungsarbeiten zur Alzheimer-Demenz und dem oralen Mikrobiom sich auf die Erkrankten selbst beziehen, jedoch die pflegenden Angehörigen nicht in genauere Betrachtung einbezogen werden. Außerdem bietet die vorhandene Literatur wichtige Anhaltspunkte zur Relevanz des Mikrobioms bei stressbedingten Gesundheitsproblemen und bei Parodontalerkrankungen. Dennoch bleibt auch hier die Rolle des Speichel-Mikrobioms bei pflegenden Angehörigen von Alzheimer-Patienten ein weitgehend unerforschtes Gebiet. Die Integration dieser Dimension in die Forschung könnte nicht nur das Verständnis der Belastung dieser Gruppe erweitern, sondern auch neue Wege für die Prävention und Therapie eröffnen.

3. Material und Methoden

In diesem Kapitel sind alle Materialien und Methoden beschrieben, die für die Erstellung dieser Arbeit in Anspruch genommen wurden.

3.1 Material

Nachfolgend sind alle für diese Arbeit verwendeten Geräte, Chemikalien, Oligonukleotide, Peptide und Bakterienproben aufgelistet.

3.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Elektrophorese Kammer	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Eppendorf Rörchen 1,5 ml (<i>SafeSeal reaction tubes</i>)	Sarstedt (Nürnberg, Deutschland)
384-Loch-Platte	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, Österreich)
Mechanische Pipette	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
Mechanische Pipette für PCR	Biohit Oyj (Helsinki, Finnland)
Mikroplatten-Reader (<i>FLUOstar Optima</i>)	BMG Labtech (Ortenberg, Deutschland)
Mikrowelle	Severin Elektrogeräte GmbH (Sundern, Deutschland)
PCR <i>plate spinner</i>	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Germany)
PCR <i>Thermocycler StepOne Plus</i>	Applied Biosystems von Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland); Hauptsitz: Waltham, Massachusetts, USA)
Präzisionswaage	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
<i>SaliCap</i> 1,5 ml	Tecan Trading AG (Männedorf, Schweiz)
Thermomixer	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Transilluminator	Konrad Benda (Wiesloch, Deutschland)
Zentrifuge	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

3.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Chelex-100	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Deutschland; Hauptsitz: Hercules, Californien, USA)
CXR Reference Dye	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland; Hauptsitz: Madison, Wisconsin, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	PanReac AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Desoxyribonucleic acid (DNA) Loading Dye (6x)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland; Hauptsitz: Waltham, Massachusetts, USA)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich GmbH (Hauptsitz: St. Louis, Missouri, USA), Tochtergesellschaft Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
(-)-Galocatechingallat	Cayman Chemical Company (Ann Arbor, Michigan, USA)
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland; Hauptsitz: Waltham, Massachusetts, USA)
GoTaq qPCR Master Mix 2x	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland; Hauptsitz: Madison, Wisconsin, USA)
GoTaq qPCR Master Mix Kit	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland; Hauptsitz: Madison, Wisconsin, USA)
Midori Green Xtra	Nippon Genetics Europe GmbH (Düren, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl), 0,9 %	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Ribonukleasen/Desoxyribonukleasen (RNAse/DNAse)-freies, steriles Wasser	Gibco™ von Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland; Hauptsitz: Waltham, Massachusetts, USA)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Trypsin EDTA	Biological Industries (Kibbutz Beit-Haemek, Israel)
Voll entsalztes Wasser	Hergestellt über eine Anlage von Millipore, Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Wasserfreie Essigsäure	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)

3.1.3 Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz 5' -> 3'	Publikation	Hersteller
HYq4_forward (for)	GCT TCG AAA TAC GAA ACG TG	Gmiterek et al. (2013)	eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
HYq4_reverse (rev)	TAT ATC CGT CTG TCG GAA CG	Gmiterek et al. (2013)	eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)

Oligonukleotid	Sequenz 5' -> 3'	Publikation	Hersteller
Pg_for	AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG	Matto et al. (1998)	eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
Pg_for2	GGA AGA GAA GAC CGT AGC ACA AGG A	Park et al. (2011)	eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
Pg_for3	ATA GTA GCG TGT CCG GCT TC	Tomas et al. (2017)	eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
Pg_rev	ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	Matto et al. (1998)	eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
Pg_rev2	GAG TAG GCG AAA CGT CCA TCA GGT C	Park et al. (2011)	eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
Pg_rev3	ATC GTA GGC GGA TTG GAG A	Tomàs et al. (2017)	eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
U1 for	ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT	Walter et al. (2000)	eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
U1 rev	GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C	Walter et al. (2000)	eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)

3.1.4 Peptide

Peptid	Abfolge	Hersteller
3107-v	Boc-Phe-Ser-Arg-MCA	Peptide Institute, Inc.; Pepta Nova GmbH (Sandhausen, Deutschland)
3215-v	Z-His-Glu-Lys-MCA	Peptide Institute, Inc.; Pepta Nova GmbH (Sandhausen, Deutschland)

3.1.5 Bakterien

Bakterien	Hersteller
Inaktive <i>P. gingivalis</i>	Sigma-Aldrich GmbH (Hauptsitz: St. Louis, Missouri, USA), Tochtergesellschaft Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) Suspension (OP50)	Caenorhabditis Genetics Center, CGC (Minneapolis, Minnesota, USA)

3.2 Methoden

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Methoden beschrieben. Es werden die Rekrutierung der Probanden und die Gewinnung der Daten, sowie der Gewinn und die Aufbereitung der Proben aufgezeigt. Außerdem wird die Durchführung der *Real-Time* PCR (qPCR) und des Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers (auch Förster Resonanz Energie Transfer genannt, FRET), die Erstellung des Fragebogens zur Zahngesundheit, sowie die statistische Auswertung erläutert.

3.2.1 Rekrutierung der Probanden

Die Rekrutierung der Probanden erfolgte durch die Studie „Biopsychologische Mechanismen der Stressbelastung und der Resilienzfaktoren im Alltag von pflegenden Angehörigen von

Menschen mit Demenz“ des Zentrums für psychische Gesundheit im Alter (ZpGA) (Wuttke et al., 2023). Sie wird mit EMA-DEM abgekürzt. Ursprünglich geplant war, dass insgesamt 70 pflegende Angehörige für 14 Tage an einem ambulanten Assessment teilnehmen. Die Ein- und Ausschlusskriterien für die pflegenden Angehörigen wurden entsprechend Tabelle 3 definiert. Im Dezember 2020 und im Januar 2021 wurden Informationen zu dem Studienablauf an Pflegestützpunkte, ambulante Pflegedienste sowie Gesprächs- und Selbsthilfegruppen für pflegende Angehörige in Mainz, Wiesbaden und Umgebung versendet. Zusätzlich wurden auch Ärztinnen und Ärzte sowie die Gedächtnisambulanz in Mainz und Darmstadt und die Alzheimer Gesellschaft in Wiesbaden um Auslage von Flyern zum Studienvorhaben gebeten. Letztlich konnten nur 20 Teilnehmende in die Studie einbezogen werden. Weitere 29 pflegende Angehörige, die Interesse an der Teilnahme zeigten, mussten aus unterschiedlichen Gründen ausgeschlossen werden (mündliche Information Svenja Palm, ZpGA, Studiengruppe).

Einschluss	Ausschluss
<ul style="list-style-type: none"> - Mindestens 18 Jahre - Primär pflegende/-r Angehörige/-r - Informell pflegende/-r Angehörige/-r - Regelmäßiger Kontakt zum Menschen mit Demenz bzw. <i>Mild Cognitive Impairment</i> (MCI) (mindestens einmal täglich) - Größte zeitliche Verfügbarkeit gegenüber dem pflegebedürftigen Angehörigen im Vergleich zu anderen Kümmerern - <i>Body Mass Index</i> (BMI) zwischen 18 und 30 - Sprache: fließend deutsch - <i>Mini-Mental-Status-Test</i> (MMST) \geq 26 	<ul style="list-style-type: none"> - Raucherin/Raucher (> 5 Zigaretten/Tag) - Professioneller pflegende/-r Angehörige/-r, die/der im Rahmen der beruflichen Tätigkeit den Menschen mit Demenz bzw. MCI pflegt, sowie eine 24-Stunden Kraft - Schwangere und/oder Stillende - Einnahme von Medikamenten mit immunologischer oder endokriner Wirkung oder Wirkung auf das autonome Nervensystem - Chronisch entzündliche Erkrankungen: schwere depressive Episode mit psychotischen Symptomen; wahnhaftige Störung

Tabelle 3: Ein- und Ausschlusskriterien für pflegende Angehörige

3.2.2 Gewinnung von Daten

Wie bereits oben genannt, wurde die EMA-DEM-Studie vom ZpGA durchgeführt. Die Probanden wurden gebeten, über 14 Tage sechs Mal am Tag subjektive Angaben zu ihrer Stressbelastung und ihrem Umgang mit Stress zu machen. Zeitgleich wurde zu jedem Messzeitpunkt eine Speichelprobe zur späteren Analyse der Stressmarker Alpha-Amylase und Cortisol genommen. Dies waren jedoch nicht die Speichelproben, die für die Mikrobiomanalyse verwendet wurden. Parallel dazu wurde über einen Brustgurt-Sensor kontinuierlich ein Elektrokardiogramm (EKG) gemessen, wodurch die Herzratenvariabilität (HRV) ermittelt wurde.



Abbildung 4: Muster der Probenentnahme

Am Ende der Datenerhebung wurden die Probanden gebeten, zwei Haarsträhnen am Hinterkopf zur Messung von Haarcortisol abzugeben. Die Haarproben wurden bis zum Abschluss der Datenerhebung dunkel und versiegelt aufbewahrt und anschließend gemäß der Methode von Wuttke-Linnemann et al. (2022b) analysiert. Nach einem mehrstufigen Prozess aus Waschen, Schneiden, Inkubieren, Trocknen, Resuspendieren und Vortexen wurde die Cortisolkonzentration mithilfe eines Cortisol-Lumineszenz-Immunoassays (LIA; IBL International, Tecan Group Company, Hamburg) aus den proximalen 2cm der Haarsträhnen bestimmt. Der *Intra-Assay-Variationskoeffizient* betrug 1,75 % und der *Inter-Assay-Variationskoeffizient* 4,62 %. Die im Rahmen der EMA-DEM-Studie erhobenen Daten wurden für diese Arbeit zur weiteren statistischen Analyse verwendet.

Zusätzlich wurde im Rahmen eines Vor- und Nachgesprächs zu Beginn und Ende der Datenerhebung bei jedem Probanden jeweils eine Speichelprobe zwischen 9:00 und 16:00 Uhr entnommen. Diese Speichelproben wurden für diese Arbeit zur biochemischen Analyse verwendet.

3.2.3 Gewinnung der Proben

Die Speichelproben wurden wie bereits erwähnt zu Beginn (t₀) und Ende (t₁) der Datenerhebung von jedem Probanden im Rahmen der EMA-DEM-Studie selbst entnommen und in einem *SaliCap* gelagert. Dazu erhielten die Probanden bestimmte Anweisungen. Der Mund sollte mit klarem Wasser gespült werden, um anschließend den Speichel für zwei Minuten im Mund zu sammeln, ohne ihn herunterzuschlucken oder absichtlich den Speichelfluss anzuregen. Anschließend sollte der Speichel über einen Strohhalm oder direkt in das *SaliCap* eingeführt werden. Dies fand zwischen März 2021 und Januar 2023 statt. Die Teilnehmenden waren dazu angehalten, die einzelnen Proben direkt ins Gefrierfach (-18 °C) zu legen. Nach Abgabe im Studienzentrum im Laufe einer Woche nach t₀ beziehungsweise t₁ wurden die Proben bei -80 °C gelagert. Von den insgesamt 40 Proben fehlten vier: beide Proben des Probanden Nr. 15 sowie die Proben zu t₁ der Probanden Nr. 16 und Nr. 18. Darüber hinaus konnte eine Probe aufgrund fehlender Beschriftung nicht zugeordnet werden. Damit lagen 35 Speichelproben für die Analyse vor. Für die Analysen, bei denen kein Vergleich zwischen t₀ und t₁ erfolgte, lagen 36 Proben vor, da hier auch die nicht zuzuordnende Probe genutzt werden konnte.

Außerdem wurde eine eigene Speichelprobe entnommen und in einem Eppendorf Röhrchen ebenfalls bei -80 °C gelagert. Diese diente der Etablierung der Methoden, bevor mit Probandenmaterial gearbeitet wurde. Zusätzlich wurde mit inaktiver *P. gingivalis* Suspension gearbeitet (siehe 3.1.5). Dazu wurde 1mg *P. gingivalis* in 50 µl NaCl suspendiert. Die OP50 *E. coli* Suspension wurde käuflich erworben (siehe 3.1.5) und wurde im Rahmen der Vortests zur Etablierung der Methoden als Negativkontrolle genutzt, da *E. coli* zum Beispiel keine Gingipaine produziert.

3.2.4 Aufbereitung der Proben

Für die Durchführung der qPCR wurden die Proben mithilfe von Chelex-100 aufbereitet. Dies ist ein Styrol-Divinylbenzol-Copolymer, welches Iminodieacetat-Ionen enthält, die als Chelatbildner wirken. Durch das Prinzip des Ionenaustauschs wird es zur Reinigung von Proben und zur Vorbereitung für die Durchführung einer PCR verwendet (Matto et al., 1998). Zuerst wurde eine 25 %ige Chelex-100 Lösung (w/v) angesetzt. Davon wurden je 12,5 µl zu 50 µl jeder Speichelprobe hinzupipettiert. Anschließend wurden die Proben zur Inkubation für 30 Minuten bei 56 °C und 750 rpm in den Eppendorf Thermomixer gestellt. Danach wurden die Proben bei 95 °C und 750 rpm für 10 Minuten gekocht, um schließlich für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 10.000g zentrifugiert zu werden. Der Überstand wurde in neue Eppendorf Röhrchen pipettiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für den FRET-Assay wurden ebenfalls je 50µl der Originalprobe abgenommen und mit je 2 µl RNase/DNase-freiem, sterilen Wasser verdünnt. Diese Proben wurden dann bei -80 °C gelagert. Für die Vortests wurden zusätzlich zwei weitere Proben vorbereitet. Zum einen wurde eine Probe mit denaturiertem Speichel vorbereitet. Wie oben bereits beschrieben, wurden

dazu 50 µl der eigenen Speichelprobe mit 2 µl RNase/DNase-freiem, sterilem Wasser verdünnt und anschließend für 10 Minuten bei 95 °C und 300 rpm im Eppendorf Thermomixer inkubiert. Zum anderen wurden für die Vorbereitung einer Protease-haltigen Probe 2 µl Trypsin-EDTA (0,5 %/0,2 %) zu 50 µl der eigenen Speichelprobe hinzupipettiert.

3.2.5 Messung der Gesamtkeimmenge und der *P. gingivalis*-Menge mithilfe der *Real-Time* PCR

Mithilfe der qPCR kann ein Nachweis und eine Quantifizierung von Nukleinsäuren erfolgen. Hierbei wird in Echtzeit die Fluoreszenz eines Farbstoffs gemessen, der spezifisch an doppelsträngige DNA (dsDNA) bindet. Wird die Zielsequenz der eingesetzten Oligonukleotide amplifiziert, führt dies zu einer Erhöhung des Fluoreszenzsignals. Dies ist wiederum proportional zur der bei dem entsprechenden PCR-Zyklus vorhandenen dsDNA Menge. Um eine ungenaue Quantifizierung zu vermeiden und sicherzustellen, dass nur die Zielsequenz amplifiziert wurde, wird für jede qPCR eine Schmelz-Kurve erstellt.

Die verwendeten Oligonukleotide (siehe 3.1.3) mussten zunächst vorbereitet werden. Dazu wurden sie ad 100 µM angesetzt. Es wurde RNase/DNase-freies, steriles Wasser genutzt. Danach mussten die Oligonukleotide bei Raumtemperatur für 10 Minuten ruhen, um anschließend auf dem Vortexschüttler durchmischen zu werden. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Schließlich wurde je Oligonukleotid 10 µl entnommen und mit sterilem Wasser ad 10 µM verdünnt. Die qPCR wurde in einem Reaktionsvolumen von insgesamt 20 µl angesetzt. Hierzu wurden 2 µl der mit Chelex-100 gereinigten Speichelprobe (siehe 3.2.4) und 18 µl Mischung der PCR-Komponenten, bestehend aus 10 µl der Polymerase-Reaktions-Mischung (GoTaq qPCR *Master Mix*), je 1 µl des *forward* und *reverse* Oligonukleotids, 0,2 µl des Referenzfarbstoffs (*CXR Reference Dye*) und 5,8 µl RNase/DNase freiem, sterilem Wasser, vermischt. Die Negativkontrolle beinhaltete 2 µl RNase/DNase-freies, steriles Wasser, wohingegen die Positivkontrolle mithilfe 2 µl *P. gingivalis*-Suspension durchgeführt wurde. Zur Erstellung einer Standardreihe wurde für jede qPCR die folgende Verdünnungsreihe der Positivkontrolle in Duplikaten angesetzt. Für den Nachweis der Gesamtkeimmenge wurde die Verdünnungsreihe in den Stufen unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000 angesetzt. Für den Nachweis von *P. gingivalis* wurde sie unverdünnt, sowie in den Verdünnungen 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 angesetzt. Für die Verdünnung wurde RNase/DNase-freies, steriles Wasser verwendet. Dadurch konnte auch die Effizienz der qPCR wie folgt berechnet werden. Da die Proben in Duplikaten angesetzt wurden, erhielt man zwei Ct-Werte für jede Verdünnung. Daraus musste zunächst der Mittelwert der *cycle threshold*-(Ct)-Werte gebildet werden. Anschließend wurde der Logarithmus von jedem Verdünnungsfaktor gebildet. Somit erhielt man eine Gerade mit einer bestimmten Steigung *m*. Um die Effizienz des Oligonukleotids zu berechnen, wurden die Werte in die folgende Gleichung eingesetzt:

$$\text{Effizienz (\%)} = \left(10^{\frac{-1}{m}} - 1\right) \times 100$$

Um eine Vergleichbarkeit der Amplifikate mit der Standardreihe zu gewährleisten, wurden die zuvor aufbereiteten Speichelproben vor der Durchführung der qPCR zusätzlich 1:100 für den Nachweis der Gesamtkeimzahl und 1:4 für den Nachweis von *P. gingivalis* mit RNase/DNase-freiem, sterilem Wasser verdünnt. Die Bedingungen für die qPCR umfassten eine initiale Aktivierung der Polymerase bei 95 °C für 2 Minuten. Es folgten 40 Zyklen der Denaturierung bei 95 °C für 15 Sekunden mit anschließender Anlagerung der Oligonukleotide und Elongation bei 60 °C für eine Minute. Die Detektion der qPCR-Produkte erfolgte in der Elongationsphase.

3.2.6 Gelelektrophorese

Im Rahmen von Vortests wurde zur Kontrolle der Größe der qPCR-Amplifikate eine Gelelektrophorese durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde ein 2 %iges Agarosegel gegossen. Dazu wurde 1,2 g Biozym LE Agarose in 60 g 1x Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Acetat-EDTA-(TAE)-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht und gelöst. Der TAE-Puffer wurde zunächst als 50x TAE-Puffer mit einem Volumen von 500 ml wie folgt angesetzt: 121 g TRIS (\cong 2M), 30 ml wasserfreie Essigsäure (\cong 1 M) und 9,3 g EDTA·2H₂O (\cong 50 mM). Anschließend wurde

der 50x TAE-Puffer durch Zugabe von RNase/DNase- freiem, sterilem Wasser zu einem 1x TAE-Puffer verdünnt. Die nächsten Schritte erfolgten unter dem Abzug. 5 µl des Farbstoffs *Midori Green* wurden hinzugefügt und durch leichtes Schwenken aufgelöst. Schließlich wurde die Flüssigkeit in eine Gel-Form mit entsprechendem Kamm gegossen. Dies musste nun für 30 Minuten unter dem Abzug härten. Währenddessen konnten die Proben vorbereitet werden. In jede Probe wurden 2 µl des Auftragspuffers (*DNA Loading Dye 6x, Thermo Fisher Scientific*) pipettiert. Die Gel-Form wurde in die Gelelektrophorese Kammer gestellt, welche mit TAE-Puffer gefüllt wurde, bis das gesamte Gel bedeckt war. Der Kamm wurde vorsichtig entfernt. Anschließend wurden 4 µl Marker (100 bp Marker) in eine Tasche und je 10 µl der Proben in die weiteren Taschen pipettiert. Das Pipettierschema ist in Tabelle 4 dargestellt.

4 µl 100 bp Marker	10 µl Probe 1 Positiv- kontrolle	10 µl Probe 1 Negativ- kontrolle	10 µl Probe 2 Positiv- kontrolle	10 µl Probe 2 Negativ- kontrolle	...	10 µl Probe x
--------------------------	---	---	---	---	-----	------------------

Tabelle 4: Pipettierschema Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde gestartet und erfolgte für circa 30 Minuten bei 150V. Schließlich konnte das Gel auf den Transilluminator gelegt und die Größe der Amplifikate durch die entstandenen Banden anhand des Vergleichs mit dem DNA-Marker unter UV-Licht abgelesen werden.

3.2.7 FRET-Assay zur Bestimmung der Gingipain Aktivität

Zur Detektion der Enzymaktivität der Gingipaine im Speichel, wurden FRET-Assays durchgeführt. FRET steht für Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer, oder auch Förster Resonanz Energie Transfer, benannt nach dem Physikochemiker Theodor Förster. FRET kann – abhängig von der Distanz – zwischen zwei Molekülen, die zur Fluoreszenz befähigt sind, beobachtet werden. Wird ein Donor mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (λ_1) angeregt, dann überträgt dieser die Energie (λ_x) über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf einen fluoreszierenden Akzeptor, welcher diese dann mit einer bestimmten Wellenlänge abgibt (λ_2) (siehe Abbildung 5A). Dabei wird die Donorfluoreszenz reduziert und gleichzeitig die Akzeptorfluoreszenz verstärkt. Handelt es sich um einen nicht-fluoreszierenden Akzeptor, spricht man auch von einem *Quencher*, da er die Fluoreszenz des Donors unterdrückt. Sind Donor und Akzeptor jedoch zu weit voneinander entfernt, kann kein FRET detektiert werden. Das bedeutet, dass der angeregte Donor seine Energie in Form von Fluoreszenz abgibt, statt sie an den Akzeptor zu übertragen. Diese Technik wird verwendet, um molekulare Interaktionen, wie etwa Protein-Protein-Interaktionen, zu analysieren. Das in dieser Studie angewendete FRET-Prinzip basierte auf Peptiden mit fluoreszierenden funktionellen Gruppen an beiden Enden (F1 und F2). Werden diese Peptide nun durch Gingipaine im Speichel gespalten, so ist die Distanz zwischen F1 und F2 zu groß, und es kann kein Energietransfer stattfinden. Somit gibt F1 seine Energie in Form von Fluoreszenz (λ_3) ab, die gemessen werden kann (siehe Abbildung 5B). Bleibt die Spaltung aus, kann der Energietransfer wie oben beschrieben stattfinden. Da das Fluoreszenzmessgerät auf eine bestimmte Wellenlänge (siehe unten) eingestellt ist, welche nur zum angeregten Ende F1 passt, kann in dem Fall keine Fluoreszenz gemessen werden. Die hier verwendeten Peptide sind unter 3.1.4 aufgelistet.

