



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Einfluss von süß-schmeckenden Verbindungen auf die
humane intestinale Genexpression“

verfasst von / submitted by

Sarah Stadlmayr BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Master of Science (MSc)

Wien, 2020 / Vienna, 2020

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 066 863

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium
Biologische Chemie

Betreut von / Supervisor:

Dipl.-troch. Dr. habil. Barbara Lieder

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen Jänner 2020 und September 2020 am Christian Doppler Labor für Geschmacksforschung, eingegliedert im Institut für Physiologische Chemie der Universität Wien, unter der Leitung von Frau Dipl.-troch. Dr. habil. Barbara Lieder.

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Masterarbeit unterstützt und motiviert haben. Zuerst gebührt mein Dank Frau Dipl.-troch. Dr. habil. Barbara Lieder für die Möglichkeit dieses faszinierende und spannende Thema im Rahmen meiner Masterarbeit am Christian Doppler Labor für Geschmacksforschung zu bearbeiten, sowie für Ihre allzeitige Betreuung, Ihre Unterstützung und Ihre hilfreichen Anregungen bei der Erstellung dieser Arbeit. Bei allen Fragen und Problemen hatte Sie ein offenes Ohr für mich und half mir stets eine Lösung zu finden.

Besonderer Dank gilt Univ.- Prof. Mag. Dr. Veronika Somoza für die Möglichkeit die Versuche im Rahmen meiner Masterarbeit am Institut für Physiologische Chemie durchzuführen.

Allen jetzigen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe am Institut für Physiologische Chemie danke ich für das gute Arbeitsklima, die Hilfsbereitschaft sowie für deren fachliche und moralische Unterstützung, die maßgeblich dazu beigetragen haben, dass meine Masterarbeit in dieser Form vorliegt. Besonderer Dank gebührt dabei Frau Verena Preinfalk, MSc. für die gute Zusammenarbeit in der Zellkultur.

Mein größter Dank jedoch gilt meinem Partner und meiner Familie, die mich immer und in jeder Hinsicht unterstützt haben und immer wieder bewiesen haben, dass auf sie jederzeit und ohne Einschränkung Verlass ist. Ohne ihre Hilfe und vor allem den motivierenden Worten wäre ich wohl nicht so weit gekommen.

Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstaatlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Formulierungen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht und die herangezogenen Quellen sind im Literaturverzeichnis aufgeführt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

Wien, den 30. November 2020

Sarah Stadlmayr

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	III
Eidesstaatliche Erklärung	V
Inhaltsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XI
Formelzeichen- und Abkürzungsverzeichnis.....	XIII
1. Einleitung.....	1
1. Wissenschaftliche Grundlagen und Kenntnisstand.....	4
2.1 Süßstoffe und Zucker.....	4
2.1.1 Sucrose.....	4
2.1.2 Rebaudiosid M.....	5
2.1.3 Sucralose.....	7
2.1.4 Neohesperidin-Dihydrochalkon.....	9
2.2 Der Süßrezeptor TAS1R2/TAS1R3	11
2.3 TAS1R-unabhängige Süßwahrnehmung	16
2.3.1 K _{ATP} -abhängige Süßwahrnehmung.....	16
2.3.2 Glukosetransporter-abhängige Süßwahrnehmung.....	18
2.3.2.1 Natrium-Glukose-Cotransporter	18
2.3.2.2 Glukosetransporter.....	19
2.4 Zellmodelle der intestinalen Barriere	21
2.4.1 CaCo-2 Zellmodell	22
2.4.2 HT29-MTX-E12 Zellmodell.....	24
2. Zielsetzung und Hypothesen.....	27
3. Material und Methoden.....	30
4.1 Material.....	30
4.1.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte	30
4.1.2 Chemikalien	34
4.1.3 Zusammensetzung der Lösungen.....	37
4.2 Methoden	39
4.2.1 Zellkultur CaCo-2	39
4.2.1.1 Auftauen der CaCo-2 Zellen.....	39
4.2.1.2 Passagieren der CaCo-2 Zellen.....	40
4.2.1.3 Ausstreuen der CaCo-2 Zellen.....	40
4.2.1.4 Mykoplasmentest der CaCo-2 Zellen	42