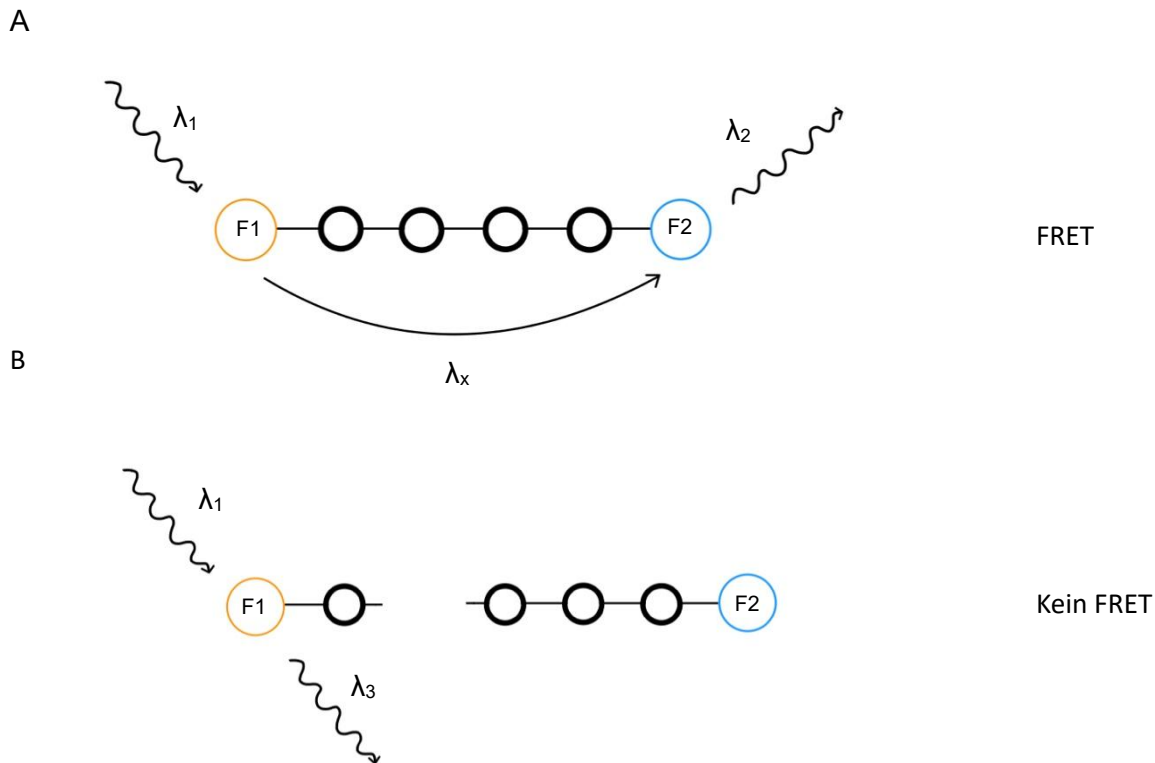


Abbildung 5: Schematische Darstellung von FRET

A zeigt ein ungespaltenes Peptid, B ein gespaltenes Peptid. Beide tragen die funktionellen Gruppen F1 und F2. A: F1 wird angeregt (λ_1) und überträgt Energie (λ_x) auf F2, welches entsprechend λ_2 emittiert. FRET findet damit statt. B: Durch die Spaltung ist der Abstand zwischen F1 und F2 zu groß, sodass kein Energietransfer von F1 auf F2 erfolgen kann. Damit ist kein FRET detektierbar. Stattdessen gibt F1 die Energie in Form von Fluoreszenz (λ_3) ab, die gemessen werden kann. (Abbildung selbst erstellt)

P. gingivalis besitzt eine Vielzahl von Gingipainen, die zu dessen Virulenzfaktoren zählen (Zenobia und Hajishengallis, 2015). Für diese Arbeit wurden Peptide verwendet, die Substrate für zwei dieser Gingipaine sind. Während das Peptid 3107 ein Substrat für Arg-Gingipain ist, ist das Peptid 3215 ein Substrat für Lys-Gingipain (*PeptideCutter Expsy*; Gasteiger et al., 2005). Für die Durchführung der Assays wurde das entsprechende Peptid durch Zugabe von NaCl ad 1 mM angesetzt. Für die folgenden Schritte wurde eine 384-Loch-Platte verwendet. In jede Vertiefung dieser Platte wurden 2 μ l Peptid, 13 μ l NaCl-Lösung und 5 μ l der zuvor verdünnten Speichelprobe (siehe 3.2.4) pipettiert. Nach einer zehnmütigen Inkubation im Eppendorf Thermomixer bei 37 °C und 300 rpm konnte schließlich die Fluoreszenz mithilfe des Fluoreszenz-Messgeräts bei einer Exzitation von 380 nm und einer Emission von 460 nm gemessen werden. Die Anzahl der Zyklen der Messung richtete sich nach der im Rahmen von Vortests ermittelten Dauer des linearen Anstiegs. Für jeden Probanden wurde schließlich die relative Fluoreszenzeinheit pro Minute (RFU/min) errechnet. Im Rahmen der Vortests zur Etablierung der Methoden wurden außerdem auch die denaturierte Speichelprobe und die Speichelprobe, die Trypsin enthält, untersucht. Diese sind unter 3.2.4 aufgezählt. Trypsin kann ebenso wie Arg-Gingipain das Peptid 3107 spalten (*PeptideCutter Expsy*; Gasteiger et al., 2005).

Zudem wurde mit Gallo catechingallat (GCG) – einem Inhibitor von Gingipain – gearbeitet. Dazu wurde 1mg GCG in 218 μ l DMSO gelöst, sodass eine Konzentration von 10 mM vorlag. Für diesen FRET-Assay wurde ebenfalls eine 384-Loch-Platte verwendet. Die zuvor gemäß 3.2.4 aufbereitete eigene Speichelprobe wurde jeweils in Quadruplikaten von 0 μ l, 1 μ l, 5 μ l und 10 μ l in die Vertiefungen pipettiert. Anschließend wurde NaCl-Lösung hinzupipettiert, sodass man jeweils ein Volumen von 16 μ l erhielt. In die ersten beiden Ausführungen wurden

je 2 µl des GCG und je 2 µl des Peptids und in die letzten beiden Ausführungen je 2 µl DMSO hinzupipettiert (siehe Tabelle 5). Die Inkubation der Proben und die Fluoreszenzmessung erfolgten wie bereits oben beschrieben. Für die Fluoreszenzmessung wurde eine Zyklusdauer von 60 Minuten gewählt.

Probe	0	1	5	10	x2
NaCl	16	15	11	6	
GCG	2	2	2	2	
Peptid	2	2	2	2	

Probe	0	1	5	10	x2
NaCl	16	15	11	6	
DMSO	4	4	4	4	

Tabelle 5: Pipettierschema des FRET-Assays mit dem Inhibitor GCG.
(Alle Angaben in µl)

3.2.8 Zahngesundheitsbefragung

Zusätzlich zu der Analyse der Speichelproben wurde eine telefonische Befragung zur Zahngesundheit durchgeführt. Hierzu wurden die Probanden per Post informiert und eingeladen. Zwölf von ehemals 20 Probanden gaben Ihre Zustimmung zur Befragung. Diese fand ein bis drei Jahre nach Sammlung der Speichelproben im Zeitraum von November 2023 bis Januar 2024 statt.

Der Fragebogen orientierte sich an dem Parodontitis-Selbsttest der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie (Kocher et al., 2018). Ergänzt wurde dieser um einige weitere Fragen mit den folgenden Aspekten. Der aktuelle Zahnstatus (Zahnanzahl, Zahnersatz, Restaurationen) wurde abgefragt, um einen Überblick zu erhalten. Zudem wurde auch nach der Körpergröße und dem Körpergewicht zur Ermittlung des BMI gefragt, da eine Assoziation von Adipositas mit Parodontitis beobachtet wurde (Suvan et al., 2011). Auch das Abfragen der Mundhygiene war Teil der Befragung, da eine Vernachlässigung der Mundhygiene zu Entzündungen führt. Das Vorhandensein von Parodontitis in der Familie ist ebenfalls ein wichtiger Aspekt, weil eine Vererbbarkeit nachgewiesen wurde (Loe et al., 1986; Vieira und Albandar, 2014). Schließlich sollte auch die Abfrage kardiovaskulärer Erkrankungen und rheumatoider Arthritis erfolgen. Zum einen dient sie der Erfassung der Anamnese des Probanden und zum anderen sind Wechselwirkungen zwischen einigen systemischen Erkrankungen und Parodontitis bekannt (Jepsen et al., 2011). Im Anhang unter 8.1 und 8.2 sind sowohl die Befragung zur Zahngesundheit als auch das Bepunktungsschema zur Auswertung zu finden. Tabelle 6 zeigt die finale Auswertung.

Erreichte Punktzahl	Risiko für das Vorliegen einer Parodontitis	Gruppe
0-7	4-23 %	1
8-11	33-45 %	2
12-14	58-69 %	3
15-17	79-86 %	4
18-34	91-100 %	5

Tabelle 6: Auswertungsschema der Zahngesundheitsbefragung

3.2.9 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde *Graph Pad Prism 10 (Dotmatics, Version 10.4.1)* genutzt. Unterschiedliche statistische Tests wurden angewandt: one-way Anova in Kombination mit Fisher's LSD, der Šídák's multiple comparisons Test, die Spearman-Korrelation sowie die Erstellung von linearen Regressionsgeraden.

4. Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse zur Untersuchung der Abhängigkeit von *P. gingivalis* und Stress beziehungsweise dem Parodontitis-Status in pflegenden Angehörigen von Patienten mit Alzheimer-Demenz aufgezeigt.

4.1 Ergebnisse der Vortests zur Etablierung der Methoden

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Vortests präsentiert. Die Vortests dienen der Etablierung der Methoden für die spätere Analyse der Probanden-Speichelproben. Mithilfe der qPCR wurden die zur Auswahl stehenden Oligonukleotide auf ihre Funktionsfähigkeit und Effizienz untersucht. Außerdem wurde getestet, ob mithilfe eines FRET-Assays eine Gingipain-Aktivität im Speichel messbar ist und welche Probenmenge zu einem messbaren Ergebnis führt.

4.1.1 Auswahl geeigneter Oligonukleotid-Paare

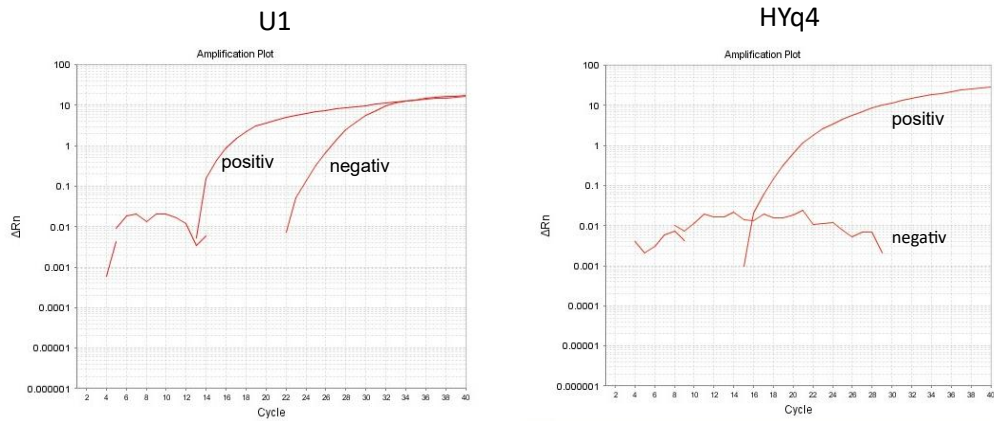
Für die Vortests wurde mit einer selbst gewonnenen Speichelprobe gearbeitet (siehe 3.2.3). Mit dem ersten Vortest sollte untersucht werden, ob die ausgewählten Oligonukleotid-Paare Amplifikate der gewünschten Größe und Spezifität erzielen.

Für den Gesamtkeimzahlnachweis wurde das universelle Oligonukleotid-Paar U1 *forward* und *reverse* genutzt. Für den Nachweis von *P. gingivalis* wurden mehrere Oligonukleotid-Paare getestet: Pg, Pg2, Pg3 und HYq4 (s. 3.1.3). Für jedes Oligonukleotid-Paar wurde, wie in Abschnitt 3.2.5 erläutert, eine qPCR mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle durchgeführt. Abbildung 6A zeigt die Ergebnisse der qPCR. Für die Oligonukleotid-Paare Pg und Pg2 konnte kein Amplifikat nachgewiesen werden (Ergebnisse hier nicht gezeigt). Die Oligonukleotid-Paare U1, Pg3 (hier nicht gezeigt) und HYq4 hingegen, zeigten sowohl ein Amplifikat als auch eine Schmelzkurve mit jeweils einem Maximum. Dies deutet darauf hin, dass ein spezifisches PCR-Produkt vorliegt. Für die Negativkontrolle konnte bei Pg3 und HYq4 wie erwartet kein Amplifikat nachgewiesen werden. Bei dem universellen Oligonukleotid-Paar U1 ist für die Negativkontrolle ebenfalls ein Amplifikat nachweisbar. Dies liegt vermutlich an einer Kontamination der Probe beziehungsweise an der Schwierigkeit, dass auch die Raumluft bei Erstellung der Proben eine gewisse Bakterienbelastung mit sich bringt. Hierdurch lassen sich bei der Anwendung universeller Oligonukleotide gewisse Grade an Signal nur sehr aufwändig vermeiden.

Zur Kontrolle, ob die Amplifikate die zu erwartende Größe haben, wurde entsprechend Abschnitt 3.2.6 eine Gelelektrophorese durchgeführt. Zu erwarten waren für die Positivkontrollen 200 bp für U1 (Walter et al., 2000), 143 bp für Pg3 (Park et al., 2011) und 214 bp für HYq4 (Gmiterek et al., 2013). Für die Negativkontrollen von Pg3 und HYq4 sind keine Banden zu erwarten. Abbildung 6B zeigt das Agarosegel der Gelelektrophorese mit angefärbten DNA-Banden. Der Basenpaar-Marker beinhaltet DNA-Fragmente in 100 bp-Schritten. Die am stärksten hyperdense Bande zeigt 500 bp an. Alle Oligonukleotid-Paare zeigen für die Positivproben Amplifikate der richtigen Größe. Lediglich HYq4 zeigt wider Erwarten eine Bande in der Negativkontrolle. Dies kann jedoch vernachlässigt werden, da die *Real-Time* PCR kein Amplifikat gezeigt hat und die sichtbare Bande damit auf Kontamination bei der Pipettierung für die Gelelektrophorese zurückzuführen ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Amplifikate der drei Oligonukleotid-Paare die richtige Größe und eine ausreichende Spezifität gegenüber der Negativkontrolle aufweisen. Somit kann U1 für den Nachweis der Gesamtkeimmenge verwendet werden. Für den Nachweis von *P. gingivalis* wurde das Oligonukleotid-Paar Hyq4 ausgewählt. Pg3 hat zwar ebenfalls Amplifikate der richtigen Größe erzeugen können, jedoch ist HYq4 mit einer Amplifikatsgröße von 214 bp näher an der Amplifikatsgröße von U1 mit 200 bp, als Pg3 mit 143 bp. Somit lässt sich eine ähnliche Effizienz für die qPCR erwarten.

A



B

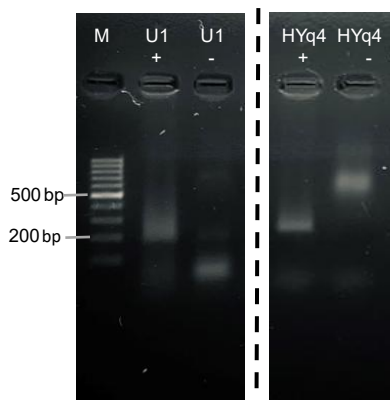


Abbildung 6: qPCR zur Etablierung der Methoden

Um zu untersuchen, ob die Oligonukleotid-Paare Amplifikate der gewünschten Größe und Spezifität erzielen, wurden jeweils eine Positiv- und eine Negativprobe mittels qPCR untersucht. Die Positivprobe (+) für das universelle Oligonukleotid-Paar U1 setzt sich zusammen aus 50 μ l der eigenen Speichelprobe (siehe 3.2.3) und 0,5 μ l sterilem H₂O. Die Positivprobe (+) für HYq4 besteht aus 50 μ l Speichel und 0,5 μ l *P. gingivalis*-Suspension. Die Negativproben (-) beinhalten lediglich steriles H₂O. Die qPCR wurde entsprechend Kapitel 3.2.5 durchgeführt. A zeigt die Amplifikate für U1 (links) und HYq4 (rechts), B zeigt das Agarosegel der Gelelektrophorese zur Bestimmung der Größe der Amplifikate der untersuchten Oligonukleotid-Paare. M zeigt den Basenpaar-Marker, welcher DNA-Fragmente in 100 bp-Schritten beinhaltet. Die am stärksten hyperdense Bande zeigt 500 bp an. Irrelevante Proben wurden hier außer Betracht gelassen. Die gestrichelte Linie zeigt die Stelle, an der die irrelevanten Proben rausgeschnitten wurden.

4.1.2 Effizienz der Real-Time PCR

Zur Ermittlung der Effizienz der qPCR mit den Oligonukleotid-Paaren U1 und HYq4 wurde entsprechend Kapitel 3.2.5 eine qPCR mit einer Verdünnungsreihe durchgeführt. Die Effizienz ist definiert als der Anteil der Zielmoleküle, die in einem PCR-Zyklus repliziert werden. Eine Effizienz von mindestens 90 % ist demnach ideal (Svec et al., 2015).

Zunächst wurde sowohl für U1 als auch für HYq4 mit der folgenden Verdünnungsreihe gearbeitet: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000, 1:100 000. Die Negativkontrolle beinhaltete RNase/DNase-freies, steriles Wasser. Da das Oligonukleotid-Paar U1 bei einer Verdünnung von 1:100 000 kein Amplifikat ergab und beim Oligonukleotid-Paar HYq4 nur die Verdünnungen 1:10 und 1:100 ein Amplifikat zeigten, wurde die Untersuchung als ungeeignet eingestuft. Die entsprechenden Ergebnisse werden daher nicht gezeigt. Infolgedessen wurde

die Standardreihe für die qPCR mit den Speichelproben der Probanden angepasst. Zusätzlich zu der unverdünnten Probe wurde für U1 die Speichelprobe mit dem Faktor 10, 100, 1000 und 10 000 verdünnt (siehe Abbildung 7).

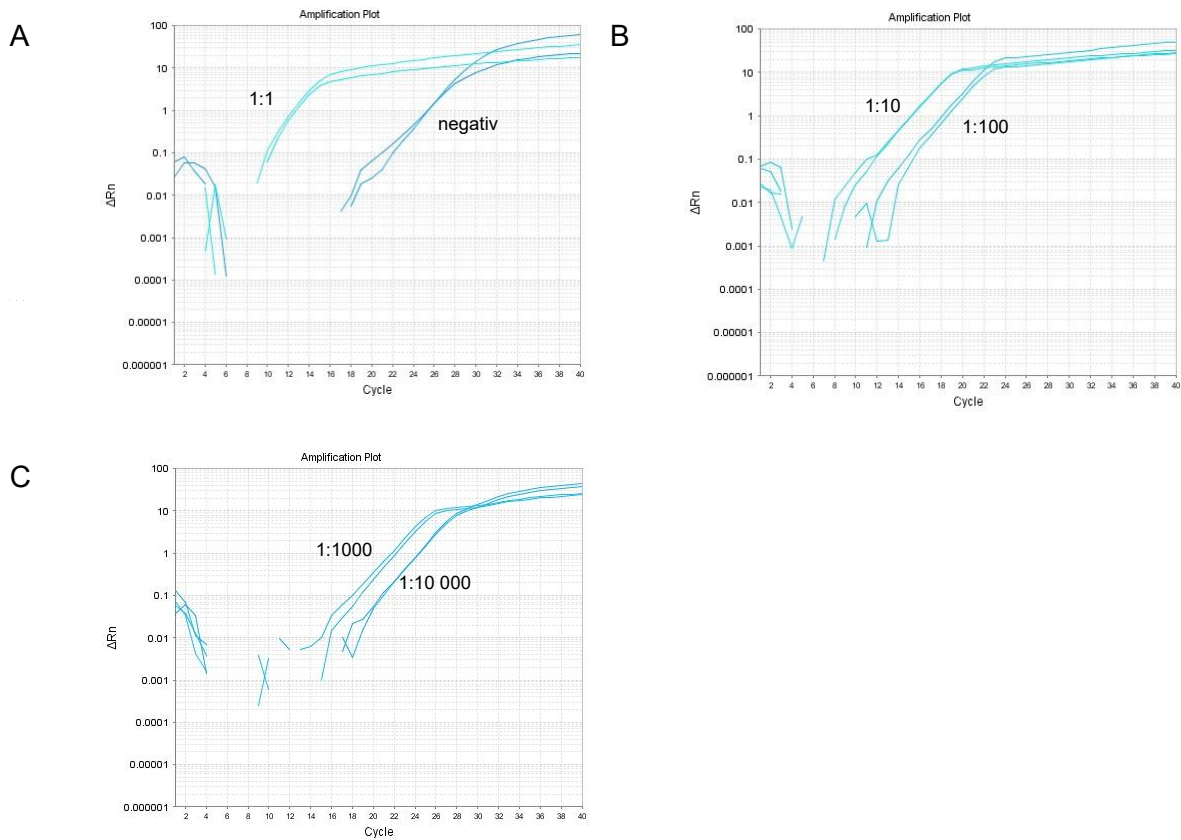


Abbildung 7: qPCR der Verdünnungsreihe des Oligonukleotid-Paars U1

Es wurde entsprechend 3.2.5 eine qPCR mit einer Verdünnungsreihe des Oligonukleotid-Paars U1 durchgeführt. Hier werden die Amplifikatskurven der entsprechenden Proben gezeigt. A zeigt die Ergebnisse für die unverdünnte Probe (1:1) und für die Negativprobe. B zeigt die Ergebnisse für die Verdünnungsfaktoren 1:10 und 1:100 und C für 1:1000 und 1:10 000. Für jede Probe gilt $n = 2$.

Für Hyq4 wurde zusätzlich zur unverdünnten Probe die Verdünnungsreihe mit den Faktoren 2, 4, 8 und 16 erstellt (siehe Abbildung 8).

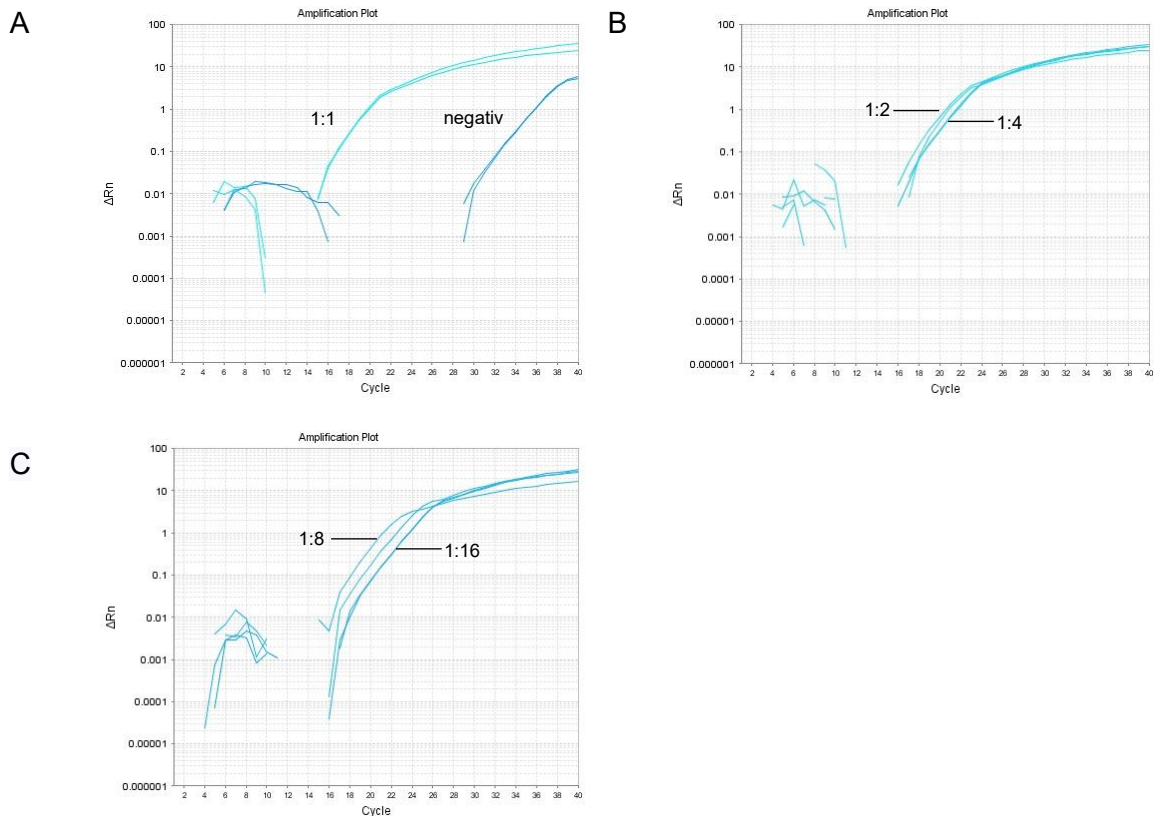


Abbildung 8: qPCR der Verdünnungsreihe des Oligonukleotid-Paars HYq4

Es wurde entsprechend Kapitel 3.2.5 eine qPCR mit einer Verdünnungsreihe des Oligonukleotid-Paars HYq4 durchgeführt. Hier werden die Amplifikate der entsprechenden Proben gezeigt. A stellt die Ergebnisse für die unverdünnte Probe (1:1) und für die Negativprobe dar. B zeigt die Ergebnisse für die Verdünnungsfaktoren 1:2 und 1:4 und C für 1:8 und 1:16. Für jede Probe gilt $n = 2$.

Durch die Berechnung mit der Formel unter 3.2.5 ergab sich für U1 eine Effizienz von 112 % und für HYq4 eine Effizienz von 136 % (siehe Abbildung 9).