4.2.2 Zellkultur HT29-MTX-E12.....	43
4.2.2.1 Auftauen der HT29-MTX-E12 Zellen	43
4.2.2.2 Passagieren der HT29-MTX-E12 Zellen	43
4.2.2.3 Ausstreuen der HT29-MTX-E12 Zellen	43
4.2.2.4 Mykoplasmentest der HT29-MTX-E12 Zellen.....	43
4.2.3 Cokultur aus HT29-MTX-E12 und CaCo-2 Zellen	44
4.2.3.1 Ausstreuen der Cokultur aus HT29-MTX-E12 und CaCo-2 Zellen	44
4.2.4 Transepitheliale elektrische Widerstandsmessung.....	44
4.2.5 Permeabilitätstest zur Überprüfung der Integrität des Zellmonolayers	45
4.2.6 Alcianblau Färbung von Mucus-produzierenden Becherzellen	47
4.2.7 MTT-Test zur Bestimmung der Zellvitalität	48
4.2.8 Isolierung der RNA	49
4.2.9 Bestimmung der RNA Konzentration	50
4.2.10 cDNA Synthese	51
4.2.11 Primer Validierung.....	53
4.2.12 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion	56
4.2.13 Statistische Auswertung	58
4.2.13.1 Transepitheliale elektrische Widerstandsmessung.....	58
4.2.13.2 Permeabilitätstest	59
4.2.13.3 MTT-Test	59
4.2.13.4 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion	59
4. Ergebnisse	60
5.1 Transepitheliale elektrische Widerstandsmessung.....	60
5.2 Permeabilitätstest zur Überprüfung der Integrität des Zellmonolayers	62
5.3 Alcianblau Färbung von Mucus-produzierenden Becherzellen	65
5.4 MTT-Test	67
5.4.1 MTT-Test der CaCo-2 Zellen	67
5.4.2 MTT-Test der Cokultur aus HT29-MTX-E12 und CaCo-2 Zellen.....	68
5.5 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion	70
5.5.1 Veränderung der Genexpression während der Differenzierung in der CaCo-2 Monokultur und der Cokultur aus HT29-MTX-E12 Zellen und CaCo-2 Zellen....	70
5.5.2 qRT-PCR der CaCo-2 Zellen	72
5.5.2.1 qRT-PCR nach dem Treatment mit Testsubstanzen in äquimolaren Konzentrationen	72
5.5.2.2 qRT-PCR nach dem Treatment mit Testsubstanzen in äquisüßen Konzentrationen	74
5.5.3 qRT-PCR der Cokultur aus HT29-MTX-E12 und CaCo-2 Zellen	75

5.5.3.1 qRT-PCR nach dem Treatment mit Testsubstanzen in äquimolaren Konzentrationen.....	75
5.5.3.2 qRT-PCR nach dem Treatment mit Testsubstanzen in äquisüßen Konzentrationen.....	77
5.5.4 Vergleich der qRT-PCR Ergebnisse der CaCo-2 Monokultur und der Cokultur aus HT29-MTX-E12 Zellen und CaCo-2 Zellen.....	78
6. Diskussion.....	81
6.1 Validierung des Cokultur Modells.....	82
6.2 Einfluss der Testsubstanzen auf die Genexpressionslevel.....	85
6.2.1 Effekt der süß-schmeckenden Verbindungen auf die TAS1R-abhängige Süßwahrnehmung in <i>in vitro</i> Darmmodellen.....	85
6.2.2 Effekt der süß-schmeckenden Verbindungen auf die TAS1R-unabhängige Süßwahrnehmung in <i>in vitro</i> Darmmodellen.....	86
7. Schlussbetrachtung und Ausblick.....	91
8. Zusammenfassung	95
9. Summary.....	96
10. Referenzen	97
11. Anhang.....	i