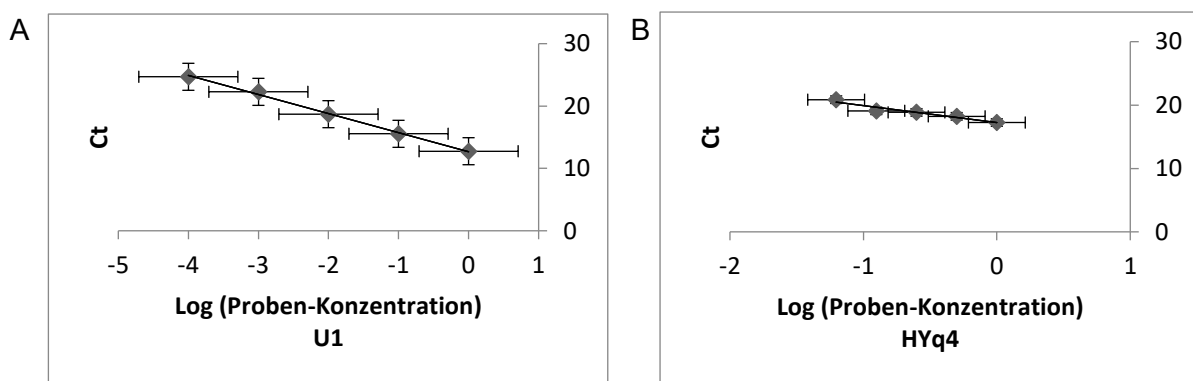


Abbildung 9: Darstellung der Effizienzermittlung der Oligonukleotid-Paare

Es wurde eine qPCR mit den Oligonukleotid-Paaren U1 und HYq4 durchgeführt (siehe 3.2.5). Für U1 wurde die Probe mit dem Faktor 10, 100, 1000 und 10 000 verdünnt. Für HYq4 mit dem Faktor 2, 4, 8 und 16. Zusätzlich wurde jeweils eine unverdünnte Probe untersucht. Die Berechnung der Effizienz erfolgte mit der unter Kapitel 3.2.5 aufgeführten Formel. A zeigt die Gerade zur Effizienzermittlung für U1 (Effizienz 112 %), und B zeigt sie für HYq4 (Effizienz 136 %). Die Y-Achse zeigt den C_t . Dies steht für threshold cycle und entspricht dem Amplifikationszyklus, bei dem die Reaktion in die exponentielle Phase eintritt.

4.1.3 Bestimmung der Gingipain-Aktivität im Speichel mittels FRET

P. gingivalis produziert verschiedene Gingipaine, die zu dessen Virulenzfaktoren zählen (Zenobia und Hajishengallis, 2015). Somit sollte der Nachweis von *P. gingivalis* nicht nur über die DNA, sondern auch über die Enzymaktivität der Gingipaine im Speichel erbracht werden können. Wie in Abschnitt 3.2.7 beschrieben, wurde ein FRET-Assay zur Bestimmung der Gingipain-Aktivität von Arg- und Lys-Gingipainen im Speichel durchgeführt. Zusätzlich wurde Trypsin genutzt, da eines der verwendeten Peptide (Peptid 3107) theoretisch auch durch Trypsin gespalten werden kann (siehe *ExPASy Peptide Cutter*; Gasteiger et al., 2005) und somit kontrolliert werden soll, ob Trypsin oder Trypsin-ähnliche Proteine aus dem Verdauungstrakt zu Artefakten führen könnten (Schlueter et al., 2012).

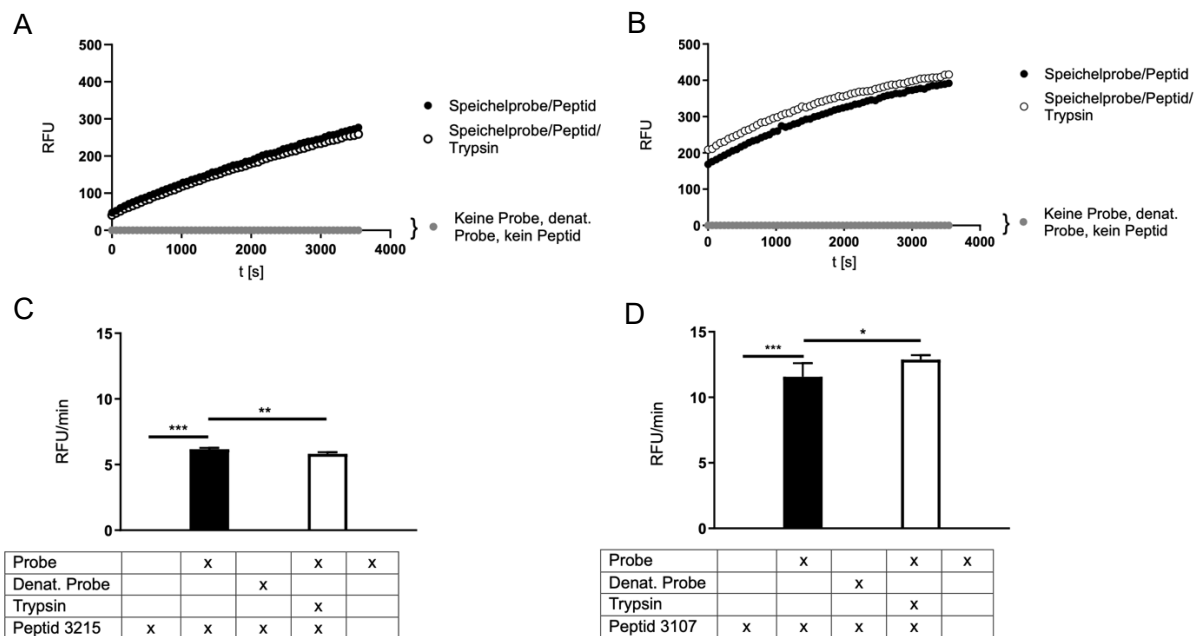


Abbildung 10: Bestimmung der Gingipain-Aktivität im Speichel mittels FRET-Methode

Um die enzymatische Aktivität der Gingipaine im Speichel zu untersuchen, wurde ein FRET-Assay mit den Peptiden 3215 (Substrat für Lys-Gingipain, siehe A und C) und 3107 (Substrat für Arg-Gingipain, siehe B und D) durchgeführt. Zusätzlich wurde der Probe Trypsin hinzugefügt, da das Peptid 3107 auch durch Trypsin gespalten werden kann. A und B zeigen den zeitlichen Verlauf der Reaktion, C und D zeigen die Auswertung der Steigung im Zeitraum des linearen Anstiegs. Für Peptid 3215 liegt dieser bei 16 bis 45 Minuten und für das Peptid 3107 bei 14 bis 40 Minuten. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen gezeigt ($n = 2$). Es wurden fünf unterschiedliche Proben – jeweils in Duplikaten – im FRET Assay analysiert. Die Proben wurden wie folgt zusammengesetzt: Peptid, Speichelprobe/Peptid, Speichelprobe/Peptid/Trypsin, die durch Erhitzen denaturierte Speichelprobe/Peptid/Trypsin und schließlich nur die Speichelprobe. Die Messung erfolgte bei 380 nm Exzitation und 460 nm Emission für 60 Minuten. Zur statistischen Auswertung wurden der one-way Anova und der Fisher's LSD Test angewandt (*, $p = 0,0423$; **, $p = 0,0041$; ***, $p < 0,0001$). RFU/min = relative Fluoreszenzeinheiten pro Minute

In Abbildung 10 sind die Ergebnisse des FRET-Assays zu sehen. Enthält die Probe lediglich das zu spaltende Peptid oder nur die Speichelprobe, so zeigte sich kein Anstieg der Fluoreszenz (Negativkontrolle). Somit lässt sich belegen, dass das Peptid nicht von allein gespalten wird (Autohydrolyse) und der Speichel allein kein Fluoreszenzsignal bildet. Wurde die Speichelprobe zuvor durch Erhitzen denaturiert, erfolgte ebenfalls kein Anstieg der

Fluoreszenz. Lediglich die Proben, die sowohl Peptid als auch Speichelprobe enthielten, zeigten einen Anstieg der Fluoreszenz über die Zeit (Abbildung 10 A und B). Wurde zusätzlich Trypsin zugesetzt, veränderte dies die Steigung der Reaktionsgeraden. Für Peptid 3215 war diese signifikant (um 0,3408 RFU/min, was 5,5 % entspricht) niedriger als bei der Reaktion ohne Trypsin ($p = 0,0041$, **; siehe Abbildung 10C). Für das Peptid 3107 hingegen, war die Steigung der Reaktion mit Trypsin signifikant höher (um 1,32 RFU/min, was 11,4 % entspricht) als die Kontrolle ($p = 0,0423$, *; siehe Abbildung 10D). Die denaturierte Probe zeigte wie bereits erwähnt kein Fluoreszenzsignal. Ist eine Probe denaturiert, bedeutet dies, dass die Struktur von Proteinen und Peptiden und damit auch von Enzymen irreversibel zerstört ist, womit diese inaktiv werden. Dies verdeutlicht, dass der Assay von einem intakten Enzym abhängig ist. Insgesamt lässt sich sagen, dass die Aktivität der Gingipaine im Speichel mittels FRET-Assay gemessen werden kann. Damit können Rückschlüsse auf die Aktivität von *P. gingivalis* gezogen werden. Daher kann der FRET-Assay zur Analyse der Speichelproben der Probanden verwendet werden. Mögliche Artefakte durch das Vorhandensein von Trypsin sind möglich, stellen aber nur einen geringen Teil der Reaktion dar.

4.1.4 Wirkung von Gallocatechingallat auf Gingipaine im Speichel

Durch das Einsetzen von Gallocatechingallat (GCG), einem Inhibitor von Gingipainen, sollten nun zwei weitere Fakten geprüft werden. Zum einen soll die Spezifität der zuvor gemessenen Fluoreszenz-Reaktion gemessen werden. Zum anderen sollte ein geeignetes Volumen der Speichelprobe bestimmt werden, mit dem ein aussagekräftiges Ergebnis erzielt werden kann. Der FRET-Assay wurde, wie in Abschnitt 3.2.7 beschrieben, durchgeführt. In Abbildung 11 sind die Ergebnisse dargestellt. Für beide Peptide ist deutlich erkennbar, dass die RFU/min-Werte jeweils für die Proben mit GCG signifikant geringer sind als ohne. Bei 5 μ l und 10 μ l Speichelmenge liegt der p-Wert für Peptid 3107 bei 0,0025 (***) und für Peptid 3215 unter 0,0001 (***). Dies lässt darauf schließen, dass eine Inhibition der Gingipaine durch GCG stattgefunden hat. Da die Inhibition der Gingipaine zu einer verringerten Fluoreszenz führte, kann die Spezifität der zuvor gemessenen Fluoreszenz-Reaktion (siehe 4.1.3) bestätigt werden. Die Inhibition war jedoch nicht vollständig, da trotz Zugabe des Inhibitors eine Restaktivität detektiert werden konnte (siehe Abbildung 11). Außerdem lag für alle drei Volumina 1 μ l, 5 μ l und 10 μ l ein messbares Ergebnis vor. Es lässt sich jedoch beobachten, dass der Anstieg der Enzymaktivität von 5 μ l zu 10 μ l im Gegensatz zu dem von 1 μ l zu 5 μ l nicht proportional scheint, beziehungsweise nicht linear zur Probenmenge ansteigt. Grund dafür könnte sein, dass die Substratkonzentration für diese Enzymmenge zu gering ist. Daher wurde für die folgenden Versuche mit einem Volumen von 5 μ l Speichelprobe gearbeitet.

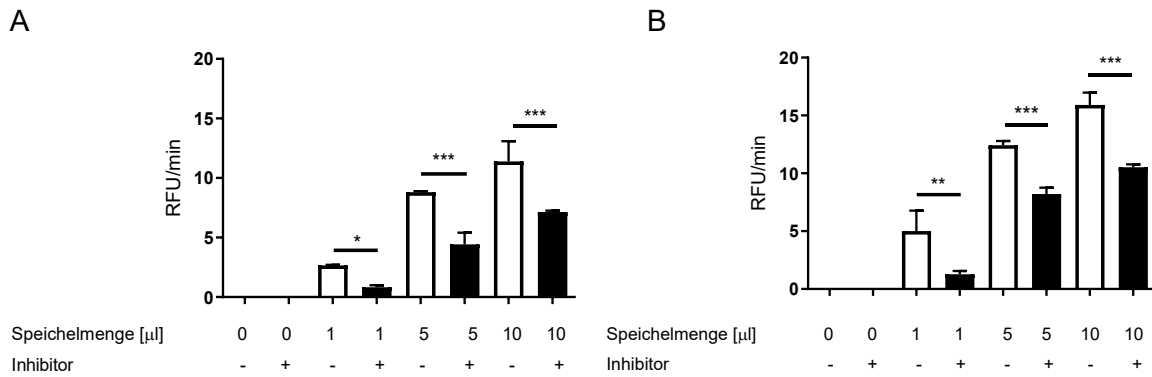


Abbildung 11: Wirkung von GCG auf Gingipaine im Speichel

Um zu untersuchen, ob die eingesetzte Menge an Speichel zu einem messbaren Ergebnis führt, wurde der FRET-Assay für die Peptide 3107 und 3215 mit verschiedenen Speichelmenge durchgeführt. Zusätzlich sollte die Spezifität der Reaktion untersucht werden, indem mit GCG, einem Inhibitor der Lys- und Arg-Gingipaine, gearbeitet wurde. A zeigt das Ergebnis für das Peptid 3215, während B das Ergebnis für das Peptid 3107 zeigt. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung dargestellt ($n = 2$). Es wurden acht unterschiedliche Proben – jeweils in Duplikaten – im FRET-Assay analysiert. Zum einen 0 µl, 1 µl, 5 µl und 10 µl Speichelprobe mit jeweils 2 µl einer 10 mM GCG-Lösung (siehe 3.2.7). Zum anderen 0 µl, 1 µl, 5 µl und 10 µl Speichelprobe ohne Inhibitor, stattdessen mit je 2 µl DMSO (Lösungsmittelkontrolle). Den Proben wurde NaCl-Lösung hinzugefügt, sodass ein Gesamtvolumen von jeweils 18 µl vorlag. Die Messung erfolgte bei 380 nm Exzitation und 460 nm Emission für 60 Minuten. Der lineare Bereich wurde entsprechend 4.1.3 gewählt. Zur statistischen Auswertung wurden der one-way Anova und der Šídák's multiple comparisons Test angewandt (*, $p = 0,0215$; **, $p < 0,0054$; ***, $p < 0,0005$).

4.2 Analyseergebnisse der Speichelproben der Probanden

Im folgenden Abschnitt werden die Analyseergebnisse der Speichelproben der Probanden wiedergegeben. Diese wurden mit den in den Vortests etablierten Methoden durchgeführt. Es wurde zum einen eine qPCR zur Bestimmung der Gesamtkeimmenge beziehungsweise zur Bestimmung der *P. gingivalis*-Menge vorgenommen. Zum anderen wurde die Gingipain-Messung mithilfe zweier peptidbasierter FRET-Assays durchgeführt.

4.2.1 Nachweis der Gesamtkeimmenge und *P. gingivalis*-Menge mithilfe einer Real-Time PCR

Zunächst sollte mithilfe einer qPCR die Gesamtkeimmenge sowie die *P. gingivalis*-Menge bestimmt werden. Dies wurde, wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben, durchgeführt. Diese klinische Studie umfasste einen Zeitraum von 14 Tagen, wobei mehrfach am Tag Speichelproben gesammelt wurden (siehe 3.2.2 und 3.2.3). Für die Bestimmung der Bakterienlast im Speichel der Probanden wurden die Speichelproben vor Beginn (t_0) und nach Ende (t_1) der Datenerhebung untersucht, die entsprechend Kapitel 3.2.4 aufbereitet wurden. Insgesamt lagen 19 Proben zu t_0 und 17 Proben zu t_1 vor. Die qPCR mit dem Oligonukleotid-Paar U1 zeigte für alle Proben ein Amplifikat. Da die selbstständige Speichelentnahme eine sehr komfortable und leicht in klinischen Studien umsetzbare Methode darstellt, jedoch aufgrund fehlender Unterstützung auch Risikofaktoren birgt, wurde im nächsten Schritt die Stabilität der erhaltenen Werte überprüft, indem die t_0 - und t_1 -Werte jedes Probanden verglichen wurden (siehe Abbildung 12A). Die Mittelwerte aller Proben zu t_0 und t_1 zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Zeitpunkten. Betrachtet man jedoch die direkt verfügbaren gepaarten Proben ($n = 17$), zeigte sich, dass bei der Mehrheit ($n = 11$) die Gesamtbakterienlast von der ersten zur zweiten Entnahme stieg (Abbildung 12B). Ein

möglicher Grund hierfür könnte eine geringere Motivation und/oder Sorgfalt bei der Mundhygiene gegen Ende der Untersuchung im Vergleich zum Beginn sein.

Berichte zu *P. gingivalis* basieren häufig auf Proben, die mittels Papierstreifen direkt aus subgingivalen Plaque Läsionen stammen. Diese Methode ist jedoch zeitaufwendig und erfordert gut geschultes Personal. Alternativ wurde die Entnahme von Speichel- oder Spülproben vorgeschlagen, da dies eine kostengünstige und einfache Methode ist, welche die vulnerable Probandenkohorte nicht zusätzlich belastet. Allerdings ist die Erfolgsrate hierbei oft niedriger. So wurde beispielsweise mit der Mundspülungsmethode eine Nachweisrate von 66 % erreicht, während bei einem Mehrstellen-Test aus den tiefsten Taschen jedes Quadranten 78 % erzielt wurden (Nickles et al., 2017). Tatsächlich war die mit HYq4 durchgeführte qPCR in zwölf von 36 Proben nicht erfolgreich, was vermutlich auf die geringere Sensitivität dieser Technik zurückzuführen ist. Für die restlichen Proben wurde durch Division der durch HYq4 ermittelten *P. gingivalis*-Menge durch die durch U1 ermittelte Gesamtkeimzahlmenge das normierte *P. gingivalis*-Produkt errechnet. Neun Proben zeigten eine relative Häufigkeit von Null, während vier eine niedrige relative Häufigkeit (> 1), zwei eine mittlere Häufigkeit ($< 1 > 5$) und fünf hohe Werte (> 5) zeigten (Abbildung 12C).

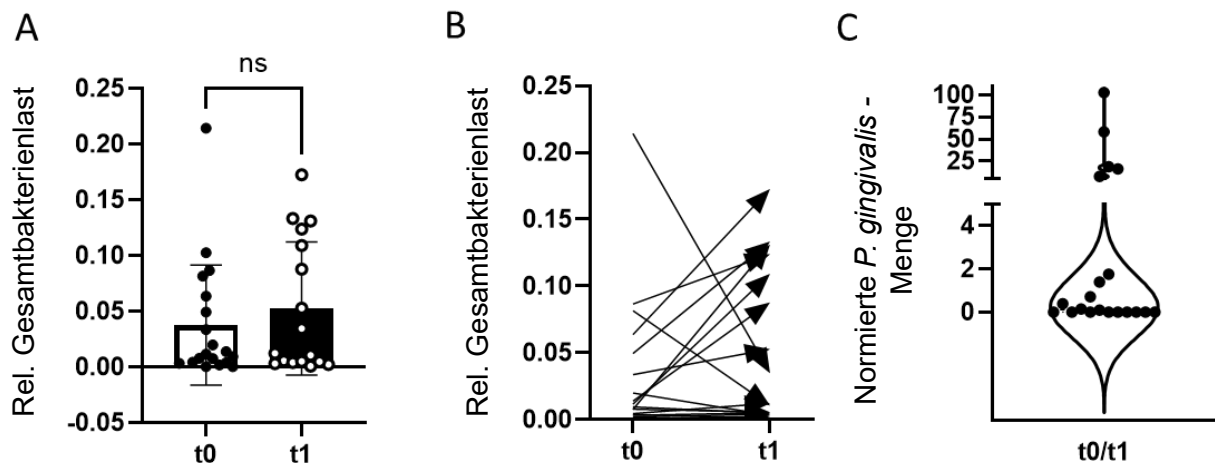


Abbildung 12: Gesamtbakterienlast und *P. gingivalis*-Menge im Speichel der pflegenden Angehörigen

Die Gesamtbakterienlast sowie die Menge an *P. gingivalis* in den zu t0 und t1 entnommenen Speichelproben wurden mittels qPCR unter Verwendung der Oligonukleotid-Paare U1 und HYq4 entsprechend Kapitel 3.2.5 bestimmt. A zeigt die relative Menge der Gesamtbakterien an beiden Zeitpunkten. B stellt den zeitlichen Verlauf der Gesamtbakterienlast von t0 zu t1 dar. Dies wurde nicht auf HYq4 angewandt, da hier zu wenige messbare Ergebnisse vorlagen. C zeigt die normierte Menge von *P. gingivalis*. Diese wurde durch die Division der mit HYq4 ermittelten *P. gingivalis*-Menge durch die mit U1 ermittelte Gesamtkeimmenge normiert. Wenn für beide Zeitpunkte Daten eines Probanden vorlagen, wurde der Mittelwert verwendet ($n = 36$).

4.2.2 Detektion der Gingipain-Aktivität

Nach entsprechender Aufbereitung der Proben für den FRET-Assay (siehe Kapitel 3.2.4) wurde mit den Proben entsprechend Kapitel 3.2.7 ein FRET-Assay durchgeführt, um durch die Fluoreszenzmessung die Gingipain-Aktivität bestimmen zu können. Dafür wurden, wie in Kapitel 3.2.7 beschrieben, zwei unterschiedliche Peptide genutzt, die Substrate für Arg- und Lys-Gingipain sind.

Zunächst wurde untersucht, ob sich die Aktivität der beiden Gingipain-Klassen im Speichel unterscheidet. Abbildung 13 zeigt die Korrelation zwischen FRET 1 (Peptid 3107, Arginin-Gingipain) und FRET 2 (Peptid 3215, Lysin-Gingipain). Zur statistischen Auswertung wurde die Spearman-Korrelation angewandt. Diese zeigt eine signifikante, positive Korrelation

($r = 0,7229$; $p < 0,0001$; ***). Daraus lässt sich schließen, dass beide Gingipain-Klassen unmittelbar voneinander abhängig sind und alternativ eingesetzt werden können. Zur Erhöhung der Validität entschieden wir uns jedoch dazu, für die weiteren Analysen den Mittelwert aus beiden Messungen zu nutzen.

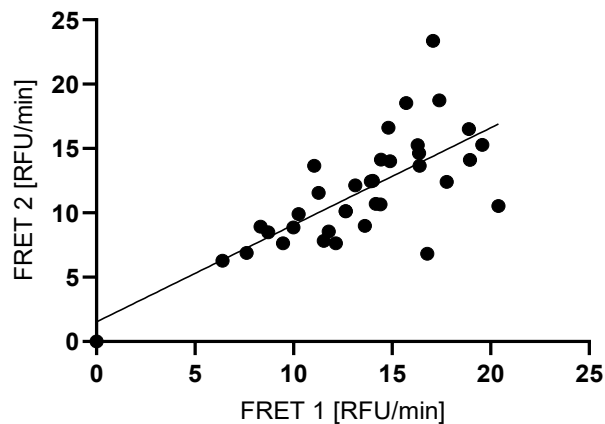


Abbildung 13: Korrelation der Aktivität von Arg- und Lys-Gingipainen im Speichel

Um die enzymatische Aktivität der Gingipaine im Speichel ermitteln zu können, wurden entsprechend Kapitel 3.2.7 zwei FRET-Assays mit zwei unterschiedlichen Peptiden durchgeführt. In FRET 1 wurde das Peptid 3107 (Substrat für Arg-Gingipain) und in FRET 2 das Peptid 3215 (Substrat für Lys-Gingipain) genutzt. Es wurden 5 μ l Speichelprobe verwendet. Die Messung erfolgte bei 380 nm Exzitation und 460 nm Emission für 40 Minuten (Peptid 3107) beziehungsweise für 45 Minuten (Peptid 3215). Hier wird die Korrelation der jeweiligen Enzymaktivitäten aus den beiden FRET-Assays gezeigt. Zur statistischen Analyse wurde die Spearman-Korrelation angewandt. Es wird die lineare Regressionsgerade gezeigt ($R^2 = 0,5305$; $r = 0,7229$; $p < 0,0001$; $n = 37$).

4.2.3 Korrelation der Gingipain-Aktivität mit den Bakterienmengen

Nachdem nun die Bakterienmenge und die Gingipain-Aktivität untersucht wurden, sollte anschließend analysiert werden, ob eine Abhängigkeit zwischen der *P. gingivalis*-Menge beziehungsweise der Gesamtbakterienmenge und den sekretierten Gingipainen besteht. Abbildung 14 zeigt das Ergebnis für die statistische Untersuchung. Es wurde angenommen, dass eine höhere Prävalenz von *P. gingivalis* mit einer entsprechend erhöhten Gesamtbakterienlast einhergeht. Jedoch konnte zwischen der Gesamtbakterienmenge und der *P. gingivalis*-Menge keine positive Korrelation nachgewiesen werden ($r = -0,11$; $p = 0,620$; Ergebnisse hier nicht dargestellt). Zudem war keine Abhängigkeit zwischen *P. gingivalis*-Menge und Gingipain-Aktivität zu beobachten ($p = 0,62$; Abbildung 14A). Diese Ergebnisse könnten an der geringen Probenzahl liegen. Jedoch wird deutlich, dass die Gingipain-Aktivität tendenziell mit der Gesamtbakterienmenge korreliert ($r = 0,29$; $p = 0,081$; Abbildung 14B). Es war zu erwarten, dass die *P. gingivalis*-Menge mit zunehmender Gesamtbakterienmenge ebenfalls ansteigt. Damit sollten auch die Gingipain-Aktivität und die Gesamtbakterienmenge positiv korrelieren. Dies konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Des Weiteren wurde angenommen, dass die Gingipain-Aktivität und die normierte *P. gingivalis*-Menge positiv miteinander korrelieren. Dies konnte hier jedoch nicht nachgewiesen werden. Auch die Analyse mit der unnormierten *P. gingivalis*-Menge ergab keine signifikante positive Korrelation mit der Gingipain-Aktivität ($r = 0,37$; $p = 0,296$, Daten nicht gezeigt). Grund für dieses Ergebnis könnte sein, dass die Menge an DNA von *P. gingivalis* im Speichel zu gering ist, um sie mit hoher Validität ohne vorangehende Extraktion bestimmen zu können. *P. gingivalis* ist mit höherer Wahrscheinlichkeit in einem Biofilm zu erwarten (Donne und Dewilde, 2015) als frei im Speichel, wohingegen Gingipaine sezerniert werden und daher den Speichel erreichen können. Die vorliegenden Befunde legen nahe, dass die Messungen mittels FRET-Assay in

Bezug auf das Vorhandensein von *P. gingivalis* aussagekräftiger sind. Bei den folgenden Analysen beschränken wir uns daher auf die Gingipain-Messung.

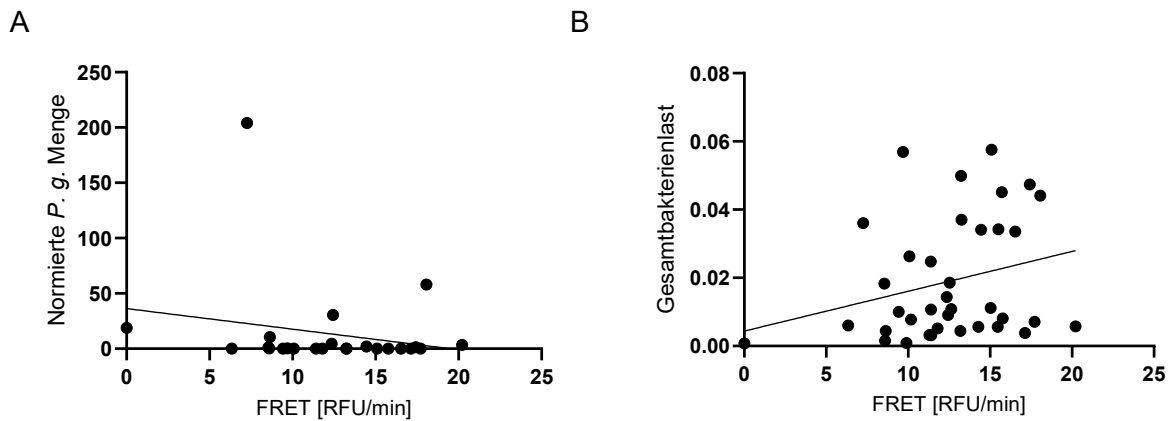


Abbildung 14: Korrelation von Gingipain-Aktivität und Bakterienmenge

A zeigt die Korrelation zwischen Gingipain-Aktivität und *P. gingivalis*-Menge, welche mit dem Oligonukleotid-Paar HYq4 analysiert und auf die Gesamtbakterienlast (U1-basierte qPCR) normiert wurde. B stellt die Korrelation zwischen Gingipain-Aktivität (FRET) und der Gesamtbakterienmenge dar, die wiederum mit dem Oligonukleotid-Paar U1 analysiert wurde. Zur statistischen Analyse wurde die Spearman-Korrelation angewandt. Es wird die lineare Regressionsgerade gezeigt (A: $R^2 = 0,04079$; $r = -0,1263$; $p = 0,5475$. B: $R^2 = 0,06704$; $r = 0,2885$; $p = 0,0833$).

4.3 Die Abhängigkeit der Gingipain-Aktivität von biochemischen Stressmarkern

Zentrale Frage dieser Arbeit war, inwiefern eine Abhängigkeit zwischen Parodontitis und Stress beobachtet werden kann. Da die Aktivität der Gingipaine, Enzyme und Virulenzfaktoren des Bakteriums *P. gingivalis*, auf das Vorhandensein von Parodontitis schließen lässt, soll im Folgenden eben diese auf Korrelation mit den Stressmarkern Alpha-Amylase und Cortisol untersucht werden. Letztere wurden im Rahmen der EMA-DEM-Studie während eines 14-tägigen Assessments durch die von den Probanden abgegebenen Speichelproben bestimmt (siehe 3.2.2 und 3.2.3). Für die Auswertung wurden die Daten zu Cortisol und Alpha-Amylase von t0 und Tag t1 herangezogen. Dabei wurde jeweils der Mittelwert der letzten vier Messzeitpunkte des Tages gebildet (10 Uhr, 14 Uhr, 18 Uhr und 21 Uhr). Dieses Vorgehen stellt sicher, dass die Cortisol-Aufwachreaktion (*Cortisol Awakening Response*, CAR) nicht in die Analyse mit einbezogen wird (Stalder et al., 2025). Bei Alpha-Amylase gilt ein Anstieg der Werte im weiteren Tagesverlauf als Indikator erhöhter sympathischer Aktivität und damit von Stress (Nater et al., 2007). Daher wurden auch hier die ersten beiden Messungen nach dem Aufstehen nicht berücksichtigt, um eine vergleichbare und aussagekräftige Datengrundlage zu gewährleisten. Da es sich um nicht normalverteilte Daten handelt, wurde für die Analyse mit dem natürlichen Logarithmus der Werte gerechnet. Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse der Analyse.

Es wurde für die Messzeitpunkte t0 und t1 eine separate Analyse zur Ermittlung der Korrelation durchgeführt. Für die Alpha-Amylase wird deutlich, dass weder für t0 noch für t1 eine signifikante Korrelation mit der Gingipain-Aktivität vorhanden ist. Für Cortisol kann ebenfalls keine signifikante Korrelation beobachtet werden.

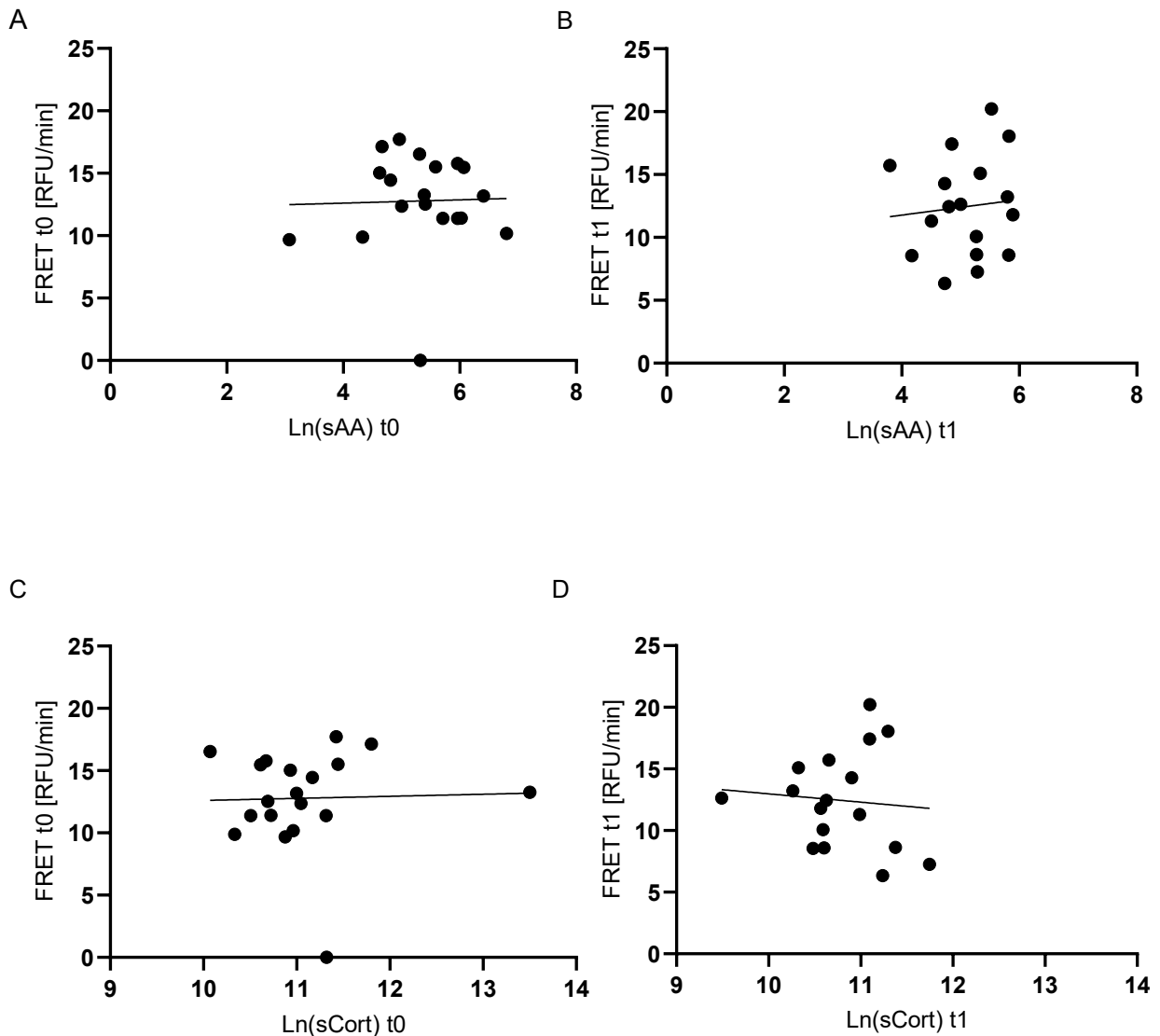


Abbildung 15: Korrelation zwischen biochemischen Stressmarkern und der Gingipain-Aktivität

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Gingipain-Aktivität (FRET) von den biochemischen Speichel-Stressmarkern Alpha-Amylase (sAA) und Cortisol (sCort) wurde eine Spearman-Korrelation durchgeführt. Es wurde eine separate Analyse für die Messzeitpunkte t0 und t1 durchgeführt. Die Daten zu Alpha-Amylase und Cortisol wurden von der EMA-DEM-Studie (ZpGA) während eines 14-tägigen Assessments erhoben und hier zur Analyse genutzt. Für beide Stressmarker wurde der Mittelwert aus den Messwerten der Messzeitpunkte drei bis sechs ermittelt (10:00 Uhr, 14:00 Uhr, 18:00 Uhr, 21:00 Uhr). Für die Analyse wurde der Logarithmus der Werte genutzt. Die Gingipain-Aktivität wurde mittels FRET-Assay bestimmt (siehe Kapitel 3.2.7). Es werden die linearen Regressionsgeraden gezeigt. A zeigt die Relation von Alpha-Amylase und Gingipain-Aktivität zu t0 ($R^2 = 0,0007857$; $r = -0,04035$; $p = 0,8697$; $n = 19$), während B sie zu t1 ($R^2 = 0,008717$; $r = 0,1593$; $p = 0,5402$; $n = 17$) zeigt. Darüber hinaus C stellt die Relation zwischen Cortisol und Gingipain-Aktivität zu t0 dar ($R^2 = 0,0009242$; $r = 0,1807$; $p = 0,4591$; $n = 19$), wohingegen D die Relation zwischen Cortisol und Gingipain-Aktivität zu t1 ($R^2 = 0,007853$; $r = -0,06373$; $p = 0,8094$; $n = 17$) demonstriert.

4.4 Zusammenhänge zwischen Parodontitis-Risikoeinschätzung, biochemischen Stressmarkern und Gingipain-Aktivität

Zusätzlich sollte untersucht werden, ob das Risiko für das Vorliegen einer Parodontitis, welches mittels Zahngesundheitsbefragung eingeschätzt wurde, mit den biochemischen Stressmarkern und der Gingipain-Aktivität korreliert.

4.4.1 Ergebnisse der Befragung zur Zahngesundheit

Nachdem zuerst Parameter der Speichelproben untersucht wurden, werden im Folgenden Ergebnisse zur Zahngesundheitsbefragung beschrieben. Von den insgesamt 20 Probanden der initialen Studie hatten sich zwölf Probanden für eine Teilnahme an der telefonischen Befragung zur Zahngesundheit zurückgemeldet. Die Befragung fand entsprechend Kapitel 3.2.8 statt. Abbildung 16 zeigt das Ergebnis der Befragung. Ziel war es, eine Einschätzung vorzunehmen, inwieweit ein Risiko für das Vorliegen von Parodontitis besteht. Jeweils ein Proband konnte der ersten und dritten Gruppe zugeordnet werden, wohingegen der zweiten und vierten Gruppe vier Personen zugeordnet werden. Die fünfte Gruppe ist mit sechs Probanden am stärksten vertreten. Der vierten Gruppe konnte kein Proband zugeordnet werden.

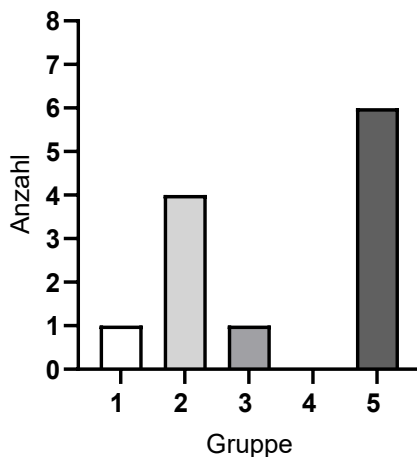


Abbildung 16: Befragung zur Zahngesundheit

Die zustimmenden Studienteilnehmenden wurden telefonisch mittels Fragebogen (siehe 8.1) interviewt. Es nahmen insgesamt 12 der 20 Studienteilnehmenden teil. Die Eingruppierung erfolgte anhand des ermittelten Risikos für das Vorliegen einer Parodontitis:

- Gruppe 1 4-23 %*
- Gruppe 2 33-45 %*
- Gruppe 3 58-69 %*
- Gruppe 4 79-86 %*
- Gruppe 5 91-100 %*

4.4.2 Korrelation der Parodontitis-Einschätzung mit den biochemischen Stressmarkern und der Gingipain-Aktivität

Da Stress ein Risikofaktor für Parodontitis ist (Sheiham und Nicolau, 2005), war eine positive Korrelation zwischen dem Parodontitis-Risiko, welches durch die Gruppen 1-5 repräsentiert wird (siehe Abbildung 16), und biochemischen Stressmarkern zu erwarten (Ardila und Guzman, 2016). Jedoch konnte zwischen dem Parodontitis-Risiko und den Werten für die Alpha-Amylase Ln(sAA) eine signifikant negative Korrelation beobachtet werden ($r = -0,6274$; $p = 0,0336$). Eine signifikant negative Korrelation besteht auch zwischen dem Parodontitis-

Risiko und der Gingipain-Aktivität ($r = -0,6218$; $p = 0,0468$). Eine signifikante Abhängigkeit des Parodontitis-Risikos von der Cortisolmenge $\text{Ln}(s\text{Cort})$ konnte nicht festgestellt werden ($r = 0,06475$; $p = 0,8434$). Diese Ergebnisse sind hier nicht abgebildet.

Außerdem wurden die Mittelwerte der jeweiligen Parameter der fragebogenbasierten Gruppierung miteinander verglichen. Dazu wurden die Parodontitis-Schweregrade in Gruppen zusammengeführt, um trotz kleiner Gruppengrößen auf Zusammenhänge und Unterschiede hin untersuchen zu können. Es sollte analysiert werden, ob die Mittelwerte für Alpha-Amylase, Cortisol und Gingipain-Aktivität mit der Höhe der Eingruppierung steigen. Abbildung 17 zeigt das Ergebnis der Analyse. Der Vergleich fand zwischen dem Mittelwert für Gruppe 1 und 2 und dem Mittelwert für die Gruppen 3 bis 5 statt, um in etwa das Risiko für das Vorliegen von Parodontitis $< 50\%$ mit $> 50\%$ zu vergleichen. Dies ergab lediglich für FRET einen signifikanten Unterschied (***, $p = 0,0003$). Der Mittelwert der Gruppen 1 und 2 ist wider Erwarten höher als der Mittelwert der Gruppe 3-5 (siehe Abbildung 17C). Der Vergleich der Mittelwerte von Alpha-Amylase und Cortisol ergab kein signifikantes Ergebnis (siehe Abbildung 17A und 17B).

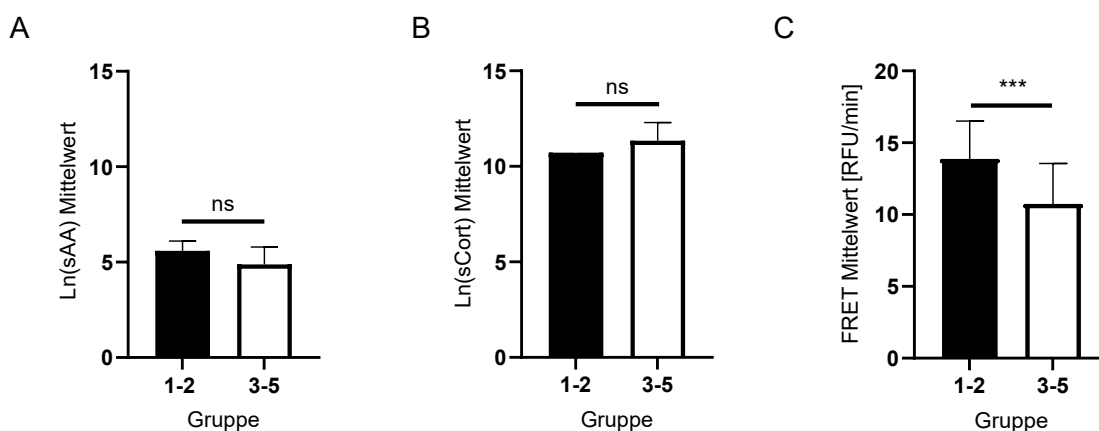


Abbildung 17: Korrelation der biochemischen Stressmarker und der Gingipain-Aktivität mit dem Fragebogen-basierten Risiko für das Vorliegen einer Parodontitis

Für jeden Parameter wurde ein Vergleich zwischen dem Mittelwert für Gruppe 1 und 2 ($n = 8$) und dem Mittelwert für die Gruppen 3 bis 5 ($n = 13$) durchgeführt, um das Risiko $< 50\%$ mit $> 50\%$ zu vergleichen. Dazu wurde ein gemeinsamer Mittelwert aus den Ergebnissen der FRET-Analyse und aus den Messwerten für Alpha-Amylase und Cortisol der Messzeitpunkte drei bis sechs ermittelt (10:00 Uhr, 14:00 Uhr, 18:00 Uhr, 21:00 Uhr). Für die Analyse von Alpha-Amylase und Cortisol wurde der Logarithmus der Werte genutzt. A zeigt das Ergebnis für die Alpha-Amylase ($n = 23$; ns), B für Cortisol ($n = 23$; ns) und C für FRET ($n = 21$; ***, $p = 0,0003$). Für C ergibt sich $n = 21$, da von dem Probanden, welcher Gruppe 1 zugeordnet wurde, keine Speichelprobe zur Analyse mit dem FRET Assay vorlag. Außerdem fehlte bei einem Probanden der Gruppe 3 die Probe für t_1 . Die Analyse der biochemischen Stressmarker wurde bereits im Rahmen der EMA-DEM-Studie durchgeführt, weshalb für jeden Probanden Werte vorliegen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Šídák's multiple comparisons test.

4.5 Betrachtung der Haarcortisol-Konzentration

In den vorangegangenen Analysen wurden die salivären, biochemischen Stressmarker Alpha-Amylase und Cortisol betrachtet. Diese Werte repräsentieren jedoch lediglich den akuten Stress (Lee et al., 2015). Im Rahmen der EMA-DEM-Studie wurde zusätzlich die Haarcortisol-Konzentration zum Ende des Assessments bestimmt. Dieses stellt im Gegensatz zum salivären Cortisol einen Marker für langfristigen Stress dar, da das Cortisol über Wochen und Monate in den Haaren gespeichert wird (Staufenbiel et al., 2013; Lee et al., 2015). Für die

Analyse wurde die Korrelation des gemessenen Haarcortisols sowohl mit der Gingipain-Aktivität (FRET), als auch mit der normierten *P. gingivalis*-Menge zu t1 untersucht. Es hat sich keine signifikant positive Korrelation ergeben (siehe Abbildung 18).

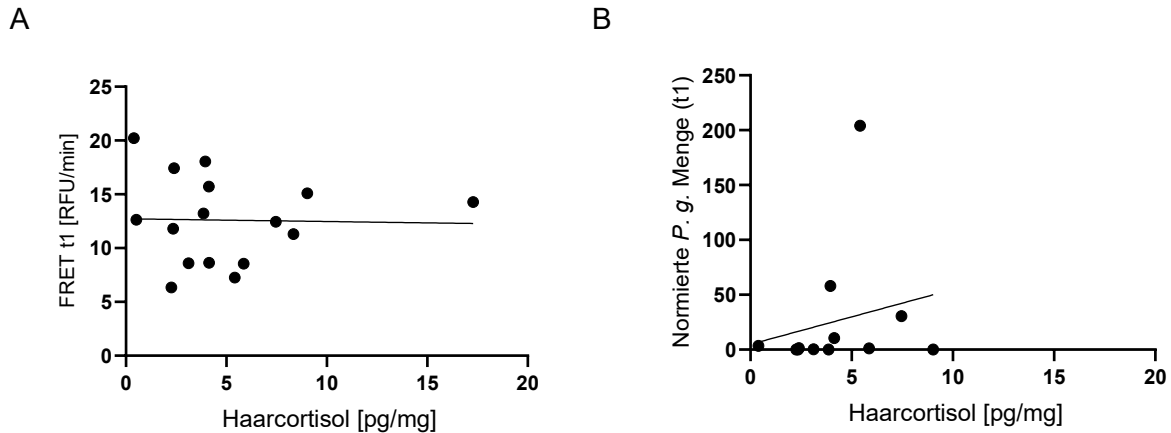


Abbildung 18: Korrelation der Gingipain-Aktivität und normierten *P. gingivalis*-Menge mit der gemessenen Haarcortisol-Konzentration

A zeigt die Korrelation der Haarcortisol-Konzentration mit der Gingipain-Aktivität ($n = 16$). B zeigt die Korrelation von Haarcortisol-Konzentration mit der normierten *P. gingivalis*-Menge ($n = 12$; vier Werte der normierten *P. gingivalis*-Menge zu t1 waren aufgrund fehlender Amplifikate nicht vorhanden). Für beide Parameter wurden nur die Werte für t1 berücksichtigt, da die Haarcortisol-Bestimmung ebenfalls zum Ende des Assessments durchgeführt wurde. Zur statistischen Analyse wurde die Spearman-Korrelation angewandt. Es wird die lineare Regressionsgerade gezeigt (A: $R^2 = 0,0006546$; $r = -0,1118$; $p = 0,6806$; B: $R^2 = 0,042$; $r = 0,27$; $p = 0,3846$).

Auch mit der Gesamtbakterienlast ($r = 0,11$; $p = 0,697$) konnte keine Korrelation gefunden werden (Ergebnis hier nicht dargestellt). Außerdem wurde untersucht, ob die Mittelwerte von Haarcortisol mit der Höhe der Eingruppierung bei der Zahngesundheitsbefragung steigen. Dazu wurde, wie unter 4.4.2 schon für die salivären biochemischen Stressmarker und die Gingipain-Aktivität erfolgt, der Mittelwert von Haarcortisol für die Gruppen 1 und 2 sowie für die Gruppen 3 bis 5 gebildet. Der Vergleich ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen (siehe Abbildung 19).

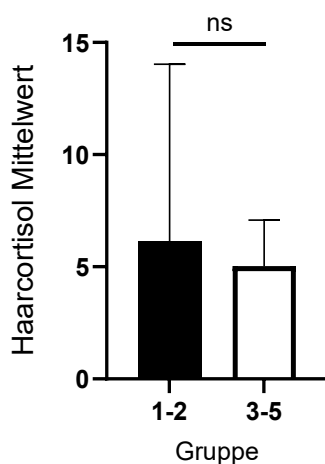


Abbildung 19: Korrelation der Haarcortisol-Konzentration mit dem fragebogenbasierten Risiko für das Vorliegen einer Parodontitis

Für den Parameter Haarcortisol wurde ein Vergleich zwischen dem Mittelwert für Gruppen 1 und 2 ($n = 4$) und dem Mittelwert für die Gruppen 3 bis 5 ($n = 6$) durchgeführt, um das Risiko $< 50\%$ mit $> 50\%$ zu vergleichen. Die Werte für n weichen von denen der übrigen Analysen ab, da für einige Probanden, die an der Zahngesundheitsbefragung teilgenommen haben, keine Haarcortisol-Werte vorliegen. Zudem wurde die Haarcortisol-Konzentration nur einmal zum Ende des Assessments bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Šidák's multiple comparisons test.

5. Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse liefern neue Erkenntnisse zum Speichelmikrobiom bei pflegenden Angehörigen von Patienten mit Alzheimer-Demenz. Im Folgenden werden die angewandten Methoden und Ergebnisse in den Kontext bestehender wissenschaftlicher Forschung betrachtet und diskutiert. Dabei werden Implikationen für zukünftige Forschung und praktische Anwendungen beleuchtet.

5.1 Diskussion der Methoden

Zunächst werden die in dieser Arbeit angewandten Methoden hinsichtlich ihrer Stärken, Limitationen und potenziellen Einflussfaktoren auf die erhobenen Ergebnisse diskutiert.

5.1.1 Probenentnahme

Wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, wurden die Speichelproben von den Probanden selbstständig entnommen. Die Probanden waren dazu angehalten die Proben direkt nach Entnahme ins Gefrierfach bei -18 °C zu stellen. Die Einhaltung des Prozederes kann jedoch nicht kontrolliert werden, weshalb bei jeder Probe die Möglichkeit einer anfänglich nicht sachgerechten Lagerung besteht. Dies kann Auswirkungen auf die Qualität der Probe haben. In einer Studie (Enomoto et al., 2020) wurde untersucht, wie sich eine kurzfristige Lagerung von Speichelproben bei Raumtemperatur auf die mikrobielle Zusammensetzung auswirkt. Dazu wurden Speichelproben von 11 Probanden gesammelt, die dann anschließend für drei Stunden bei Raumtemperatur (23 °C) aufbewahrt wurden. Die V3-V4-Region des 16S rRNA-Gens wurde mittels *Next-Generation Sequencing* analysiert, um Veränderungen in der mikrobiellen Zusammensetzung zu identifizieren. Bei dieser Region handelt es sich um einen besonders variablen Abschnitt des 16S ribosomalen RNA-Gens. Er enthält viele Sequenzunterschiede zwischen Bakterienspezies, was sie ideal für die Identifikation und Klassifikation von Mikroorganismen macht. Um den Einfluss der Lagerungstemperatur und -dauer auf die Probenqualität zu bestimmen, wurden die Alpha- und Beta-Diversität untersucht. Dazu wurden der Simpson- und Shannon-Index bestimmt. Für die Alpha-Diversität ergab sich nach einer Inkubationszeit von drei Stunden bei Raumtemperatur eine signifikante Reduktion des Shannon- ($p = 0,0244$) und des Simpson-Index ($p = 0,0322$), was auf eine Verringerung der Vielfalt innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft hindeutet. Die Beta-Diversität, welche als Diversität zwischen den verschiedenen Proben definiert ist, blieb unverändert.

Die Autoren stellten fest, dass vor allem die anaeroben Spezies betroffen waren, darunter auch *P. gingivalis*. Zusätzlich muss erwähnt werden, dass *P. gingivalis* im Speichel normalerweise in sehr geringen Mengen enthalten ist (Lee et al., 2020) und daher ein weiteres Abnehmen durch inadäquate Lagerung recht kritisch ist.

Ein weiterer Aspekt, der diskutiert werden sollte, ist die Methode der Probenentnahme. Es stellt sich die Frage, ob diese geeignet ist, um die Proben auf das Vorliegen von *P. gingivalis* und auf die Enzymaktivität von Gingipainen zu untersuchen. Die oralen Bakterien lagern sich zunächst als Frühbesiedler an der Zahnoberfläche an und reifen durch Ansiedlung von Spätbesiedlern zu einem Biofilm aus (Donne und Dewilde, 2015). Daraus lässt sich schließen, dass *P. gingivalis* mit höherer Wahrscheinlichkeit in einem Biofilm vorkommt als frei im Speichel, während die von ihm freigesetzten Gingipaine den Speichel erreichen können. Die Speichelprobe scheint also für die Analyse der Gingipaine geeignet zu sein, obwohl die Möglichkeit besteht, dass sie für die Untersuchung des Bakterienvorkommens nicht optimal ist. Dies könnte der Grund dafür sein, dass für das Oligonukleotid-Paar HYq4, welches für die Detektion von *P. gingivalis* genutzt wurde, 12 der 36 Proben kein Amplifikat zeigten, worauf im Folgenden noch eingegangen wird.

Guentsch et al. haben in Ihrer Studie aus dem Jahr 2011 bei 36 Probanden mit chronischer Parodontitis verschiedene Methoden des Probengewinns von Sulkusflüssigkeit (*Gingival Crevicular Fluid*, GCF) untersucht. Aus ihrer Arbeit geht hervor, dass die GCF für die Analyse einen hohen Stellenwert hat, da sie unter anderem Entzündungszellen, Immunzellen,

Entzündungsmarker wie Zytokine und Interleukine und letztlich auch Bestandteile supra- und subgingivaler Bakterien enthält. Es wurden folgende Methoden angewandt: *Paper Points* (Papierspitzen), *Filter Paper Strips* (Filterpapierstreifen) und die Wasch-Methode. Die Papierspitzen und die Filterpapierstreifen wurden für 30 Sekunden in die Zahnfleischtasche eingeführt und im Anschluss über Nacht bei 4 °C in ein mit phosphatgepufferter Salzlösung (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) gefülltes Röhrchen gegeben. Für die Wasch-Methode wird der Zahn isoliert und eine definierte Menge an steriler, isotonischer Kochsalzlösung mit einer feinen Kanüle in den gingivalen Sulkus eingebracht, um den Sulkus zu spülen. Die Lösung wird durch Aspirieren wieder zurückgewonnen, wobei sie nun Bestandteile der Sulkusflüssigkeit enthält. Ein Nachteil dieser Methode ist zum einen der Verdünnungseffekt durch die Spüllösung. Zum anderen ist die Entnahme invasiv und erfordert einen Spezialisten, beziehungsweise geschultes Fachpersonal. Zwischen der Papierstreifen- und Papierspitzen-Methode zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,375$) in der Bestimmung der *P. gingivalis*-Menge. Arg-Gingipaine konnten nur in 4 % der Papierspitzen-Proben und in 22,9 % der Filterpapierstreifen-Proben detektiert werden. Mit der Wasch-Methode wurden bakterielle Komponenten nur in geringem Maße erfasst. Jedoch ergab sich eine signifikant positive Korrelation mit den anderen Methoden zur Probenentnahme für die Präsenz von *P. gingivalis* ($p = 0,004$ im Vergleich zu Filterpapierstreifen; $p = 0,001$ im Vergleich zu Papierspitzen). Des Weiteren konnten in 49 % der GCF-Wäschen Arg-Gingipaine detektiert werden, während sie mit den Papierspitzen nur bei 13 % und mit den Filterpapierstreifen bei 26 % der Proben detektiert werden konnten. Wurden alle Stellen der Probenentnahme mit eingezogen, konnte zudem eine positive Korrelation zwischen der Konzentration von Arg-Gingipain und der *P. gingivalis*-Menge festgestellt werden ($R = 0,429$; $p < 0,001$). Jedoch muss erwähnt werden, dass keine positive Korrelation gefunden werden konnte, wenn man nur die auf *P. gingivalis* positiven Stellen mit einbezogen hat ($R = 0,088$; $p = 0,360$).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Studie von Guentsch et al. die Wasch-Methode für die Detektion von Arg-Gingipain hervorhebt. Die Filterpapierstreifen und die Papierspitzen ergeben sich hingegen als ungeeignet. Für die Detektion von Bakterien wie *P. gingivalis* sind sowohl die Papierspitzen als auch die Filterpapierstreifen geeignet.

Eine weitere Möglichkeit zur Probenentnahme für die Untersuchung des Vorkommens von *P. gingivalis* wäre eine Biofilmprobe von der Zahnoberfläche und von supragingivaler Plaque mittels Watteträgern zu entnehmen, die anschließend in ein mit PBS gefülltes Eppendorf-Röhrchen eingelegt werden (Leonov et al., 2024). An der Studie nahmen 189 Probanden teil, die nach Alter und BMI eingeteilt wurden. Die Probenentnahme erfolgte am Morgen, nachdem mindestens acht Stunden seit der letzten Nahrungsaufnahme und dem letzten Zähneputzen vergangen waren. Biofilmproben wurden mittels steriler Watteträger von der Zahnoberfläche und von supragingivaler Plaque entnommen, die anschließend in ein mit PBS gefülltes Eppendorf-Röhrchen gegeben wurden. Dies wurde für 30 Sekunden gemischt. Zusätzlich wurden Speichelproben durch die Spuck-Technik gesammelt. Beide Methoden für die Probenentnahme wurden kombiniert und für die PCR verwendet. Untersucht wurden sechs parodontale Pathogene: *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *P. intermedia* und *F. nucleatum*. Die Prävalenz war für *F. nucleatum* mit 89,2 % am höchsten, gefolgt von *A. actinomycetemcomitans* (63,4 %), *P. intermedia* (47,8 %), *T. forsythia* (46,6 %), *T. denticola* (46,6 %) und *P. gingivalis* (33,0 %). Die Ergebnisse zeigen, dass auch diese Methode der Probenentnahme durchaus geeignet ist, um parodontale Pathogene zu untersuchen.

Die vorhandene Literatur bietet viele alternative Methoden zur Probenentnahme für die Analyse von *P. gingivalis* und dessen Gingipaine an, die alternativ zu der für diese Arbeit verwendete Speichelsammlung durch die Spuck-Technik angewandt werden können und zur Modifikation der Arbeit beitragen. Dennoch lassen sich auch einige Studien finden, die zeigen, dass die Speichel-Analyse wie sie in dieser Arbeit Anwendung gefunden hat, durchaus erfolgreich sein kann. In einer Studie von Kinney et al. (2011) wurde gezeigt, wie aussagekräftig Speichelproben für die Analyse parodontaler Entzündungen sind. Über einen Zeitraum von zwölf Monaten wurden 79 Probanden regelmäßig untersucht und in klinisch differenzierte Gruppen eingeteilt: Gesundheit, Gingivitis, milde sowie moderate und schwere Parodontitis. Die Speichelproben wurden alle zwei Monate durch eine passive Sammlung

unstimulierten Speichels gewonnen. Die anschließende Analyse mittels *Proteinarrays* und ELISA ermöglichte die Quantifizierung von 14 Entzündungs- und Knochenstoffwechselbezogenen Biomarkern. Bemerkenswert ist die diagnostische Aussagekraft des Biomarkers MMP-8 im Speichel mit einer Sensitivität von 86,9 %, einer Spezifität von 79,2 % und einem AUC-Wert von 0,89. MMP-8 Konzentrationen könnte man analog zu den Gingipainen mittels FRET-Assay bestimmen. Die Studie befasste sich zwar nicht direkt mit dem Vorkommen von *P. gingivalis* und dessen Gingipainen, jedoch unterstreichen die Ergebnisse, dass Speichel ein effektives Medium zur Erfassung entzündlicher Prozesse in der Parodontologie darstellt.

Saygun et al. (2011) untersuchten ebenfalls die diagnostische Aussagekraft von Speichel bei der Erkennung parodontaler Erkrankungen anhand mikrobieller Marker. Auch hier wurden die Speichelproben mittels Spuck-Technik gewonnen. Genau wie in dieser Arbeit erfolgte die Analyse mittels PCR. Dies zeigte, dass *P. gingivalis* im Speichel von Patienten mit chronischer Parodontitis in signifikant höheren Konzentrationen nachweisbar war ($p < 0,05$). Neben *P. gingivalis* wurden auch *T. forsythia* und *T. denticola* detektiert. Alle drei Pathogene zeigten eine hohe diagnostische Genauigkeit mit Sensitivitäten von 86,5-89,2 %, Spezifitäten von 83,8-94,6 % und AUC-Werten von über 0,80. Diese Werte verdeutlichen, dass Speichel eine verlässliche Probe zur Identifikation parodontaler Leitspezies wie *P. gingivalis* ist, ohne auf invasive Verfahren zurückgreifen zu müssen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der nicht zu vernachlässigen ist, ist die Konvenienz des Speichelprobengewinns durch die Spuck-Technik für den Probanden. Die Entnahmemethode ist einfach und kann durch den Probanden in seiner gewohnten Umgebung selbst durchgeführt werden. Bei anderen Methoden wäre es erforderlich, dass die Probanden eine Einrichtung mit entsprechendem Fachpersonal aufsuchen, was einen zusätzlichen Zeitaufwand bedeutet. Außerdem ist die Anreise für viele Probanden schwer, da nicht jeder mobil ist oder über die finanziellen Mittel für den öffentlichen Nah- und Fernverkehr verfügt. Vor allem für pflegende Angehörige ist es schwierig dies umzusetzen, da die zu pflegende Person oft nicht allein gelassen werden kann. Darüber hinaus ist die Methode nicht invasiv, was eine höhere Akzeptanz seitens der Probanden erwarten lässt. Durch die Spuck-Technik ist folglich eine höhere Compliance der Probanden zu erwarten. Ein weiterer sehr wichtiger Aspekt ist, dass zusätzlicher Stress durch eine schwierige Probenentnahme gerade bei einer Untersuchung zu Stress-Parametern kontraproduktiv wäre.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Spuck-Technik gewonnene Speichelproben ein durchaus geeignetes Medium zur Analyse des Vorliegens von parodontalen Erkrankungen darstellt. Die Methode ist nicht nur einfach durchzuführen, sondern findet auch Akzeptanz bei den Probanden und wurde bereits in anderen Studien erfolgreich angewandt.

5.1.2 Probenaufbereitung

Die Aufbereitung der Proben erfolgte mittels Chelex-100. Dies dient der Reinigung der Proben und der Entfernung von DNA-Inhibitoren zur besseren Analyse mittels qPCR (Walsh et al., 1991). Im Anschluss müssen die Proben zentrifugiert werden und der Überstand, der die DNA enthält, wird für die weitere Analyse verwendet. Shen et al. (2017) haben in ihrer Studie die manuelle Chelex-100-Methode mit der automatisierten MPure-12-Methode verglichen. Die MPure-12-Methode ist ein automatisiertes System für standardisierte DNA/RNA-Extraktion. Dazu wird die Probe mit einer Lysepuffer-Lösung vermischt, die Zellmembranen aufbricht und DNA/RNA freisetzt. Im nächsten Schritt wird ein Bindungspuffer hinzugegeben, der speziell beschichtete, magnetische Partikel – sogenannte *Beads* – nutzt, die selektiv DNA/RNA binden. Nach mehreren Waschschritten wird ein Elutionspuffer hinzugegeben, der die DNA/RNA von den *Beads* ablöst. Die gereinigte DNA/RNA wird in einem separaten Röhrchen gesammelt und kann für weitere Analysen verwendet werden. Diese Methode reduziert den manuellen Aufwand und das Risiko von Fehlern. In der Studie wurden neun biologische Proben unterschiedlicher Art gesammelt, darunter Speichelproben. Die Studie ergab, dass die Verwendung des MPure-12-Systems bei Speichelproben teilweise zu Allelverlusten führte, was darauf hindeutet, dass diese Methode im Vergleich zur Chelex-100-Methode weniger zuverlässig sein könnte. Jedoch hat Chelex-100 den Nachteil, dass es beim Verbleib von

Rückständen in der Probe zur Inhibition der PCR kommen kann (Schrader et al., 2012). Allerdings ist die Aufbereitung kostengünstiger und erfolgt schnell und einfach. Die Methode wird demnach trotz der genannten Einschränkungen häufig in anderen Studien verwendet, wie zum Beispiel in einer Studie von Peachey et al. (2024). In der Studie wurde eine speichelbasierte qPCR-Diagnostik entwickelt, um Streptokokken-Angina nachzuweisen. Für die Analyse mittels qPCR wurden Speichelproben gesammelt, die mit der Chelex-100-Methode aufbereitet wurden. Die Autoren erwähnen, dass verschiedene Extraktionsprotokolle verglichen und getestet wurden. Im Fokus stand, eine Methode zu finden, die kostengünstig und einfach durchzuführen und dennoch effektiv ist. Sie haben sich für die Chelex-100-Methode entschieden, da es divalente Kationen wie Magnesium chelatisiert, die als Cofaktoren für DNAsen benötigt werden. Durch das Binden dieser Ionen verhindert Chelex-100 die enzymatische Zersetzung der DNA und schützt somit die Integrität der Probe für die nachfolgende PCR-Analyse. Auch Polgarova et al. (2010) heben Chelex-100 als die effektivste Methode zur DNA-Extraktion in Speichelproben hervor. Sie betonen die effiziente DNA-Ausbeute, den bereits genannten Schutz vor DNA-Abbau durch das Binden divalenter Kationen, die geringe PCR-Inhibition durch Rückstände und schließlich die Anwendungsfreundlichkeit.

Neben der richtigen DNA-Extraktion kann die Zugabe von Konservierungsmitteln zu konsistenteren Daten und zu einer verbesserten Sensitivität bei der Erfassung bakterieller Sequenzen führen. Eine Studie (Armstrong et al., 2021) befasste sich mit der Evaluierung verschiedener Methoden zur Sammlung und Verarbeitung von Speichelproben, um die Auswirkungen der Konservierung auf die Analyse des Mikrobioms zu untersuchen. Dafür wurden 56 Proben von 22 gesunden Teilnehmenden gesammelt. Jeder Teilnehmende stellte zwei Speichelproben bereit, wovon eine ohne und die andere mit Konservierungsmitteln behandelt wurde. Beim Konservierungsmittel handelt es sich um Mittel, das ursprünglich für die Stabilisierung von SARS-CoV-2-RNA in Speichelproben entwickelt wurde und in COVID-19-Testkits enthalten ist. Zur Identifikation und Quantifizierung der bakteriellen Arten wurde die 16S rRNA-Gen-Sequenzierung angewandt. Bei 57,1 % der Proben wurde mit dem Konservierungsmittel eine höhere DNA-Konzentration gemessen als für dieselbe Probe ohne Konservierungsmittel ($p < 0,05$). Der Mittelwert für die Proben mit Konservierungsmittel lag etwa bei 11 ng/ μ l und für die Proben ohne Konservierungsmittel etwa bei 8 ng/ μ l. Für die DNA-Qualität und für die Bestimmung der Menge an bakterieller DNA zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied für die beiden Probenarten. Auch in der Sequenzierungstiefe konnte kein Unterschied festgestellt werden, weshalb die Autoren annehmen, dass die unterschiedlichen Probenaufbereitungen keinen Einfluss auf das PCR-Amplifikat des 16S rRNA-Gens haben. Bezüglich der Alpha-Diversität wurden signifikant höhere Werte für die Proben mit Konservierungsmittel gemessen ($p < 0,01$). Die phylogenetische Diversität, welche ein Maß dafür ist, wie unterschiedlich die Organismen in einer Gemeinschaft aus evolutionärer Sicht sind, war bei den Proben mit Konservierungsmittel mit einem Mittelwert von etwa 37 signifikant höher als ohne Konservierungsmittel, bei denen ein Mittelwert von etwa 33 gemessen wurde ($p < 0,001$). Die *Evenness*, auch als Gleichverteilung oder Ausgeglichenheit bezeichnet, ist ein Bestandteil der Alpha-Diversität. Sie gibt Aufschluss darüber, wie gleichmäßig die Individuen auf die vorhandenen Arten einer biologischen Gemeinschaft verteilt sind. Eine hohe *Evenness* bedeutet, dass die Arten etwa gleich häufig vorkommen, während eine niedrige *Evenness* darauf hinweist, dass einige Arten stark dominieren, während andere nur in geringer Anzahl vertreten sind. Auch für die *Evenness* ergaben sich für die Proben mit Konservierungsmittel signifikant ($p < 0,01$) höhere Werte (Mittelwert etwa 0,71) als ohne (Mittelwert etwa 0,68).

Jedoch hat die Zugabe von Konservierungsmitteln auch Nachteile. Für diese Arbeit wurde nicht nur die mikrobielle Zusammensetzung untersucht, sondern auch die Enzymaktivität der Gingipaine. Diese kann durch Konservierungsmittel gehemmt werden. Ein Beispiel ist RNAlater (Qiagen). Dabei handelt es sich um ein Reagenz, welches die zelluläre RNA in unverarbeiteten, aufgetauten Gewebeproben stabilisieren und schützen soll. In einer Studie (Liang et al., 2020) wurde unter anderem die Auswirkung der Lagerungskonditionen bei Stuhlproben untersucht. Als Stabilisierungslösung wurde RNAlater genutzt. Es wurden Stuhlproben von drei gesunden Kindern untersucht. Die Proben wurden unter verschiedenen

Bedingungen gelagert: bei Raumtemperatur, bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, mit RNAlater sowie mit unterschiedlichen Auftaumethoden. Die Lagerung in RNAlater führte zu signifikanten Veränderungen sowohl im Mikrobiom als auch im Metabolom. In Proben, die in RNAlater gelagert wurden, wurden insgesamt 21 Metabolite signifikant herunterreguliert und 22 Metabolite signifikant hochreguliert im Vergleich zu Proben, die bei Raumtemperatur oder eingefroren gelagert wurden ($p < 0,05$). Fünf Metabolite, darunter L-Lysin und 5-Hydroxylysin, waren bei allen drei Teilnehmenden konsistent herunterreguliert. ($p < 0,05$). RNAlater hat sich für die Bewahrung der Nukleinsäurequalität als sehr geeignet erwiesen. Jedoch extrahiert es auch positiv geladene Metabolite wie zum Beispiel Lysin. Hiermit ist es zumindest naheliegend, dass Cofaktoren von Enzymen extrahiert werden könnten oder auch die Struktur von Enzymen wie den Gingipainen nachhaltig gestört werden könnte. Folglich ist die Zugabe von Stabilisatoren wie RNAlater für unsere Analyse eher ungeeignet, beziehungsweise müsste deren positiver Effekt und das Ausbleiben von Störeffekten zunächst hinreichend untersucht werden.

5.1.3 Analyse der Speichelproben

Die Gesamtkeimmenge und die *P. gingivalis*-Menge wurden mittels qPCR bestimmt. Diese Methode eignet sich sehr gut, da sie sensitiv ist und bereits geringe Mengen bakterieller DNA zuverlässig nachweisen kann. Die Anwendung eines spezifischen Oligonukleotid-Paars ermöglicht zudem die gezielte Detektion. Im Vergleich zu einer gewöhnlichen PCR, die nur qualitative Ergebnisse erbringt, kann bei der qPCR eine quantitative Bestimmung erfolgen, was für diese Studie von zentraler Bedeutung ist. Auch in den oben genannten Studien (Guentsch et al., 2011; Leonov et al., 2024) wurde die qPCR angewandt. Die anschließend durchgeführte Gelelektrophorese ist ebenfalls ein Standard-Verfahren für die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten und ist hinsichtlich ihrer Genauigkeit eine zuverlässige Methode. Der Farbstoff Midori Green Xtra (*Nippon Genetics EUROPE*) hat eine Sensitivität von 8 ng für DNA (*Nippon Genetics EUROPE*, Manual Midori Green Xtra). Andere Verfahren zur Größenbestimmung, wie beispielsweise die Kapillarelektrophorese, bieten eine höhere Auflösung und Empfindlichkeit. Die Gelelektrophorese hingegen ist einfacher durchzuführen und eignet sich besser für Routineanwendungen sowie für die Analyse einer großen Anzahl von Proben.

Ein weiterer Aspekt, der diskutiert werden muss, ist die Anwendung des FRET-Assays zur Bestimmung der Gingipain-Aktivität (siehe Kapitel 3.2.7). Eine andere Methode wäre zum Beispiel der ELISA. Damit kann ein quantitativer Nachweis eines Antigens in einer Probe durchgeführt werden. Es gibt den direkten, den indirekten und den Sandwich-ELISA (Müller-Esterl, 2018). Guentsch et al. (2011) beispielsweise nutzten in Ihrer Studie die ELISA Technik, um das Level an Arg-Gingipainen in der GCF zu bestimmen. Mit dem FRET kann mit hoher Sensitivität und Reproduzierbarkeit eine Echtzeitmessung von molekularen Interaktionen durchgeführt werden (Bikker et al., 2019). Man kann dynamische Prozesse wie zum Beispiel Protein-Protein-Interaktionen oder Enzymaktivitäten erfassen. Ein Vorteil des FRET-Enzym-Assays gegenüber dem ELISA besteht darin, dass hierbei nicht nur die reine Enzymmenge, sondern auch die Enzymaktivität bestimmt wird. Dies stellt jedoch gleichzeitig einen Nachteil dar, da auch andere Enzyme das Substrat spalten und damit Signale erzeugen können, wie zum Beispiel das Enzym Trypsin.