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Struktur von Sucrose.	4
Abbildung 2: Chemische Struktur von Rebaudiosid M.	6
Abbildung 3: Chemische Struktur von Sucralose.	8
Abbildung 4: Chemische Struktur von Neohesperidin-Dihydrochalkon.	9
Abbildung 5: Schematischer Aufbau des Süßrezeptors TAS1R2/TAS1R3 (Fernstrom u. a., 2012).	12
Abbildung 6: Intrazelluläre Signalweiterleitung nach der Aktivierung des Süßrezeptors TAS1R2/TAS1R3 (Bojahr, 2015).	14
Abbildung 7: Differenzierte CaCo-2 Enterozyten 21 Tage nach dem Ausstreuen.	23
Abbildung 8: Differenzierte schleimsekretierende HT29-MTX Becherzellen.	25
Abbildung 9: Umwandlung von MTT zu Formazan mit Hilfe von NADH.	48
Abbildung 10: Entwicklung der Messwerte des transepithelialen elektrischen Widerstands.	60
Abbildung 11: Verlauf der parazellulären Permeabilität %LY _{basal} der CaCo-2:HT29-MTX-E12 Zellkultur.	62
Abbildung 12: Veränderung des Permeabilitätskoeffizienten P _{app} in [10 ⁻⁶ cm/sec] der CaCo-2:HT29-MTX-E12 Zellkultur.	63
Abbildung 13: Mit Alcianblau gefärbte Zellmonolayer zur Visualisierung von Mucinen.	65
Abbildung 14: Zellvitalität [%] der CaCo-2 Zellen.	67
Abbildung 15: Zellvitalität [%] der Cokultur Zellen.	68
Abbildung 16: Entwicklung der Expression der Marker-Gene <i>SLC5A1</i> , <i>SLC2A2</i> , <i>TAS1R3</i> und <i>KCNJ8</i>	71
Abbildung 17: x-fache Änderung der relativen Expression der CaCo-2 Monokultur nach einer Langzeitbehandlung für 7, 14 und 21 Tagen mit K, K _{DMSO} und einer äquimolaren Konzentration der Testsubstanzen.	73
Abbildung 18: x-fache Änderung der relativen Expression der CaCo-2 Monokultur nach einer Langzeitbehandlung für 7, 14 und 21 Tagen mit K, K _{DMSO} und einer äquisüßen Konzentration der Testsubstanzen.	74
Abbildung 19: x-fache Änderung der relativen Expression der Cokultur nach einer Langzeitbehandlung für 7, 14 und 21 Tagen mit Medium, DMSO und einer äquimolaren Konzentration der Testsubstanzen.	76
Abbildung 20: x-fache Änderung der relativen Expression der Cokultur nach einer Langzeitbehandlung für 7, 14 und 21 Tagen mit Medium, DMSO und einer äquisüßen Konzentration der Testsubstanzen.	77
Abbildung 21: Heatmap der Marker-Gene.	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	30
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.....	32
Tabelle 3: Verwendete Programme	33
Tabelle 4: Allgemeine Chemikalien und molekularbiologisches Material	34
Tabelle 5: Süßstoffe und Zucker.....	36
Tabelle 6: Kits.....	36
Tabelle 7: 10 × PBS	37
Tabelle 8: MTT Reagenz	37
Tabelle 9: HEPES gepufferte HBSS-Lösung	37
Tabelle 10: 50 × TAE	37
Tabelle 11: DAPI/SR-101 Lösung.....	38
Tabelle 12: Süßstoffe und Zucker in den verwendeten Konzentrationen.....	41
Tabelle 13: Reaktionsgemisch für die cDNA Synthese.....	52
Tabelle 14: Reaktionsgemisch für die Kontrollreaktion ohne RT	52
Tabelle 15: Thermal Cycler LunaScript™ Programm	52
Tabelle 16: TAS1R3, KCNJ8 und ABCC8 Primer	53
Tabelle 17: StepOnePlus™ Programm	54
Tabelle 18: Thermal Cycler AmpliTaq Gold™ Programm.....	55
Tabelle 19: Primer mit zugehörigen Konzentrationen.....	58
Tabelle 20: Rohdaten der TEER-Werte der CaCo-2	i
Tabelle 21: Rohdaten der TEER-Werte der Cokultur	i
Tabelle 22: Rohdaten der TEER-Werte der HT29-MTX-E12	ii
Tabelle 23: Rohdaten des Permeabilitätskoeffizienten P_{app} in [10^{-6} cm/sec] nach der 7-tägigen Inkubation	iii
Tabelle 24: Rohdaten des Permeabilitätskoeffizienten P_{app} in [10^{-6} cm/sec] nach der 14-tägigen Inkubation	iv
Tabelle 25: Rohdaten des Permeabilitätskoeffizienten P_{app} in [10^{-6} cm/sec] nach der 21-tägigen Inkubation	v
Tabelle 26: Rohdaten der parazellulären Permeabilität $\%LY_{basal}$ nach der 7-tägigen Inkubation	vi
Tabelle 27: Rohdaten der parazellulären Permeabilität $\%LY_{basal}$ nach der 14-tägigen Inkubation	vii
Tabelle 28: Rohdaten der parazellulären Permeabilität $\%LY_{basal}$ nach der 21-tägigen Inkubation	viii
Tabelle 29: Rohdaten des CaCo-2 MTT	ix
Tabelle 30: Rohdaten des Cokultur MTT	x

Tabelle 31: Rohdaten der SLC5A1 qRT-PCR der CaCo-2 Zellen	xi
Tabelle 32: Rohdaten der SLC5A1 qRT-PCR der CaCo-2 Zellen	xiii
Tabelle 33: Rohdaten der SLC5A1 qRT-PCR der Cokultur.....	xv
Tabelle 34: Rohdaten der SLC5A1 qRT-PCR der Cokultur.....	xvii
Tabelle 35: Rohdaten der SLC2A2 qRT-PCR der CaCo-2 Zellen	xix
Tabelle 36: Rohdaten der SLC2A2 qRT-PCR der CaCo-2 Zellen	xxi
Tabelle 37: Rohdaten der SLC2A2 qRT-PCR der Cokultur.....	xxiii
Tabelle 38: Rohdaten der SLC2A2 qRT-PCR der Cokultur.....	xxv
Tabelle 39: Rohdaten der TAS1R3 qRT-PCR der CaCo-2 Zellen	xxvii
Tabelle 40: Rohdaten der TAS1R3 qRT-PCR der CaCo-2 Zellen	xxix
Tabelle 41: Rohdaten der TAS1R3 qRT-PCR der Cokultur.....	xxxi
Tabelle 42: Rohdaten der TAS1R3 qRT-PCR der Cokultur.....	xxxiii
Tabelle 43: Rohdaten der KCNJ8 qRT-PCR der CaCo-2 Zellen.....	xxxv
Tabelle 44: Rohdaten der KCNJ8 qRT-PCR der CaCo-2 Zellen.....	xxxvii
Tabelle 45: Rohdaten der KCNJ8 qRT-PCR der Cokultur	xxxix
Tabelle 46: Rohdaten der KCNJ8 qRT-PCR der Cokultur	xli

Formelzeichen- und Abkürzungsverzeichnis

Symbol	Einheit	Bedeutung
A	mM	Absorption
AC		Adenylatcyclase
AMP		Adenosinmonophosphat
ATP		Adenosintriphosphat
bp		Basenpaar
C ₀		Anfangskonzentration
CaCo-2		Cancer Coli-2
CALHM1		Calciumhomöostasemodulator 1
cAMP		Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA		Komplementäre DNA
CRD		Cystein-reiche Linkerregion
DAG		Diacylglycerol
DAPI		4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM		Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO		Dimethylsulfoxid
DNA		Desoxyribonukleinsäure
dsDNA		Doppelsträngige DNA
dQ/dt	(mM/[mL*s])	Flussrate
EDTA		Ethylendiamintetraessigsäure
EFSA		Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
ER		Endoplasmatisches Retikulum
F	cm ²	Fläche
FBS		Fötales Kälberserum