5.1.4 Erfassung des parodontalen Zustands

Letztlich muss noch auf die Zahngesundheitsbefragung zur Einschätzung des Parodontitis-Risikos eingegangen werden. Diese Methode ist eine nicht invasive, schmerzfreie und für die Probanden weniger aufwendige Alternative zur klinischen Untersuchung. Dennoch kann nicht kontrolliert werden, ob die Probanden die Befragung wahrheitsgemäß beantworten. Eine verlässlichere Einschätzung des Parodontitis-Status könnte daher durch klinische Untersuchungen wie zum Beispiel durch die Bestimmung des PSI erfolgen. Trotzdem muss berücksichtigt werden, dass bei weniger invasiven und für die Patienten komfortableren Methoden eine höhere Compliance zu erwarten ist.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit kritisch im Kontext der bestehenden Fachliteratur interpretiert, ihre methodischen Implikationen beleuchtet und die Relevanz für Forschung und Praxis diskutiert.

5.2.1 Auswahl geeigneter Oligonukleotid-Paare

Bei der qPCR zur Auswahl geeigneter Oligonukleotid-Paare zeigten die Reaktionen mit zwei der getesteten Oligonukleotid-Paare, nämlich Pg und Pg2, kein Amplifikat. Da alle vier Oligonukleotid-Paare im selben Durchlauf und folglich unter denselben PCR-Bedingungen untersucht wurden, können folgende Gründe für die fehlenden Amplifikate ausgeschlossen werden: zu geringe DNA-Konzentration in der Speichelprobe, inhibitorische Substanzen, ungeeignetes PCR-Kit und unzureichende DNA-Extraktion. Daher kann angenommen werden, dass für die Oligonukleotid-Paare Pg und Pg2 kein spezifisches PCR-Produkt entstand, womit diese für weitere Analysen ungeeignet sind. Das Oligonukleotid-Paar Pg3 hat ein Amplifikat der richtigen Größe synthetisiert, jedoch ist HYq4 mit einer Amplifikatsgröße von 214 bp näher an der Amplifikatsgröße von U1 (200 bp), als Pg3 mit 143 bp. Somit lässt sich eine ähnliche Effizienz für die qPCR erwarten. Daher wurde für die folgenden Analysen mit HYq4 gearbeitet. Das Oligonukleotid-Paar U1 zeigte – neben der erwünschten Reaktion – auch ein Amplifikat für die Negativprobe. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass es zu einer Kreuzkontamination mit der DNA aus den positiven Proben gekommen ist, beispielsweise durch unsauberes Pipettieren oder durch Aerosole. Außerdem könnte es zu einer Oligonukleotid-Dimerbildung gekommen sein. Oligonukleotide sind in der Lage miteinander zu hybridisieren, was folglich zu einer Verlängerung der Oligonukleotide führt. Es bilden sich also unspezifische PCR-Produkte, die Oligonukleotid-Dimere. Dies kann bei allen Methoden mit Oligonukleotiden passieren. Methoden unter Interkalation von Farbstoffen sind jedoch weniger sensitiv als solche mit Sonden (Gudnason et al., 2007), weshalb solche Effekte eher auftreten können. Bei der Gelelektrophorese zeigte die Negativprobe des Oligonukleotid-Paars HYq4 eine Bande, obwohl in der qPCR kein Amplifikat produziert wurde. Dies ist höchstwahrscheinlich auf eine Kontamination der Gelkammer zurückzuführen. Ein weiterer möglicher Grund könnte darin liegen, dass bei der Gelelektrophorese auch Einzelstrang-DNA oder Fragmente detektiert werden, die in der qPCR nicht amplifiziert wurden.

5.2.2 Effizienz der *Real-Time* PCR

Im Anschluss an die qPCR-Analyse der eigenen Speichelprobe zur Etablierung der Methoden wurde die Effizienz der qPCR bestimmt. Die Effizienz ist der Anteil der Zielmoleküle, die in einem PCR-Zyklus kopiert werden. Optimal ist demnach eine Effizienz von 100 %, wobei mindestens 90 % noch tolerierbar wären (Svec et al., 2015). Eine Effizienz von über 100 % ist in der Theorie eigentlich nicht möglich, kann in der Praxis aber durchaus auftreten und weist auf Fehlerquellen hin. Ursachen könnten beispielsweise eine Oligonukleotid-Dimerbildung, eine ungeeignete Standardkurve, Pipettierfehler oder das Fluoreszenzverhalten des Farbstoffs sein. Dennoch ist ein wichtiger Aspekt, dass bei der Korrelation von PCR-Produkten – etwa im Rahmen einer Normierung, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde – die Effizienzen zueinander passen müssen. Damit kann das Vorliegen einer adäquaten Effizienz als gegeben gesehen werden. Zur Abschätzung der Effizienz hat sich die Standardkurve als zuverlässigster Ansatz erwiesen. Dafür muss eine Reihe von Proben mit kontrollierten relativen Mengen der Zielvorlage durch eine serielle Verdünnung erzeugt werden. Am häufigsten wird dies mit zehnfachen Verdünnungsschritten durchgeführt. Dies wurde für beide Oligonukleotid-Paare U1 und HYq4 gemacht, was sich jedoch als ungeeignet erwies. Die Verdünnungsfaktoren waren vermutlich zu hoch, wodurch die DNA-Konzentration zu gering war. Eine geringe DNA-Konzentration wiederum hat zur Folge, dass es nicht möglich ist, Amplifikate dafür zu erzeugen. Dies war auch in der Studie von Leonov et al. (2024) der Fall. Die Autoren erwähnen, dass es aufgrund der geringen DNA-Konzentration nicht möglich war, Amplifikate für alle zu untersuchenden Bakterien zu generieren. Deshalb musste für diese Arbeit bei der Speichelprobenanalyse der Probanden eine Standardreihe mit anderen

Verdünnungsschritten mitgeführt werden. Diese waren bei U1 die Verdünnung 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000 und bei HYq4 1:2, 1:4, 1:6, 1:8. Die Standardreihe konnte anschließend dazu genutzt werden, eine quantitative Aussage über die Menge der Ziel-DNA in der Probe zu treffen, indem diese mit einer bekannten Konzentration aus der Standardreihe verglichen wird. Ohne Standardreihe erhält man hingegen nur relative Werte.

Die ermittelte Effizienz für das Oligonukleotid-Paar U1 betrug 112 % und für HYq4 136 %. Wie bereits erwähnt, deutet eine Effizienz von über 100 % typischerweise auf methodische oder technische Fehlerquellen hin (Svec et al., 2015). Bei der Analyse dieser Arbeit könnten die Oligonukleotid-Dimer-Bildung und eventuelle Pipettierfehler als Fehlerquelle wahrscheinlich sein. Die Standardkurve wurde nämlich, nachdem sie sich beim ersten Versuch als ungeeignet erwiesen hat, angepasst und in Duplikaten durchgeführt.

5.2.3 Nachweis der Gesamtkeimmenge und *P. gingivalis*-Menge mithilfe der *Real-Time* PCR

Beim Nachweis der Gesamtkeimmenge mithilfe der qPCR mit dem Oligonukleotid-Paar U1 zeigten alle 36 Proben (vier von 40 Proben fehlten, beziehungsweise konnten aufgrund fehlender Beschriftung nicht zugeordnet werden) ein Amplifikat. Hierbei kam es häufiger zu einer Zunahme der Gesamtkeimmenge ($n = 11$) bei t1 im Vergleich zu t0. Eine Abnahme konnte nur sechs Mal erfasst werden. Der Grund für eine Zunahme der Gesamtkeimmenge könnte sein, dass im Laufe der 14 Tage die Motivation zur Durchführung der Mundhygiene abgenommen hatte.

Beim Nachweis der *P. gingivalis*-Menge mithilfe des Oligonukleotid-Paars HYq4 zeigten 12 der 36 Proben kein Amplifikat. Bei drei Probanden waren beide Proben betroffen, wobei ein Proband durch die Zahngesundheitsbefragung der Gruppe 2 (Parodontitis-Risiko 33-45 %) und zwei Probanden der Gruppe 5 (Parodontitis-Risiko 91-100 %) zugeordnet wurden. In vier Fällen war die Probe zu t0 betroffen, wovon ein Proband der Gruppe zwei und einer der Gruppe fünf zugeordnet werden konnte. Die übrigen Proben zu t0 waren von Probanden, die nicht an der Zahngesundheitsbefragung teilgenommen haben. In einem Fall war nur die Probe zu t1 betroffen. Auch hier konnte keine Gruppenzuordnung durch fehlende Teilnahme an der Zahngesundheitsbefragung erfolgen. Folglich wäre zu erwarten, dass mindestens bei den Proben aus Gruppe 5 ($n = 5$) Amplifikate synthetisiert werden. Es konnte kein Zusammenhang zu der Gesamtkeimmenge gefunden werden. Außerdem liegt laut der sechsten Deutschen Mundgesundheitsstudie (2025) die Gesamtprävalenz für Parodontitis bei 85,2 % für jüngere Senioren (65-74 Jahre), wobei die Prävalenz für das Parodontitis-Stadium IV mit 26,4 % am häufigsten ist. Dies ist die Altersgruppe, der auch unsere Probanden angehören. Daher war zusätzlich zu erwarten, dass mindestens zehn Proben Amplifikate für *P. gingivalis* aufweisen würden – was auch der Fall war. Gründe für fehlende Amplifikate könnten zum einen systemische Fehler sein (Taylor et al., 2019). Dazu gehören Pipettierfehler, eine Kontamination der Proben, Fehler bei der Probenlagerung, eine ungeeignete Extraktionsmethode oder eine zu niedrige DNA-Konzentration. Die fehlerhafte Probenlagerung wurde bereits in Kapitel 5.1.1 diskutiert und kommt durchaus als möglicher Grund für fehlende Amplifikate in Frage. Eine Kontamination der Proben ist ebenfalls möglich, jedoch ist die PCR sehr sensitiv. Das heißt, dass auch bei einer Kontamination DNA amplifiziert werden müsste. Die ungeeignete Extraktionsmethode lässt sich als Grund ausschließen, da alle 36 Proben auf die gleiche Art und Weise aufbereitet wurden und im selben qPCR-Durchlauf untersucht wurden. Schließlich kann eine geringe DNA-Konzentration eine Rolle spielen. Wenn die Ausgangs-DNA-Konzentration zu niedrig ist, kann sie durch die PCR möglicherweise nicht effizient genug amplifiziert werden. Dies wird unterstützt durch den Fakt, dass *P. gingivalis* in der Mundhöhle im Vergleich zu anderen opportunistischen Bakterien in sehr geringen Mengen vorhanden ist (Lee et al., 2020). Auch in der Studie von Leonov et al. (2025) war es aufgrund der ungenügenden DNA-Konzentration in einigen Proben nicht möglich, für alle Bakterien Amplifikate zu erhalten. Für *P. gingivalis* waren es 182 von 189 Proben. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass *P. gingivalis* eher im Biofilm als frei im Speichel (Abusleme et al., 2013; Donne und Dewilde, 2015) oder in parodontalen Läsionen (Hajishengallis, 2014) zu erwarten ist, wohingegen Gingipaine sezerniert werden und daher im Speichel aufzufinden sind.

Ein weiterer Grund für fehlende Amplifikate kann das Vorhandensein von inhibitorischen Substanzen in den Proben sein (Sidstedt et al., 2020). Diese können die Aktivität der DNA-Polymerase beeinträchtigen. Zum einen kann Hämoglobin als Inhibitor wirken. Da einige Proben auch Blut enthielten, kann dies nicht ausgeschlossen werden. Jedoch waren unter den elf Proben ohne Amplifikat auch Proben dabei, die kein Blut enthielten. Zum anderen können Rückstände von Phenol oder phenolhaltigen Verbindungen wie Chelex-100, Rückstände von Ethanol, Isopropanol und Detergenzien sowie hohe Salz- und Glycerinkonzentrationen die PCR stören. Zudem ist möglich, dass Proteinrückstände in der PCR-Mischung, einschließlich solcher aus nicht ausreichend gereinigten DNA-Extraktionen, vorhanden sind, die inhibierend wirken können. Außerdem ist noch zu erwähnen, dass vor der Probenentnahme sehr gut erfolgte Mundhygienemaßnahmen die DNA-Menge reduziert haben könnten.

Letztlich muss auch in Betracht gezogen werden, dass das Fehlen von Amplifikaten durch eine tatsächliche Abwesenheit von *P. gingivalis* begründet sein kann. Von den zwölf Proben waren jedoch nur drei Proben, bei denen die entsprechenden Probanden zur Gruppe zwei zugeordnet wurden (Risiko für das Vorliegen von Parodontitis bei 33-45 %), womit ein Amplifikat nicht zwangsläufig zu erwarten ist. Bei n = 5 Proben wurden die Probanden, der Gruppe 5 zugeordnet (Risiko für das Vorliegen von Parodontitis bei 91-100 %), weshalb hier Amplifikate zu erwarten sind. Bei den übrigen vier Proben ist es unklar, ob wirklich keine Parodontitis vorliegt, da diese von Probanden stammen, die nicht an der Zahngesundheitsbefragung teilgenommen haben.

5.2.4 Bestimmung der Gingipain-Aktivität im Speichel mittels FRET

Zur Bestimmung der Gingipain-Aktivität im Speichel wurde ein FRET-Assay durchgeführt. Es wird deutlich, dass ein Fluoreszenz-Signal nur bei den Proben, die das entsprechende Peptid und die Speichelprobe enthielten, messbar war. Das Peptid 3107 wird von Arg- und das Peptid 3215 von Lys-Gingipainen gespalten. Zum Vergleich wurde einer Probe Trypsin beigefügt, da das Peptid 3107 zusätzlich durch Trypsin gespalten werden kann, wie eine *in silico* Analyse ergab (*PeptideCutter ExPASy*; Gasteiger et al., 2005). Das heißt, dass das Fluoreszenzsignal in der Probe mit Trypsin höher ausfallen sollte, da hier mehr Enzym wirken kann und somit mehr Spaltung stattfindet. Diese Erwartung wurde erfüllt, da der Zusatz von Trypsin zu einer etwa 11 %igen Erhöhung des Signals gegenüber der Kontrolle führte. Eine ähnliche Kontrolle wurde für das eigentlich durch Trypsin nicht-spaltbare Peptid 3215 durchgeführt. Erstaunlicherweise war das Fluoreszenz-Signal bei Peptid 3215 mit Trypsin im Vergleich zu der Probe ohne Trypsin signifikant um etwa 5 % niedriger als in der Kontrolle, obwohl es keinen Unterschied hätte geben müssen, da das Peptid 3215 nicht von Trypsin gespalten wird. Ein Grund, der zu diesem Ergebnis führen könnte, wäre, dass Trypsin Gingipain spalten kann. Somit wäre weniger Enzym für die Spaltung des Peptids verfügbar, was zu einer Senkung des Signals aus der Speichelprobe führen würde. Da also ein signifikanter Unterschied gemessen wurde, kann man darauf schließen, dass Artefakte durch das Vorhandensein von Trypsin möglich sind, diese aber mit 11 und 5 % nur einen geringen Teil der Reaktion darstellen.

Für unsere Analysen muss berücksichtigt werden, dass Speichel neben Gingipainen auch zahlreiche andere endogene Proteasen wie zum Beispiel Kallikreine oder Serin- und Cysteinproteasen enthält. Die Beobachtung, dass Trypsin möglicherweise Gingipain inaktivieren kann und Einfluss auf Peptide hat, die durch Gingipain gespalten werden, legt nahe, dass auch andere Proteasen im Speichel die Messergebnisse beeinflussen könnten. Daher ist es möglich, dass das gemessene Fluoreszenzsignal nicht ausschließlich die Gingipain-Aktivität widerspiegelt, sondern durch Wechselwirkungen oder unspezifische Spaltungen beeinflusst wird. Dennoch lässt sich betonen, dass der Beitrag der Artefakte zur Gesamtfluoreszenz-Signalstärke vernachlässigbar klein bleibt.

5.2.5 Wirkung von Galocatechingallat auf Gingipaine im Speichel und Bestimmung des einzusetzenden Probenvolumens

Um die Spezifität des gemessenen Signals zu prüfen, wurde die Wirkung von GCG auf die Gingipaine im Speichel getestet. Außerdem konnte dadurch untersucht werden, welches Probenvolumen für die Analyse geeignet ist. Dazu wurde 1 mM GCG-Lösung verwendet. GCG

ist ein nicht-kompetitiver Inhibitor von Gingipainen (Okamoto et al., 2004). Das heißt, dass es nicht direkt am aktiven Zentrum bindet, sondern vermutlich die Enzymstruktur verändert oder mit einer anderen Bindungsstelle interagiert. Der Inhibitor kann also sowohl an ein freies Enzym als auch an einen Enzym-Substrat-Komplex binden. Für GCG liegt der IC₅₀-Wert bei 3-5 µM für die Arg- und Lys-Gingipaine, wobei die Hemmung der Lys-Gingipaine weniger stark ausgeprägt ist (Okamoto et al., 2004). Dazu muss gesagt werden, dass der IC₅₀-Wert in reinen in vitro Ansätzen ohne biologische Matrix wie Speichel ermittelt wird. Daher ist es möglich, dass die Konzentration des Inhibitors für eine entsprechende Inhibition in vivo höher sein muss. Im Versuch hat eine signifikante Inhibition der Gingipaine durch GCG stattgefunden, sodass trotz der möglichen Spaltung durch andere Speichelenzyme (siehe oben), von einem im wesentlichen spezifischen Nachweis auszugehen ist.

Zwischen einer eingesetzten Probenmenge von 1 und 5 µl ergab sich ein proportionaler Anstieg des gemessenen Signals. Dies war zwischen der eingesetzten Probenmenge von 5 und 10 µl jedoch nicht zu beobachten, woraus sich schließen lässt, dass die Enzymaktivität nicht linear zur Substratmenge ansteigt. Grund dafür könnte sein, dass die Substratkonzentration für diese Enzymmenge zu gering ist. Zudem war bei allen Probenmengen trotz Einsatz des Inhibitors GCG eine verbleibende Restaktivität zu verzeichnen. Dies könnte daran liegen, dass selbst bei sehr hohen Inhibitor-Konzentrationen meist eine Restaktivität des Enzyms bestehen kann, da nicht alle Enzyme gleichzeitig gehemmt werden, oder da sich einige Enzyme durch reversible Hemmung wieder regenerieren (Okamoto et al., 2004). Außerdem könnte das Fluoreszenzsignal durch die Aktivität anderer Proteasen im Speichel, die nicht durch GCG gehemmt werden, ausgelöst werden. Ein weiterer Grund wäre, dass durch die hohe Probenmenge eine sehr hohe Menge an Substrat vorhanden ist, die nicht vollständig durch den Inhibitor bewältigt werden kann. Je höher die Probenmenge, umso wahrscheinlicher ist es, dass dieser Effekt auftritt. Um diesen Limitationen entgegenzuwirken, wurde entschieden, dass in den darauffolgenden Versuchen mit einem Probenvolumen von 5 µl gearbeitet wird.

5.2.6 Fehlende Korrelation der Gingipain-Aktivität mit den Bakterienmengen

Nachdem die Gingipain-Aktivität mithilfe des FRET-Assays detektiert wurde, sollte die Korrelation der Gingipain-Aktivität mit den Bakterienmengen untersucht werden. Hier war die Annahme, dass es eine positive Korrelation zwischen der Gesamtbakterienlast und der *P. gingivalis*-Menge, zwischen der Gingipain-Aktivität und der *P. gingivalis*-Menge, sowie zwischen Gingipain-Aktivität und Gesamtbakterienlast vorliegt. Vor allem wurde dies bereits für das subgingivale Mikrobiom bestätigt (Abusleme et al., 2013). Von diesen Annahmen konnte in dieser Arbeit die Korrelation zwischen Gingipain-Aktivität und Gesamtbakterienlast bestätigt werden. Das bedeutet, dass eine erhöhte Gesamtbakterienlast mit einer erhöhten Prävalenz von *P. gingivalis* einhergeht, da die Aktivität der Gingipaine auf das Vorhandensein von *P. gingivalis* schließen lässt. Folglich war zu erwarten, dass die Gingipain-Aktivität, mit der durch die qPCR ermittelte *P. gingivalis*-Menge korreliert. Eine Korrelation konnte jedoch nicht festgestellt werden. Als Grund dafür ist anzunehmen, dass die qPCR zur Bestimmung der *P. gingivalis*-Menge keine optimalen Ergebnisse zur weiteren statistischen Auswertung geliefert hat, da vermutlich die DNA von *P. gingivalis* in zu geringer Menge vorhanden ist und sich eventuell inhibitorische Substanzen in den Proben befanden. Um ein aussagekräftigeres Ergebnis zu erhalten könnte eine andere Methode zur Probenentnahme angewandt werden. Beispielsweise die Papierspitzen oder die Filterpapierstreifen. Außerdem müssten mehr Probanden rekrutiert werden, um mehr Proben zu erhalten. Liegt ein aussagekräftiges Ergebnis für die qPCR vor, kann dieses auf das Vorhandensein einer positiven Korrelation mit der Gesamtbakterienlast und der Gingipain-Aktivität untersucht werden.

5.2.7 Abhängigkeit der Gingipain-Aktivität von biochemischen Stressmarkern

Aufgrund der Annahme einer Abhängigkeit zwischen Parodontitis und Stress, war eine positive Korrelation zwischen der Gingipain-Aktivität, die auf das Vorhandensein von *P. gingivalis* hindeutet, und den Stressmarkern Cortisol und Alpha-Amylase zu erwarten. Es konnte jedoch keine signifikante Korrelation festgestellt werden. Für die Relation von Alpha-Amylase und

Gingipain-Aktivität zu t0 betrug $r = -0,04035$ ($p = 0,8697$) und zu t1 $r = 0,1593$ ($p = 0,5402$). Für die Relation zwischen Cortisol und Gingipain-Aktivität zu t0 betrug $r = 0,1807$ ($p = 0,4591$) und zu t1 $r = -0,06373$ ($p = 0,8094$). Dies könnte daran liegen, dass nicht jeder Proband erhöhte Cortisol- und Alpha-Amylase Werte hat. Nur drei der 20 Probanden zeigten bei t0 erhöhte Cortisolwerte (0,48 µg/dl, 1,24 µg/dl und 1,13 µg/dl) und nur ein Proband bei t1 (1,05 µg/dl). Außerdem könnte auch die geringe Probenzahl eine Ursache für das Ergebnis sein. Zudem könnte es an der Heterogenität der Probanden liegen. Die Probanden zeigen unterschiedliche Gesundheitszustände, Stresslevel, orale Bakterienzusammensetzung, unterschiedliches Alter und Geschlecht und individuelle Mundhygiene. Ein weiterer Aspekt ist der Einfluss der Speichelflussrate. Eine hohe Speichelflussrate, zum Beispiel durch Stress oder bei der Nahrungsaufnahme kann die Konzentration der Gingipaine verdünnen. Letztlich muss gesagt werden, dass die Alpha-Amylase einen Marker für akuten Stress darstellt. Da die Gingipain-Aktivität eher mit chronischem Stress zusammenhängt, könnte dies erklären, weshalb keine Korrelation mit Alpha-Amylase gefunden werden konnte. Cortisol hingegen kann bei chronischem Stress dauerhaft erhöht sein, weshalb die Bestimmung des Cortisollevels und die anschließende Prüfung auf eine Korrelation mit der Gingipain-Aktivität als ein besonders geeigneter Ansatz scheint. Das saliväre Cortisol stellt jedoch ebenfalls einen Marker für akuten Stress dar. Daher wurde zusätzlich das Haarcortisol betrachtet. Durch die Bestimmung der Konzentration von Haarcortisol kann eine Aussage über langfristigen Stress erfolgen, da Cortisol über mehrere Wochen bis Monate im Haar gespeichert wird (Staufenbiel et al., 2013; Lee et al., 2015). Die Analysen ergaben jedoch keine signifikante positive Korrelation zwischen Haarcortisol-Konzentration und Gingipain-Aktivität ($r = -0,11$; $p = 0,68$), Gesamtbakterienlast ($r = 0,11$; $p = 0,697$) oder *P. gingivalis*-Menge ($r = 0,27$; $p = 0,3846$). Dies könnte an der geringen Probenzahl liegen. Ein signifikantes Ergebnis wäre vermutlich mit einer höheren Probandenzahl zu erhalten.

5.2.8 Ergebnisse der Befragung zur Zahngesundheit

An der Befragung nahmen zwölf der 20 Probanden teil. Eine Anzahl von zwölf Probanden ist nicht ausreichend, um statistisch signifikante Auswertungen durchzuführen. Dennoch soll im Folgenden das Ergebnis diskutiert werden. Bei einem Durchschnittsalter der zwölf Probanden von 70 Jahren, war zu erwarten, dass die Gruppen drei bis fünf am meisten vertreten sind, da laut der sechsten Deutschen Mundgesundheitsstudie (2025) etwa 77 % der 65 bis 74-jährigen eine moderate oder schwere Parodontitis (Stadium II-IV) aufweisen. Diese Erwartung ist auch eingetroffen. Sieben von zwölf Probanden konnten den Gruppen 3-5 zugeordnet werden. Davon gehörte die Mehrzahl ($n = 6$) der Gruppe 5 an. Damit ist die eingeschlossene Probandenkohorte repräsentativ.