FDA	U.S. Food & Drug Administration
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	Genomische DNA
GI	Gastrointestinaltrakt
GIP	Glukoseabhängiges insulinotropes Peptid
GLP	Glukagon-ähnliches Peptid
GLUT	Glukosetransporter
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRZ	Geschmacksrezeptorzellen
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
IP ₃	1,4,5-Inositoltriphosphat
K _{ATP}	ATP-gesteuerter K ⁺ -Stoffwechselsensor, ATP-sensitiver Kaliumkanal
KCNJ8	Gen für Kir 6.1
Kir	Einwärts gleichrichtender K ⁺ -Kanal
LY	Lucifer Yellow
LY ₀	LY Konzentration in der apikalen Kammer
LY _t	LY Konzentration in der basolateralen Kammer
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

M-Zellen		Microfold-Zellen
NADH		Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH		Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NHDC		Neohesperidin-Dihydrochalkon
P_{app}	cm/s	Permeabilitätskoeffizient
PBS		Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR		Polymerase-Kettenreaktion
PDE		Phosphodiesterase
Pen./Strep.		Penicillin/Streptomycin
PIP ₂		Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA		Proteinkinase A
PLC β 2		Phospholipase C β 2
qRT-PCR		Quantitative real-time PCR
Reb M		Rebaudiosid M
REM		Rasterelektronenmikroskop
RNA		Ribonukleinsäure
RNase		Ribonuklease
RT		Reverse Transkriptase
SCF		Wissenschaftliche Lebensmittelausschuss der Europäischen Union
SGLT1		Natrium-Glukose-Cotransporter 1
SLC2A2		Gen für GLU2
SLC5A1		Gen für SGLT1
SR-101		Sulforhodamine-101
Stabw		Standardabweichung

SUR		Sulfonylharnstoff-Rezeptor
TAE-Puffer		Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAS1R/ TAS2R		Typ 1- / Typ 2-Geschmacksrezeptorfamilie
TAS1R1/TAS1R2/TAS1R3		Humane Typ 1-Geschmacksrezeptorfamilie Mitglied 1/2/3
Tas1r2/ Tas1r3		Murine Typ 1-Geschmacksrezeptorfamilie Mitglied 2/3
TEER	Ωcm^2	Transepithelialer elektrischer Widerstand
TEM		Transmissionselektronenmikroskopie
TMD		7-Transmembrandomäne
Tris		Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRPM5		Transienter Rezeptorpotentialkationenkanal Subfamilie M Mitglied 5
VFT		Extrazelluläre Venusfliegenfallen-Domäne
WHO		Weltgesundheitsorganisation
%LY _{basal}		Parazelluläre Permeabilität

1. Einleitung

Seit 1975 haben sich, laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO), Übergewicht und Adipositas weltweit mehr als verdoppelt (World Health Organization, 2018). Neben einer Abnahme der körperlichen Aktivität ist auch der zunehmende Konsum von Lebensmitteln mit hohem Energiegehalt, welcher hauptsächlich auf Zucker und Fett zurückzuführen ist, ein wichtiger Faktor für den dramatischen Anstieg von Adipositas, der bereits epidemische Ausmaße erreicht hat (Glendinning u. a., 2010). Der übermäßige Konsum natürlicher Süßungsmittel, insbesondere von Sucrose, wurde nicht nur als Hauptursache für Fettleibigkeit und Gewichtszunahme identifiziert, sondern auch für Diabetes mellitus Typ II und Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Burke und Small, 2015; Sánchez-Tapia u. a., 2019). Eine Strategie zur Verringerung der, durch Sucrose bedingten, Gesundheitsprobleme ist die Verwendung von künstlichen, kalorienfreien Süßstoffen. Ziel dabei ist es, den Kaloriengehalt zu reduzieren, ohne die Nahrungsmittelaufnahme zu senken und gleichzeitig den süßen Geschmack, der eine natürliche Präferenz beim Menschen darstellt, aufrechtzuerhalten (Beidler, 1982; Fernstrom, 2015). Bislang konzentriert sich ein Großteil der Humanstudien auf Monosaccharide, vor allem auf Fruktose (Tappy, 2018), jedoch gibt es nur wenige, die sich auf natürliche, komplexe Süßstoffe wie Steviol-Glykoside oder künstliche Süßstoffe fokussieren.