5.2.9 Korrelation der Parodontitis-Einschätzung mit den biochemischen Stressmarkern und der Gingipain-Aktivität

Da Stress ein Risikofaktor für Parodontitis ist (Sheiham und Nicolau, 2005), war eine positive Korrelation zwischen dem Risiko für das Vorliegen einer Parodontitis, welches mittels Fragebogen erfasst wurde, und biochemischen Stressmarkern zu erwarten (Ardila und Guzman, 2016). Für die Auswertung wurden die Mittelwerte der biochemischen Stressmarker für Gruppen 1 bis 2 und für die Gruppen 3 bis 5 gebildet und verglichen. Die Auswertung ergab einen nicht signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen für Alpha-Amylase, salivärem Cortisol und Haarcortisol. Dies könnte damit zusammenhängen, dass zu wenige Probanden an der Befragung teilgenommen haben, womit kein aussagekräftiges und statistisch nutzbares Ergebnis erzielt werden konnte. Für die FRET-Messung ergab sich ein signifikanter Unterschied, wobei mit dem Mittelwert der Fluoreszenz der beiden genutzten Peptide gearbeitet wurde. Hier war wider Erwarten der Mittelwert der Gruppen eins und zwei höher als der der Gruppen drei bis fünf.

5.3 Schlussfolgerung

Im Hinblick auf die eingangs gestellten Forschungsfragen, inwiefern die Menge an *P. gingivalis* bei pflegenden Angehörigen von Menschen mit Demenz mit Stress korreliert und inwiefern hier eine erhöhte Prävalenz von Parodontitis beobachtet werden kann, haben unsere Daten keine signifikante Verbindung, jedoch eine Tendenz zur Korrelation zwischen den biochemischen Stressmarkern Cortisol und Alpha-Amylase und der Gingipain-Aktivität als Surrogat-Parameter für parodontale Dysbiose ergeben. Wie bereits erläutert, dürften mehrere Faktoren diese fehlende Signifikanz beeinflussen. Nichtsdestotrotz untermauert selbst die beobachtete Richtung der Korrelation die Annahme, dass Stress bei pflegenden Angehörigen einen klinisch relevanten Einfluss auf die orale Gesundheit haben könnte. Zukünftige Studien sollten daher größere Kohorten untersuchen und eventuell eine klinische Untersuchung zur Bestimmung des parodontalen Zustands durchführen.

5.4 Weiterführende Fragestellung: Mögliche Übertragbarkeit der Alzheimer-Demenz zwischen Erkrankten und Angehörigen

Nachdem nun ausführlich diskutiert wurde, inwiefern pflegende Angehörige von Menschen mit Alzheimer-Demenz aufgrund ihres Stresslevels einem erhöhten Parodontitis-Risiko ausgesetzt sind, stellt sich nun die Frage, ob eine erhöhte Prävalenz von Parodontitis eventuell mit einer möglichen Übertragung von *P. gingivalis* vom Alzheimer-Patienten auf den pflegenden Angehörigen zu tun hat. Diese Frage ist nicht uninteressant, da bekannt ist, dass Parodontitis das Risiko für Alzheimer-Demenz erhöht beziehungsweise *P. gingivalis* möglicherweise an der Pathogenese von Alzheimer beteiligt ist (Sadrameli et al., 2020). Norton et al. (2010) untersuchten in ihrer populationsbasierten Kohortenstudie, inwieweit das Risiko an Demenz zu erkranken erhöht ist, wenn der Ehepartner bereits betroffen ist. Dazu wurden 1221 verheiratete Paare rekrutiert, die zu Studienbeginn keine Demenz aufwiesen, und über einen Zeitraum von zwölf Jahren beobachtet. Um den Demenzstatus zu bestimmen, wurden kognitive Tests in regelmäßigen Abständen bestimmt. Während der Nachbeobachtungszeit entwickelten 125 Männer und 70 Frauen Demenz. In 30 dieser Fälle waren beide Ehepartner betroffen. Die Risikobewertung ergab, dass Personen, deren Ehepartner an Demenz erkrankt waren, ein signifikant höheres Risiko aufweisen selbst auch eine Demenz zu entwickeln. Die *Hazard Ratio* betrug 6,4. Dies bedeutet, dass das Risiko für Demenz bei diesen Personen etwa sechsmal höher war als bei Personen, deren Ehepartner nicht erkrankt war. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass das Leben mit einem an Demenz erkrankten Ehepartner das eigene Demenzrisiko erheblich erhöhen kann. Mögliche Erklärungen hierfür könnten der erhebliche Stress und die Belastung sein, die mit der Pflege des erkrankten Ehepartners einhergehen. Dennoch bedarf es weiterer Forschung, um die zugrundeliegenden Mechanismen zu erfassen und die spezifischen Anfälligkeiten der betroffenen Ehepartner zu ermitteln.

Nun stellt sich die Frage, inwieweit das Mikrobiom bei der Übertragung von Alzheimer-Demenz zwischen dem Pflegenden Angehörigen und dem Erkrankten beteiligt sein könnte. Zhang et al. (2023) sind dieser Frage in einer ihrer Studien nachgegangen und nutzten dafür Mausmodelle und Humanstudien. Für die Tiermodelle wurden Wildtyp-Mäuse (WT-Mäuse) und transgene Mäuse (5xFAD Mäuse) verwendet, die für Alzheimer-Demenz prädisponiert sind. Um ein Zusammenleben von Alzheimer-Demenz Patient und Ehepartner beziehungsweise Angehörigem zu simulieren, wurden die WT-Mäuse mit den 5xFAD Mäusen in einen Käfig für drei Monate zusammengebracht. Nach den drei Monaten entwickelten sowohl die 5xFAD Mäuse als auch die mit ihnen zusammenlebenden WT-Mäuse kognitive Beeinträchtigungen im Vergleich zu den WT-Mäusen, die nicht mit 5xFAD Mäusen zusammenlebten. Dies wurde mithilfe des *Morris water maze* und des *Barnes maze* Test erfasst. Ähnliche Effekte traten nach der Übertragung von fäkalem Material auf, blieben jedoch aus, wenn die Mäuse lediglich durch Luftaustausch in benachbarten Käfigen verbunden waren. Daraus lässt sich schließen, dass für eine Übertragung ein enges Zusammenleben notwendig ist.

Außerdem zeigten die 5xFAD Mäuse eine veränderte Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms im Vergleich zu den WT-Mäusen. Der *Simpson diversity index* für die Alpha-Diversität war mit etwa 24 statistisch signifikant für die 5xFAD Mäuse ($p = 0,019$) und mit etwa 22 grenzwertig signifikant für die WT-Mäuse ($p = 0,069$), die mit 5xFAD Mäusen zusammenlebten. Beide Werte waren höher als der Wert für die WT-Mäuse, der nur bei etwa 15 lag. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass das Zusammenleben zu einem Transfer des Mikrobioms von 5xFAD Mäusen auf die WT-Mäuse führen könnte. Jedoch muss erwähnt werden, dass Mäuse ein spezielles Verhalten, nämlich die Koprophagie, zeigen. Dies eröffnet einen neuen Weg für den Transfer von Mikrobiom, welcher bei Menschen nicht vorhanden ist, weshalb die Studie von Zhang et al. im Hinblick auf ihre Bedeutung für den Transfer bei Menschen kritisch zu betrachten ist. Beim Menschen ist eine Übertragung des oralen Mikrobioms beispielsweise durch die gemeinsame Nutzung von Besteck oder Gläsern und durch Lippen- und Zungenkontakt beim Küssen, viel eher vorstellbar.

Neben den Mausversuchen wurde die Mikrobiota von Menschen mit Alzheimer-Demenz, von ihren pflegenden Ehepartnern und von gesunden Probanden als Kontrollgruppe untersucht. Dazu wurden die orale und die fäkale Mikrobiota der eben genannten Gruppen miteinander verglichen. Die taxonomische Verteilung, welche die Häufigkeit und Vielfalt verschiedener taxonomischer Gruppen innerhalb einer biologischen Gruppe, hier innerhalb eines Mikrobioms, meint, war sowohl im fäkalen als auch im oralen Mikrobiom bei Personen mit Alzheimer-Demenz und bei dessen Ehepartnern ähnlich. Beide Gruppen zeigten beispielsweise ein erhöhtes Vorkommen von *Bacilli* (45-50 %) und *Clostridia* (etwa 20 %) und ein niedrigeres Vorkommen von *Gamma-* (8-10 %) und *Betaproteobacteria* (etwa 5 %) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (*Bacilli* 30 %, *Clostridia* 10 %, *Gammaproteobacteria* 15 %, *Betaproteobacteria* 15 %). In der Studie werden jedoch keine spezifischen Daten zu *P. gingivalis* präsentiert. Das Augenmerk liegt auf der Gesamtdysbiose des oralen Mikrobioms, ohne einzelne Spezies wie *P. gingivalis* gesondert auszuweisen oder zu diskutieren. Basierend auf den vorliegenden Daten kommen die Autoren zu der Annahme, dass bei Patienten mit Alzheimer-Demenz das krankheitsassoziierte orale und intestinale Mikrobiom auf nicht-erkrankte Individuen übertragen wird und dort ein ähnliches Dysbiose-Profil erzeugt wird. Dennoch ist zu berücksichtigen, dass trotz der Ähnlichkeiten in Bezug auf die Mikrobiota keine signifikanten Unterschiede bei den Ehepartnern im Vergleich zu der Kontrollgruppe im *Mini-Mental-State-Exam* (MMSE) und im *Clinical dementia rating* nachweisbar waren. Das bedeutet, dass keine kognitive Beeinträchtigung bei den Ehepartnern beobachtet werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine mögliche Übertragung von *P. gingivalis* zwischen Alzheimer Patienten und ihren pflegenden Angehörigen in Betracht gezogen werden muss und Alzheimer-Patienten und ihre pflegenden Angehörigen sehr ähnliche orale Mikrobiomprofile aufweisen. Jedoch fehlen bisher spezifische Angaben zu *P. gingivalis*, welche die Hypothese unterstützen würden, dass eine Übertragung zu einem erhöhten Parodontitis-Risiko bei pflegenden Angehörigen führen würde.

6. Zusammenfassung

In dieser Dissertation wurde erstmals der Zusammenhang zwischen chronischem Stress pflegender Angehöriger von Alzheimer-Patienten und Indikatoren parodontaler Dysbiose im Speichel systematisch untersucht. Die zentralen Fragestellungen waren, inwieweit die Menge an *P. gingivalis* bei pflegenden Angehörigen von Menschen mit Demenz mit Stress korreliert und inwiefern hier eine erhöhte Prävalenz beobachtet werden kann.

Die Speichelproben und die Daten zu den biochemischen Stressmarkern Cortisol und Alpha-Amylase wurde von der Studie „Biopsychologische Mechanismen der Stressbelastung und der Resilienzfaktoren im Alltag von pflegenden Angehörigen von Menschen mit Demenz“ des ZpGA rekrutiert. Für diese Arbeit erfolgte eine Sekundäranalyse der vorliegenden Daten.

Als zentrale Untersuchungsmethoden dienten die qPCR zur Bestimmung der Gesamtbakterienlast und der *P. gingivalis*-Menge, sowie ein FRET-Assay zur Messung der Gingipain-Aktivität, einem Virulenzfaktor von *P. gingivalis*, wodurch Rückschlüsse auf dessen

Vorkommen und Aktivität gezogen werden konnten. Zur Etablierung dieser Methoden wurden vor der Analyse der Speichelproben der Probanden Vortests mit einer eigenen Speichelprobe durchgeführt. Zudem wurde, orientiert am Parodontitis Selbsttest der DG Paro, eine Zahngesundheitsbefragung durchgeführt, mit der das Risiko für das Vorliegen von Parodontitis eingeschätzt werden konnte.

Die wichtigsten Ergebnisse der Vortests ergaben, dass mithilfe des Oligonukleotid-Paars U1 die Gesamtbakterienlast und mit dem Oligonukleotid-Paar HYq4 die *P. gingivalis*-Menge in Speichelproben verlässlich bestimmt werden kann, da hier spezifische Amplifikate nachgewiesen werden konnten. Außerdem konnte herausgefunden werden, dass die Aktivität der Gingipaine im Speichel mittels FRET-Assay gemessen werden kann, wodurch Rückschlüsse auf die Aktivität von *P. gingivalis* gezogen werden konnten. Die Spezifität der gemessenen Fluoreszenz-Reaktion konnte durch den Zusatz des Inhibitors GCG bestätigt werden, da eine Inhibition der Gingipaine zu einer verringerten Fluoreszenz führte ($p = 0,0025$; *** bei Peptid 3107 und $p < 0,0001$; *** bei Peptid 3215; Probenvolumen 5 μl und 10 μl).

Die Analyse der Speichelproben der Probanden ergab, dass mit der qPCR die Gesamtbakterienlast in allen Speichelproben ($n = 36$) bestimmt werden konnte und *P. gingivalis* in der Mehrzahl der Speichelproben ($n = 12$ von 36) nachweisbar war. Die Gingipain-Aktivität der beiden Gingipain-Klassen Lys- und Arg-Gingipain zeigten eine positive Korrelation zueinander ($r = 0,72$; $p < 0,0001$; ***), woraus sich ergab, dass beide Gingipain-Klassen unmittelbar voneinander abhängig sind und alternativ eingesetzt werden können. Es wurde daher für die folgenden Analysen mit dem Mittelwert der beiden Messungen gerechnet. Anschließend wurde die Korrelation zwischen Gingipain-Aktivität und Bakterienmengen untersucht. Hier zeigte sich eine Tendenz zur positiven Korrelation mit der Gesamtbakterienmenge ($r = 0,29$; $p = 0,081$), jedoch nicht mit der *P. gingivalis*-Menge.

An der Befragung zur Zahngesundheit nahmen zwölf der 20 Probanden teil. Am stärksten vertreten waren die Gruppen 3 bis 5 ($n = 7$) mit einem Risiko für das Vorliegen von Parodontitis von 58-100 %. Davon konnte die Mehrzahl ($n = 6$) der Gruppe fünf mit dem höchsten Risiko (91-100 %) für das Vorliegen einer Parodontitis zugeordnet werden. Schließlich wurden Zusammenhänge zwischen Bakterienmenge, Gingipain-Aktivität, biochemischen Stressmarkern und dem Risiko für das Vorliegen von Parodontitis genauer untersucht. Dies hat zunächst keine signifikante Abhängigkeit zwischen der *P. gingivalis* Menge und der Gingipain-Aktivität ergeben ($p = 0,62$). Jedoch korrelierte die Gingipain-Aktivität tendenziell mit der Gesamtbakterienlast ($r = 0,29$; $p = 0,081$). Bezüglich der Stresshormone ließ sich keine signifikante Korrelation von Gingipain-Aktivität mit Alpha-Amylase, salivärem Cortisol und Haarcortisol beobachten. Bei der Untersuchung des Verhältnisses des Risikos für das Vorliegen einer Parodontitis mit den biochemischen Stressmarkern konnte eine signifikant negative Korrelation zwischen Alpha-Amylase und dem Parodontitis-Risiko festgestellt werden ($r = -0,6274$; $p = 0,0336$). Eine signifikant negative Korrelation konnte auch zwischen der Gingipain-Aktivität und dem Parodontitis-Risiko beobachtet werden ($r = -0,6218$; $p = 0,0468$). Methodische Limitationen ergeben sich insbesondere aus der begrenzten Probandenzahl, der hohen individuellen Variabilität der Stressreaktion und des eventuell geringen Vorkommens von *P. gingivalis* im Speichel. Trotz dieser Einschränkungen leistet diese Dissertation einen wichtigen Beitrag zum aktuellen Forschungsstand, indem sie ein innovatives Kombinationsdesign aus mikrobiellen und stressphysiologischen Biomarkern etabliert und pflegende Angehörige als bislang vernachlässigte Risikogruppe in den Fokus setzt.

Obwohl die vorliegenden Daten im Hinblick auf unsere Ausgangsfrage, inwiefern das chronisch erhöhte Stressniveau pflegender Angehöriger von Alzheimer-Patienten mit einem steigenden Parodontitis-Risiko einhergeht, nur moderat positive Korrelationen zwischen Stress und Gingipain-Aktivität aufzeigten, verdeutlichen sie erstmals eine erkennbare Tendenz, wonach psychophysiologische Belastungen mit erhöhter proteolytischer Enzymaktivität assoziiert sein könnten. Zudem legt die hier angewandte Methodik einen präzisen Weg für künftige Untersuchungen fest. Im Hinblick auf die klinische Bedeutung verdeutlicht diese Arbeit die potenzielle Vulnerabilität pflegender Angehöriger für parodontale Erkrankungen und liefert ein solides Fundament für weiterführende Studien. Für diese werden erweiterte Kohorten, engmaschige Stressprofilierungen und die Integration klinischer

Untersuchungen des parodontalen Zustands empfohlen, um die hier erstmals beobachteten Tendenzen weiter zu validieren.

7. Literaturverzeichnis

- Abusleme, L., Dupuy, A. K., Dutzan, N., Silva, N., Burleson, J. A., Strausbaugh, L. D., Gamonal, J. & Diaz, P. I. 2013. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J*, 7, 1016-25.
- Ardila, C. M. & Guzman, I. C. 2016. Association of *Porphyromonas gingivalis* with high levels of stress-induced hormone cortisol in chronic periodontitis patients. *J Investig Clin Dent*, 7, 361-367.
- Armstrong, A. J. S., Parmar, V. & Blaser, M. J. 2021. Assessing saliva microbiome collection and processing methods. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 7, 81.
- Arweiler, N. B., Marx, V. K., Laugisch, O., Sculean, A. & Auschill, T. M. 2020. Clinical evaluation of a newly developed chairside test to determine periodontal pathogens. *J Periodontol*, 91, 387-395.
- Asher, S., Stephen, R., Mantyla, P., Suominen, A. L. & Solomon, A. 2022. Periodontal health, cognitive decline, and dementia: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Am Geriatr Soc*, 70, 2695-2709.
- Belibasakis, G. N. & Bostanci, N. 2012. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J Clin Periodontol*, 39, 239-48.
- Bergstrom, J. 2004. Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease. *Odontology*, 92, 1-8.
- Bikker, F. J., Nascimento, G. G., Nazmi, K., Silbereisen, A., Belibasakis, G. N., Kaman, W. E., Lopez, R. & Bostanci, N. 2019. Salivary Total Protease Activity Based on a Broad-Spectrum Fluorescence Resonance Energy Transfer Approach to Monitor Induction and Resolution of Gingival Inflammation. *Mol Diagn Ther*, 23, 667-676.
- Blotenberg, I. & Thyrian, J. R. 2022. Die Häufigkeit von Demenzerkrankungen. 9. ed.: Deutsche Alzheimergesellschaft e.V. .
- Bosshardt, D. D. 2018. The periodontal pocket: pathogenesis, histopathology and consequences. *Periodontol 2000*, 76, 43-50.
- Brody, H. & Donkin, M. 2009. Family caregivers of people with dementia. *Dialogues Clin Neurosci*, 11, 217-28.
- Brody, H., Thomson, C., Thompson, C. & Fine, M. 2005. Why caregivers of people with dementia and memory loss don't use services. *Int J Geriatr Psychiatry*, 20, 537-46.
- Buduneli, N., Biyikoglu, B. & Kinane, D. F. 2024. Utility of gingival crevicular fluid components for periodontal diagnosis. *Periodontol 2000*, 95, 156-175.
- Cakmak, O., Tasdemir, Z., Aral, C. A., Dundar, S. & Koca, H. B. 2016. Gingival crevicular fluid and saliva stress hormone levels in patients with chronic and aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*, 43, 1024-1031.
- Cochran, D. L. 2008. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*, 79, 1569-76.
- Collins, R. N. & Kishita, N. 2020. Prevalence of depression and burden among informal caregivers of people with dementia: a meta-analysis. *Ageing and Society*, 40, 2355-2392.

- Cuijpers, P. 2005. Depressive disorders in caregivers of dementia patients: a systematic review. *Aging Ment Health*, 9, 325-30.
- Curtis, M. A., Diaz, P. I. & Van Dyke, T. E. 2020. The role of the microbiota in periodontal disease. *Periodontol 2000*, 83, 14-25.
- de Oliveira Ferreira, R., de Brito Silva, R., Magno, M. B., Carvalho Almeida, A., Fagundes, N. C. F., Maia, L. C. & Lima, R. R. 2019. Does periodontitis represent a risk factor for rheumatoid arthritis? A systematic review and meta-analysis. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 11, 1759720X19858514.
- Deschner, J., Haak, T., Jepsen, S., Kocher, T., Mehnert, H., Meyle, J., Schumm-Draeger, P. M. & Tschöpe, D. 2011. [Diabetes mellitus and periodontitis. Bidirectional relationship and clinical implications. A consensus document]. *Internist (Berl)*, 52, 466-77.
- Deutsche Gesellschaft für Neurologie e.V. & Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, P. u. N. e. V. 2023. S3-Leitlinie Demenzen Langfassung, Version 4.0 [Internet]. Zitiert am 22.06.2025. URL: [https://www.dgppn.de/Resources/Persistent/1f641e4edaf5c5d5a5114ee69146ba459a7da6b3/S3-Leitlinie%20Demenzen Langfassung 2023 11 28 Final%20\(003\).pdf](https://www.dgppn.de/Resources/Persistent/1f641e4edaf5c5d5a5114ee69146ba459a7da6b3/S3-Leitlinie%20Demenzen%20Langfassung%202023%2011%2028%20Final%20(003).pdf)
- Deutsche Gesellschaft für Parodontologie e.V. (DG Paro) 2019. Der Parodontitis Risikoscore - ein Selbsttest [Internet]. Zitiert am 03.05.2025. URL: <https://selbsttest.dgparo.de>.
- Deutsche Gesellschaft für Parodontologie e.V. (DG Paro) 2020. Parodontaler Screening Index (PSI) [Internet]. Zitiert am 21.01.2025. URL: <https://par-richtlinie.de/psi/>.
- Deutsche Gesellschaft für Parodontologie e.V. (DG Paro) 2025a. Entzündeter Zahnhalteapparat (Parodontitis) [Internet]. Zitiert am 22.01.2025. URL: <https://dgparo.de/gesund-im-mund/parodontitis/>
- Deutsche Gesellschaft für Parodontologie e.V. (DG Paro) 2025b. Entzündetes Zahnfleisch (Gingivitis) [Internet]. Zitiert am 22.01.2025. URL: <https://dgparo.de/gesund-im-mund/parodontitis/>
- Deutsche Gesellschaft für Parodontologie e.V. (DG Paro) 2025c. Gesunder Zahnhalteapparat [Internet]. Zitiert am 22.01.2025. URL: <https://dgparo.de/gesund-im-mund/parodontitis/> DG Paro.
- Deutsche Gesellschaft für Zahn- Mund und Kieferheilkunde e.V. (DGZMK) und Deutsche Gesellschaft für Parodontologie e.V. (DG Paro) 2020. S3-Leitlinie zur Behandlung von Parodontitis Stadium I bis III Langversion [Internet]. Zitiert am 08.01.2025. URL: <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/083-043>.
- Dominy, S. S., Lynch, C., Ermini, F., Benedyk, M., Marczyk, A., Konradi, A., Nguyen, M., Haditsch, U., Raha, D., Griffin, C., Holsinger, L. J., Arastu-Kapur, S., Kaba, S., Lee, A., Ryder, M. I., Potempa, B., Mydel, P., Hellvard, A., Adamowicz, K., Hasturk, H., Walker, G. D., Reynolds, E. C., Faull, R. L. M., Curtis, M. A., Dragunow, M. & Potempa, J. 2019. *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci Adv*, 5, eaau3333.
- Dong, A., Proctor, G. & Zaric, S. 2025. Diagnostic Accuracy of Microbiome-Derived Biomarkers in Periodontitis: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Periodontal Res*.
- Donne, J. & Dewilde, S. 2015. The Challenging World of Biofilm Physiology. *Adv Microb Physiol*, 67, 235-92.
- Duran-Pinedo, A. E., Solbiati, J. & Frias-Lopez, J. 2018. The effect of the stress hormone cortisol on the metatranscriptome of the oral microbiome. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 4, 25.