Bei einer anhaltenden Aufnahme von Süßungsmitteln werden Geschmacksrezeptoren vom Typ 1 Mitglied 2 (TAS1R2) und Mitglied 3 (TAS1R3) aktiviert, welche Untereinheiten des Süßrezeptors darstellen (Sánchez-Tapia u. a., 2019). Ursprünglich wurden Rezeptoren für den süßen Geschmack in den Geschmacksknospen im Mundraum entdeckt, jedoch gibt es zwischenzeitlich Studien die zeigen, dass Süßrezeptoren im ganzen Körper einschließlich Fettgewebe (Simon u. a., 2013), Atmungssystem (Lee und Cohen, 2014), zentralem Nervensystem (Kohno, 2017), Spermien (Meyer u. a., 2012) und Gastrointestinaltrakt (GI) (Jang u. a., 2007), exprimiert werden. Diese Süßrezeptoren haben eine wichtige Funktion für die Nährstoffwahrnehmung, die Erkennung von Änderungen im Energiespeicher und für das Auslösen von Stoffwechsel- und Verhaltensreaktionen, um das Energiegleichgewicht aufrechtzuerhalten. Interne und externe Faktoren können diese Regulationswege beeinflussen und folglich zu Funktionsstörungen der Wege führen, was für die Pathogenese von Krankheiten wie Adipositas und Diabetes mellitus Typ II mitverantwortlich ist. Da Tas1r3-Knock-out Mäuse die Geschmackspräferenz gegenüber künstlichen Süßstoffen vollständig verlieren, jene für Sucrose jedoch beibehalten, wurde

konkludiert, dass zusätzlich zur primären Süßwahrnehmung über den Süßrezeptor weitere TAS1R3-unabhängige Detektionsmechanismen in Geschmackszellen vorhanden sind (Damak u. a. 2003; 2006). Mittels dieser TAS1R-unabhängigen Mechanismen können natürliche Süßungsmittel durch Glukosetransporter (GLUT), Natrium-Glukose-Cotransporter 1 (SGLT1) und Adenosintriphosphat (ATP)-gesteuerte K^+ -Stoffwechselsensoren (K_{ATP}) wahrgenommen werden (Yee u. a., 2011; Merigo u. a., 2011; Sukumaran u. a., 2016).

Das menschliche Darmepithel weist eine besonders hohe Dichte von Geschmacksrezeptorproteinen, einschließlich TAS1R2 und TAS1R3, auf, wobei der Süßrezeptor hauptsächlich auf enteroendokrinen Zellen exprimiert wird (Bezençon, le Coutre, und Damak, 2007). Die beiden Hauptfunktionen des heterodimeren Rezeptorsystems für den süßen Geschmack im humanen GI sind die Glukosehomöostase sowie die Sekretion von GI Peptiden (Lee und Owyang, 2017). Im Vergleich zum natürlichen humanen Darmepithel weist das bisher für *in vitro* Studien etablierte CaCo-2 Modell der intestinalen Barriere mehrere Einschränkungen auf. Dabei ist besonders hervorzuheben, dass sich das humane Darmepithel neben Enterozyten noch aus weiteren Zelltypen zusammensetzt und die CaCo-2 Zelllinie zudem keine Mucusschicht besitzt. Oftmals wurde das CaCo-2 Modell kritisiert, da einerseits die parazelluläre Permeabilität durch die große Anzahl von Tight Junctions im Monolayer negativ beeinflusst wird und andererseits Unterschiede in den Genexpressionsprofilen zwischen dem CaCo-2 Modell und dem humanen Darmepithel detektiert werden konnten (Artursson, Palm, und Luthman, 2001; Bourguine u. a., 2012).