- Enomoto, A., Nambu, T., Kashiwagi, K., Okinaga, T. & Baba, S. 2020. Impact of short-term saliva storage at room temperature on the microbial composition. *Journal of Osaka Dental University*, 54, 73-81.
- EUROPE, N. G. Manual Midori Green Xtra [Internet]. Zitiert am 02.09.2025. URL <https://www.nippongenetics.eu/app/uploads/MG10-MG09-Midori-Green-Xtra-Manual.pdf>
- Fonareva, I., Amen, A. M., Ellingson, R. M. & Oken, B. S. 2012. Differences in stress-related ratings between research center and home environments in dementia caregivers using ecological momentary assessment. *Int Psychogeriatr*, 24, 90-8.
- Fonareva, I. & Oken, B. S. 2014. Physiological and functional consequences of caregiving for relatives with dementia. *Int Psychogeriatr*, 26, 725-47.
- Furuta, N., Tsuda, K., Omori, H., Yoshimori, T., Yoshimura, F. & Amano, A. 2009. Porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles enter human epithelial cells via an endocytic pathway and are sorted to lysosomal compartments. *Infect Immun*, 77, 4187-96.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. & Bairoch, A. 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker, J.M. (eds) *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press.
- Gemeinsamer Bundesausschuss 2020. Richtlinie des Gemeinsamen Bundesausschusses zur systemischen Behandlung von Parodontitis und anderer Parodontalerkrankungen (PAR-Richtlinie) [Internet]. Zitiert am 21.01.2025. URL: <https://www.g-ba.de/richtlinien/124/>.
- Gmiterek, A., Wojtowicz, H., Mackiewicz, P., Radwan-Oczko, M., Kantorowicz, M., Chomyszyn-Gajewska, M., Fraszczak, M., Bielecki, M., Olczak, M. & Olczak, T. 2013. The unique hmuY gene sequence as a specific marker of Porphyromonas gingivalis. *PLoS One*, 8, e67719.
- Gudnason, H., Dufva, M., Bang, D. D. & Wolff, A. 2007. Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic Acids Res*, 35, e127.
- Guentsch, A., Kramesberger, M., Sroka, A., Pfister, W., Potempa, J. & Eick, S. 2011. Comparison of gingival crevicular fluid sampling methods in patients with severe chronic periodontitis. *J Periodontol*, 82, 1051-60.
- Hajishengallis, G. 2014. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol*, 35, 3-11.
- Hajishengallis, G., Darveau, R. P. & Curtis, M. A. 2012. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*, 10, 717-25.
- Hajishengallis, G. & Lamont, R. J. 2014. Breaking bad: manipulation of the host response by Porphyromonas gingivalis. *Eur J Immunol*, 44, 328-38.
- Han, E. C., Choi, S. Y., Lee, Y., Park, J. W., Hong, S. H. & Lee, H. J. 2019. Extracellular RNAs in periodontopathogenic outer membrane vesicles promote TNF-alpha production in human macrophages and cross the blood-brain barrier in mice. *FASEB J*, 33, 13412-13422.
- Harrel, S. K., Nunn, M. E. & Hallmon, W. W. 2006. Is there an association between occlusion and periodontal destruction?: Yes--occlusal forces can contribute to periodontal destruction. *J Am Dent Assoc*, 137, 1380, 1382, 1384 passim.

- Hasan, A. & Palmer, R. M. 2014. A clinical guide to periodontology: pathology of periodontal disease. *Br Dent J*, 216, 457-61.
- Herzog, D., Turner, D. & Lieb, K. 2021. *Psychiatrie hoch2*, Elsevier Urban & Fischer.
- Hilgert, J. B., Hugo, F. N., Bandeira, D. R. & Bozzetti, M. C. 2006. Stress, cortisol, and periodontitis in a population aged 50 years and over. *J Dent Res*, 85, 324-8.
- Institut der Deutschen Zahnärzte (IDZ) 2025. Sechste Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS 6) [Internet]. Zitiert am 30.06.2025. URL: <https://www.idz.institute/dms6/>.
- Janson, P., Willeke, K., Zaibert, L., Budnick, A., Berghofer, A., Kittel-Schneider, S., Heuschmann, P. U., Zapf, A., Wildner, M., Stupp, C. & Keil, T. 2022. Mortality, Morbidity and Health-Related Outcomes in Informal Caregivers Compared to Non-Caregivers: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health*, 19.
- Jepsen, S., Kerschull, M. & Deschner, J. 2011. [Relationship between periodontitis and systemic diseases]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 54, 1089-96.
- Kinney, J. S., Morelli, T., Braun, T., Ramseier, C. A., Herr, A. E., Sugai, J. V., Shelburne, C. E., Rayburn, L. A., Singh, A. K. & Giannobile, W. V. 2011. Saliva/pathogen biomarker signatures and periodontal disease progression. *J Dent Res*, 90, 752-8.
- Kocher, T., Holtfreter, B., Dietrich, T., Völzke, H. & Dannewitz, B. 2018. Via Selbsttest zum Screening: Der Parodontitis-Risiko-Score [Internet]. Zitiert am 28.06.2025. URL: https://www.zm-online.de/artikel/2018/wann-mische-ich-mich-dennoch-ein/via-selbsttest-zum-screening?utm_source=chatqpt.com.
- Kreft, D. 2025. Vorzeitige Sterblichkeit [Internet]. Zitiert am 17.08.2025. URL: <https://www.datenblick.statistik.rlp.de/vorzeitige-sterblichkeit>.
- Lee, D. Y., Kim, E. & Choi, M. H. 2015. Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress. *BMB Rep*, 48, 209-16.
- Lee, J. S., Spooner, R., Chowdhury, N., Pandey, V., Wellslager, B., Atanasova, K. R., Evans, Z. & Yilmaz, O. 2020. In Situ Intraepithelial Localizations of Opportunistic Pathogens, *Porphyromonas gingivalis* and *Filifactor alocis*, in Human Gingiva. *Curr Res Microb Sci*, 1, 7-17.
- Lee, J. W., Lee, Y. K., Yuk, D. Y., Choi, D. Y., Ban, S. B., Oh, K. W. & Hong, J. T. 2008. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. *J Neuroinflammation*, 5, 37.
- Leonov, G., Varaeva, Y., Livantsova, E., Vasilyev, A., Vladimirskaia, O., Korotkova, T., Nikityuk, D. & Starodubova, A. 2024. Periodontal pathogens and obesity in the context of cardiovascular risks across age groups. *Front Oral Health*, 5, 1488833.
- Liang, Y., Dong, T., Chen, M., He, L., Wang, T., Liu, X., Chang, H., Mao, J. H., Hang, B., Snijders, A. M. & Xia, Y. 2020. Systematic Analysis of Impact of Sampling Regions and Storage Methods on Fecal Gut Microbiome and Metabolome Profiles. *mSphere*, 5.
- Lieb, K. & Frauenknecht, S. 2019. *Intensivkurs Psychiatrie und Psychotherapie*, Elsevier Urban & Fischer.
- Livingston, G., Huntley, J., Sommerlad, A., Ames, D., Ballard, C., Banerjee, S., Brayne, C., Burns, A., Cohen-Mansfield, J., Cooper, C., Costafreda, S. G., Dias, A., Fox, N., Gitlin, L. N., Howard, R., Kales, H. C., Kivimaki, M., Larson, E. B., Ogunniyi, A., Orgeta, V., Ritchie, K., Rockwood, K., Sampson, E. L., Samus, Q., Schneider, L. S., Selbaek, G., Teri, L. & Mukadam, N. 2020. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *Lancet*, 396, 413-446.

- Loe, H., Anerud, A., Boysen, H. & Morrison, E. 1986. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol*, 13, 431-45.
- Ludecke, D., Mnich, E. & Kofahl, C. 2012. The impact of sociodemographic factors on the utilisation of support services for family caregivers of elderly dependents - results from the German sample of the EUROFAMCARE study. *Psychosoc Med*, 9, Doc06.
- Matto, J., Saarela, M., Alaluusua, S., Oja, V., Jousimies-Somer, H. & Asikainen, S. 1998. Detection of *Porphyromonas gingivalis* from saliva by PCR by using a simple sample-processing method. *J Clin Microbiol*, 36, 157-60.
- McEwen, B. S. 1998. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci*, 840, 33-44.
- Müller-Esterl, W. 2018. Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler, Springer Spektrum.
- Nara, P. L., Sindelar, D., Penn, M. S., Potempa, J. & Griffin, W. S. T. 2021. *Porphyromonas gingivalis* Outer Membrane Vesicles as the Major Driver of and Explanation for Neuropathogenesis, the Cholinergic Hypothesis, Iron Dyshomeostasis, and Salivary Lactoferrin in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 82, 1417-1450.
- Nater, U. M., Rohleder, N., Schlotz, W., Ehlert, U. & Kirschbaum, C. 2007. Determinants of the diurnal course of salivary alpha-amylase. *Psychoneuroendocrinology*, 32, 392-401.
- Nickles, K., Scharf, S., Rollke, L., Dannewitz, B. & Eickholz, P. 2017. Comparison of Two Different Sampling Methods for Subgingival Plaque: Subgingival Paper Points or Mouthrinse Sample? *J Periodontol*, 88, 399-406.
- Norton, M. C., Smith, K. R., Ostbye, T., Tschanz, J. T., Corcoran, C., Schwartz, S., Piercy, K. W., Rabins, P. V., Steffens, D. C., Skoog, I., Breitner, J. C., Welsh-Bohmer, K. A. & Cache County, I. 2010. Greater risk of dementia when spouse has dementia? The Cache County study. *J Am Geriatr Soc*, 58, 895-900.
- Okamoto, M., Sugimoto, A., Leung, K. P., Nakayama, K., Kamaguchi, A. & Maeda, N. 2004. Inhibitory effect of green tea catechins on cysteine proteinases in *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*, 19, 118-20.
- Orlandi, M., Suvan, J., Petrie, A., Donos, N., Masi, S., Hingorani, A., Deanfield, J. & D'Aiuto, F. 2014. Association between periodontal disease and its treatment, flow-mediated dilatation and carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis*, 236, 39-46.
- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., Flemmig, T. F., Garcia, R., Giannobile, W. V., Graziani, F., Greenwell, H., Herrera, D., Kao, R. T., Kerschull, M., Kinane, D. F., Kirkwood, K. L., Kocher, T., Kornman, K. S., Kumar, P. S., Loos, B. G., Machtei, E., Meng, H., Mombelli, A., Needleman, I., Offenbacher, S., Seymour, G. J., Teles, R. & Tonetti, M. S. 2018. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*, 89 Suppl 1, S173-S182.
- Park, S. N., Park, J. Y. & Kook, J. K. 2011. Development of *Porphyromonas gingivalis*-specific quantitative real-time PCR primers based on the nucleotide sequence of rpoB. *J Microbiol*, 49, 315-9.
- Peachey, M. H., Kubow, K. E., Blyer, K. B. & Halterman, J. A. 2024. Use of saliva-based qPCR diagnostics for the accurate, rapid, and inexpensive detection of strep throat. *Diagnosis (Berl)*, 11, 178-185.

- Pinquart, M. & Sorensen, S. 2003. Differences between caregivers and noncaregivers in psychological health and physical health: a meta-analysis. *Psychol Aging*, 18, 250-67.
- Polgarova, K., Behuliak, M. & Celec, P. 2010. Effect of saliva processing on bacterial DNA extraction. *New Microbiol*, 33, 373-9.
- Preshaw, P. M. & Taylor, J. J. 2011. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol*, 38 Suppl 11, 60-84.
- Sadrameli, M., Bathini, P. & Alberi, L. 2020. Linking mechanisms of periodontitis to Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurol*, 33, 230-238.
- Sakanaka, A., Takeuchi, H., Kuboniwa, M. & Amano, A. 2016. Dual lifestyle of *Porphyromonas gingivalis* in biofilm and gingival cells. *Microb Pathog*, 94, 42-7.
- Saygun, I., Nizam, N., Keskiner, I., Bal, V., Kubar, A., Acikel, C., Serdar, M. & Slots, J. 2011. Salivary infectious agents and periodontal disease status. *J Periodontal Res*, 46, 235-9.
- Schlueter, N., Ganss, C., Potschke, S., Klimek, J. & Hannig, C. 2012. Enzyme activities in the oral fluids of patients suffering from bulimia: a controlled clinical trial. *Caries Res*, 46, 130-9.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L. & Johne, R. 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol*, 113, 1014-26.
- Seeher, K., Low, L. F., Reppermund, S. & Brodaty, H. 2013. Predictors and outcomes for caregivers of people with mild cognitive impairment: a systematic literature review. *Alzheimers Dement*, 9, 346-55.
- Sheiham, A. & Nicolau, B. 2005. Evaluation of social and psychological factors in periodontal disease. *Periodontol 2000*, 39, 118-31.
- Shen, X., Li, M., Wang, Y. L., Chen, Y. L., Lin, Y., Zhao, Z. M. & Que, T. Z. 2017. [Comparison of MPure-12 Automatic Nucleic Acid Purification and Chelex-100 Method]. *Fa Yi Xue Za Zhi*, 33, 168-170.
- Sidstedt, M., Radstrom, P. & Hedman, J. 2020. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS-mechanisms and solutions. *Anal Bioanal Chem*, 412, 2009-2023.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent, R. L., Jr. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, 25, 134-44.
- Stalder, T., Oster, H., Abelson, J. L., Huthsteiner, K., Klucken, T. & Clow, A. 2025. The Cortisol Awakening Response: Regulation and Functional Significance. *Endocr Rev*, 46, 43-59.
- Staufenbiel, S. M., Penninx, B. W., Spijker, A. T., Elzinga, B. M. & van Rossum, E. F. 2013. Hair cortisol, stress exposure, and mental health in humans: a systematic review. *Psychoneuroendocrinology*, 38, 1220-35.
- Stocker, H., Mollers, T., Perna, L. & Brenner, H. 2018. The genetic risk of Alzheimer's disease beyond APOE epsilon4: systematic review of Alzheimer's genetic risk scores. *Transl Psychiatry*, 8, 166.
- Stoy, S., McMillan, A., Ericsson, A. C. & Brooks, A. E. 2023. The effect of physical and psychological stress on the oral microbiome. *Front Psychol*, 14, 1166168.
- Suvan, J., D'Aiuto, F., Moles, D. R., Petrie, A. & Donos, N. 2011. Association between overweight/obesity and periodontitis in adults. A systematic review. *Obes Rev*, 12, e381-404.

- Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M. W. & Kubista, M. 2015. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol Detect Quantif*, 3, 9-16.
- Taylor, S. C., Nadeau, K., Abbasi, M., Lachance, C., Nguyen, M. & Fenrich, J. 2019. The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends Biotechnol*, 37, 761-774.
- Tomar, S. L. & Asma, S. 2000. Smoking-attributable periodontitis in the United States: findings from NHANES III. National Health and Nutrition Examination Survey. *J Periodontol*, 71, 743-51.
- Tomas, I., Regueira-Iglesias, A., Lopez, M., Arias-Bujanda, N., Novoa, L., Balsa-Castro, C. & Tomas, M. 2017. Quantification by qPCR of Pathobionts in Chronic Periodontitis: Development of Predictive Models of Disease Severity at Site-Specific Level. *Front Microbiol*, 8, 1443.
- Vieira, A. R. & Albandar, J. M. 2014. Role of genetic factors in the pathogenesis of aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*, 65, 92-106.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A. & Higuchi, R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10, 506-13.
- Walter, J., Tannock, G. W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., Loach, D. M., Munro, K. & Alatossava, T. 2000. Detection and identification of gastrointestinal Lactobacillus species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl Environ Microbiol*, 66, 297-303.
- Wang, J., Geng, X., Sun, J., Zhang, S., Yu, W., Zhang, X. & Liu, H. 2019. The risk of periodontitis for peripheral vascular disease: a systematic review. *Rev Cardiovasc Med*, 20, 81-89.
- Wassall, R. R. & Preshaw, P. M. 2016. Clinical and technical considerations in the analysis of gingival crevicular fluid. *Periodontol 2000*, 70, 65-79.
- Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, W. 2019. Internationale Klassifikation der Krankheiten (ICD-11), 11. Revision [Internet]. Zitiert am 23.07.2025. URL: <https://icd.who.int/en/>
- Wuttke, A., Palm, S. & Fellgiebel, A. 2023. Biopsychologische Mechanismen der Stressbelastung und der Resilienzfaktoren im Alltag von pflegenden Angehörigen von Menschen mit Demenz, Projektbericht Zentrum für psychische Gesundheit im Alter (ZpGA) [Internet]. Zitiert am: 10.12.2024. URL: <https://www.zqp.de/projekt/ema-dem-studie/>
- Wuttke-Linnemann, A., Baake, R. & Fellgiebel, A. 2019. Dyadic Wind of Change: New Approaches to Improve Biopsychological Stress Regulation in Patients with Dementia and Their Spousal Caregivers. *J Alzheimers Dis*, 68, 1325-1337.
- Wuttke-Linnemann, A., Henrici, C., Skoluda, N., Nater, U. M., Endres, K. & Fellgiebel, A. 2022a. Psychobiological Monitoring of a Home-Based Dyadic Intervention for People Living with Dementia and Their Caregivers: Added Value to Evaluate Treatment Success and Understand Underlying Mechanisms. *J Alzheimers Dis*, 87, 1725-1739.
- Wuttke-Linnemann, A., Palm, S., Geschke, K., Skoluda, N., Bischoff, T., Nater, U. M., Endres, K. & Fellgiebel, A. 2022b. Psychobiological Evaluation of Day Clinic Treatment for People Living With Dementia - Feasibility and Pilot Analyses. *Front Aging Neurosci*, 14, 866437.

- Yang, S., Zhao, L. S., Cai, C., Shi, Q., Wen, N. & Xu, J. 2018. Association between periodontitis and peripheral artery disease: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cardiovasc Disord*, 18, 141.
- Zaric, S., Strachan, A., Kurushima, Y., Dong, A., McIlwaine, C., Harrington, Z., Nibali, L., Foey, A. & Ide, M. 2022. Evaluating clinical utility of subgingival and salivary endotoxin activity levels as periodontal biomarkers. *Front Oral Health*, 3, 1029806.
- Zenobia, C. & Hajishengallis, G. 2015. Porphyromonas gingivalis virulence factors involved in subversion of leukocytes and microbial dysbiosis. *Virulence*, 6, 236-43.
- Zhang, Y., Shen, Y., Liufu, N., Liu, L., Li, W., Shi, Z., Zheng, H., Mei, X., Chen, C. Y., Jiang, Z., Abtahi, S., Dong, Y., Liang, F., Shi, Y., Cheng, L., Yang, G., Kang, J. X., Wilkinson, J. & Xie, Z. 2023. Transmission of Alzheimer's Disease-Associated Microbiota Dysbiosis and its Impact on Cognitive Function: Evidence from Mouse Models and Human Patients. *Res Sq*.

8. Anhang

8.1 Befragung zur Zahngesundheit bei pflegenden Angehörigen von Menschen mit Demenz

1. Wie alt sind Sie? _____ Jahre
2. Welches Geschlecht haben Sie?
 - Männlich
 - Weiblich
3. Nach wie vielen Jahren haben Sie die Schule abgeschlossen?
 - > 10 Jahre
 - ≤ 10 Jahre

4. Wie groß sind Sie? _____ cm
5. Was ist Ihr Körpergewicht? _____ kg

Hat sich Ihr Körpergewicht seit Beginn der Studie (EMA-DEM) stark verändert?

Wenn Ja, inwiefern?

- Ja: +/- _____ kg
 - Nein
6. Rauchen Sie zurzeit?
 - Ja
 - Nein

Wenn Ja, wie viele Zigaretten rauchen Sie am Tag? _____ Stück/Tag
 7. Haben Sie in der Vergangenheit geraucht?
 - Ja
 - Nein

Wenn Ja, seit wann haben Sie mit dem Rauchen aufgehört?
Vor _____ Jahren/Monaten

Wenn Ja, wie viele Zigaretten haben Sie am Tag geraucht?
_____ Stück/Tag

8. Tragen Sie einen herausnehmbaren Zahnersatz? Wenn Ja, welchen genau bzw. Welche Zähne werden ersetzt?

- Ja: _____
- Nein

9. Tragen Sie einen festsitzenden Zahnersatz (z.B. Kronen, Brücken, Implantate, Implantat-Brücken...)? Wenn ja, welchen genau?

- Ja: _____
- Nein

10. Blutet Ihr Zahnfleisch nach dem Zähneputzen?

- Häufig (mindestens 5x pro Woche)
- Manchmal (etwa 3 x pro Woche)
- Nein

11. Sind Ihre Zähne oder Implantate beweglich?

- Ja
- Nein

12. Haben Sie schon Zähne verloren?

- Ja
- Nein

Wenn Ja, wie viele und wodurch haben Sie sie verloren (z.B. Karies, Entzündung, Unfall/Trauma, im Rahmen einer kieferorthopädischen Behandlung)?

13. Bemerkten Sie einen Rückgang Ihres Zahnfleisches*? Wenn Ja, seit wann beobachten Sie diesen?

- Ja, seit _____ Tagen/Wochen/Monaten
- Nein

*Anzeichen für Zahnfleischrückgang: - Sichtbare Zahnhäse und/oder Zahnwurzel

- Empfindlich auf Kaltes oder Heißes

- Zähne erscheinen unnatürlich lang

14. Wie häufig putzen Sie Ihre Zähne pro Tag?

_____ Mal pro Tag

15. Nutzen Sie zusätzliche Mundhygiene Artikel wie z.B. Zahnseide, Mundspülung o.ä.? Wenn Ja, bitte benennen Sie diese.

- Ja: _____
- Nein

16. Wurden Sie von Ihrer Zahnärztin/ Ihrem Zahnarzt mit Parodontitis diagnostiziert?

- Ja
- Nein
- Unbekannt

17. Hat oder hatte jemand aus Ihrer Familie schon Parodontitis?

- Ja
- Nein
- Unbekannt

18. Haben Sie sonstige Anmerkungen (Beschwerden, Schmerzen, Auffälligkeiten) bezüglich Ihrer Zahn- und Mundgesundheit?

19. Haben Sie Diabetes?

- Ja: Typ I
- Ja: Typ II
- Nein

Wenn Ja, bitte geben Sie Ihren HbA1c an: _____ %

- HbA1c unbekannt

20. Haben Sie kardiovaskuläre Erkrankungen? Wenn Ja, welche?
(z.B. Artherosklerose, periarterielle Verschlusskrankheit (pAVK), Zustand nach Herzinfarkt o.ä.)

- Ja: _____
- Nein

21. Haben Sie Rheumatoide Arthritis?

- Ja
- Nein

8.2 Bepunktung des Fragebogens zur Zahngesundheit

1. Alter

20-29	0
30- 39	2
40-49	4
50-59	6
60-69	8
≥70	10

2. Geschlecht

M	1
W	0

3. Schulabschluss nach

> 10 Jahren	0
≤ 10 Jahren	1

4. + 5. BMI

< 18,5	0
18,5-24,9	0
25-29,9	0
30-34,9	1
35-39,9	2
> 40	2

5. s. BMI

6. Rauchen (zurzeit)

Ja	2
Nein	0

7. Rauchen in Vergangenheit

Ja	1
Nein	0

8. –

9. –

10. Zahnfleischbluten

Häufig	2
Manchmal	1
Nein	0

11. Bewegliche Zähne/Implantate

Ja	3
Nein	0

12. Zahnverlust

Ja (Karies, Entzündung)	2
Rest	0

13. Zahnfleischrückgang

Ja	2
Nein	0

14. Häufigkeit Zähneputzen

2-3 Mal/Tag	0
1 Mal/Tag	1
0 Mal/Tag	2

15. Nutzung von zusätzlichen Mundhygieneartikeln

Ja	0
Nein	1

16. Parodontitis Diagnose

Ja	→Parodontitis vorhanden, Gruppe 5
Nein	0
Unbekannt	0

17. Parodontitis in der Familie

Ja	1
Nein	0
Unbekannt	0

18. –

19. Diabetes

Ja (HbA1c < 7,0 %)	1
Ja (HbA1c ≥ 7,0 %)	2
Ja (HbA1c unbekannt)	1
Nein	0

20. Kardiovaskuläre Erkrankungen

Ja	1
Nein	0

21. Rheumatoide Arthritis

Ja	1
Nein	0

9. Danksagung

Ich möchte all jenen danken, die mich während der Entstehung dieser Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin, Prof. Dr. rer. nat. Kristina Endres, für ihre wertvolle fachliche Anleitung, ihre Geduld und ihre stetige Ermutigung. Ihre konstruktiven Anregungen und ihr Vertrauen in meine Arbeit haben wesentlich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen. Auch will ich meiner Familie von Herzen danken. Ihr Rückhalt, ihre Liebe und ihr Verständnis haben mir in den entscheidenden Momenten Kraft gegeben. Ohne ihre emotionale Unterstützung wäre dieser Weg nicht möglich gewesen.

Diese Arbeit ist nicht nur das Ergebnis wissenschaftlicher Forschung, sondern auch Ausdruck der Menschen, die mich auf meinem Weg bestärkt haben.

10. Tabellarischer Lebenslauf

Persönliches

Geboren	25.06.2002 in Al-Malikiya, Syrien
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Berufliche Laufbahn

05/2025 – heute	Assistenz Zahnärztin, Zahnklinik Dr. Speicher 65552, Limburg an der Lahn
-----------------	---

Akademische Laufbahn

Seit 07/2023	Promotion, Titel: Stress und orale Dysbiose: <i>Porphyromonas gingivalis</i> im Speichel von pflegenden Angehörigen von Menschen mit Demenz, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität, 55122 Mainz
--------------	--

10/2019 – 11/2024	Studium der Zahnmedizin, Johannes Gutenberg-Universität, 55122 Mainz
-------------------	---

06/2019	Allgemeine Hochschulreife Theodor-Fliegener-Schule, 65191 Wiesbaden
---------	--