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Verbesserung dieses *in vitro* Modells der intestinalen Barriere, indem eine Cokultur von Enterozyten mit Mucus-produzierenden Becherzellen durch unterschiedliche Assays charakterisiert wurde. In einer weiteren Aufgabenstellung wurden die unterschiedlichen süß-schmeckenden Verbindungen Sucrose, Rebaudiosid M, Sucralose und Neohesperidin-Dihydrochalkon gewählt, um deren Einfluss auf die Genexpressionslevel unterschiedlicher Marker der Süßwahrnehmung in dem etablierten CaCo-2 Zellmodell und dem erprobten Cokultur Modell zu untersuchen. Zudem sollte ein möglicher Einfluss der Süßintensität auf die Genexpression untersucht werden, wofür zwei unterschiedliche Konzentrationen der süß-schmeckenden Verbindungen für die dreiwöchige Fütterung gewählt wurden. Die Arbeit fokussiert sich auf

Genexpressionsveränderungen der Süßrezeptoruntereinheit TAS1R3, des passiven Glukosetransporters Typ 2 (GLUT2), des aktiven Natrium-Glukose-Cotransporter 1 (SGLT1) und einer Untereinheit des ATP-gesteuerten K^+ -Stoffwechselsensors (Kir 6.1).

1. Wissenschaftliche Grundlagen und Kenntnisstand

2.1 Süßstoffe und Zucker

Die nachfolgend beschriebenen, süß-schmeckenden nicht kalorischen Testsubstanzen Rebaudiosid M, Sucralose und Neohesperidin-Dihydrochalkon wurden aufgrund deren unterschiedlichen sensorischen Eigenschaften (Karl u.a., 2020) gewählt und mit der kalorischen Referenzverbindung Sucrose verglichen.

2.1.1 Sucrose

Sucrose ist ein natürliches, nicht reduzierendes Disaccharid, welches als Dimer aus je einem Molekül α -D-Glukose und β -D-Fruktose besteht, die über ihre anomeren Kohlenstoffe über eine α , β -1,2-glykosidische Bindung miteinander verbunden sind (National Institutes of Health, 2004). Sucrose ist das beliebteste Süßungsmittel, welches in Lebensmittel und Getränken oft Anwendung findet und kommerziell aus Zuckerrohr, Zuckerpalm oder Zuckerrüben gewonnen wird (Queneau u. a., 2007). Seit dem neunzehnten Jahrhundert erhöhte sich der Sucrosekonsum wesentlich und trägt in der Europäischen Union bei Erwachsenen rund 7-17% zu der Gesamtenergiezufuhr bei (International Diabetes Federation, 2016), während der Konsum von Zucker in den Vereinigten Staaten sogar bis zu 21,4% der Gesamtenergieaufnahme ausmacht (Welsh u. a., 2011). Trotz der Zunahme an nicht kalorischen Süßungsmitteln bleibt Sucrose weltweit der führende süß-schmeckende Zusatz in der Ernährung (Rippe und Angelopoulos, 2013).

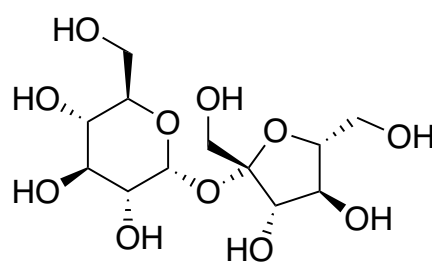


Abbildung 1: Chemische Struktur von Sucrose.

Nach alimentärer Zufuhr wird die, in Abbildung 1 skizzierte, Sucrose im menschlichen Dünndarm durch die α -Glykosidase Sucrase-Isomaltase in die Monosaccharide Glukose und Fruktose hydrolytisch gespalten, bevor diese freigesetzt werden (Caballero, Finglas, und Trugo, 2003; Sánchez-Lozada u. a., 2010). Im Bürstensaum des oberen GI werden im Anschluss 10 - 25% der Fruktose in Glukose umgewandelt. Die beiden Monosaccharide werden absorbiert und über die Pfortader in die Leber und anschließend ins Gewebe

transportiert. Nach diesem Schritt unterscheidet sich der Metabolismus von Fruktose und Glukose, wobei gezeigt werden konnte, dass Glukose die Fruktoseaufnahme in dosisabhängiger Weise stimuliert (Rumessen und Gudmand-Høyer, 1986; Caballero, Finglas, und Trugo, 2003). Nach der Einnahme von Glukose wird eine kleine Menge (~ 15%) der absorbierten Glukose durch den Glukosetransporter Typ 2 (GLUT2) von der Leber extrahiert. Im Anschluss kann diese in der Leber als Glukosepolymer Glykogen gespeichert werden, bei der Glykolyse zur Energieerzeugung verwendet werden oder Acetateinheiten für die Fettsäuresynthese liefern. Im Gegensatz dazu wird nahezu die gesamte Menge an Fructose, welche die Leber erreicht, in einem Insulin-unabhängigen Prozess in Triosephosphate umgewandelt, welche sekundär für die *de novo* Synthese von Triglyceriden, Cholesterol, Glukose, Glykogen, Laktat oder Lipiden herangezogen werden können (Caballero, Finglas, und Trugo, 2003).

Kürzlich veröffentlichten Pfeiffer und Keyhani-Nejad eine Studie, bei welcher sie zu dem Ergebnis gekommen sind, dass Sucrose aufgrund der spezifischen Struktur und unabhängig von deren Energiegehalt zu einer erhöhten Sekretion des gastrointestinalen glukoseabhängigen insulintropen Peptids (GIP) führt. Diese erhöhte GIP-Sekretion, vor allem durch Glukose, kann den Appetit anregen, das Körpergewicht und das Risiko für eine Insulinresistenz steigern. Hingegen fördert Fruktose, als zweite Komponente von Sucrose, in hohen Konzentrationen die *de novo* Lipogenese, was zu erhöhten Leberfettsäuren führt. Diese wiederum können als ektopisches Leberfett abgelagert werden und die Prävalenz, der mit der Fettablagerung einhergehenden Entwicklung, einer nichtalkoholischen Fettlebererkrankung erhöhen (Tappy u. a., 2010; Gibson u. a., 2013; Pfeiffer und Keyhani-Nejad, 2018). Somit hat Sucrose das Potenzial, sowohl auf die Insulinsensitivität als auch auf den Lipidstoffwechsel einzuwirken, wobei eine Konnektivität zwischen den beiden bestehen kann und dadurch eine Vielzahl von humanen Stoffwechselerkrankungen zu beeinflussen (Gibson u. a., 2013).

2.1.2 Rebaudiosid M

Bei Rebaudiosid M (Reb M) handelt es sich um ein intensiv süß-schmeckendes Steviol-Glykosid, welches sich in den Blättern von Stevia Pflanzen, vor allem in dem Süßkraut *Stevia rebaudiana*, eine Pflanzenart der Familie der Korbblütler (*Asteraceae*), befindet. Extrakte von den Blättern der südamerikanischen Pflanze *Stevia rebaudiana* Bertoni wurden bereits von indigenen Völkern Lateinamerikas vor vielen Jahrhunderten zum Süßen von Getränken und Arzneimitteln eingesetzt und fanden seit den 1970er Jahren auch in

Japan vermehrt Anwendung. Reb M weist ein *ent*-Kauran-Diterpen-Grundgerüst auf und kommt in der Natur zusammen mit mindestens zehn weiteren süß-schmeckenden Steviol-Glykosiden, einschließlich Steviolbioside, Rebaudioside A bis F und Rubusoside, vor. Im Gegensatz zu anderen Steviol-Glykosiden weist Reb M ein verbessertes Süß-Geschmackprofil, eine verringerte Adstringenz und einen sehr marginalen und kurz anhaltenden Lakritz- beziehungsweise Bittergeschmack auf (Lewis u. a., 1992; Prakash, Markosyan, und Bunders, 2014; Prakash u. a., 2014; 2017). In der Studie von Prakash, Markosyan, und Bunders (2014) konnte mittels des Beidler Modells geschätzt werden, dass Reb M rund 200- bis 350-mal so süß wie Sucrose ist. Der kalorienfreie Stevia-Süßstoff eignet sich nicht nur als Einzelsüßstoff für den Ersatz von Zucker in Getränken und Lebensmitteln, sondern er kann auch gut in Kombination mit anderen kalorienfreien oder kohlenhydrathaltigen Süßungsmitteln eingesetzt werden (Prakash, Markosyan, und Bunders, 2014). Die chemische Struktur von Reb M ist in Abbildung 2 abgebildet.

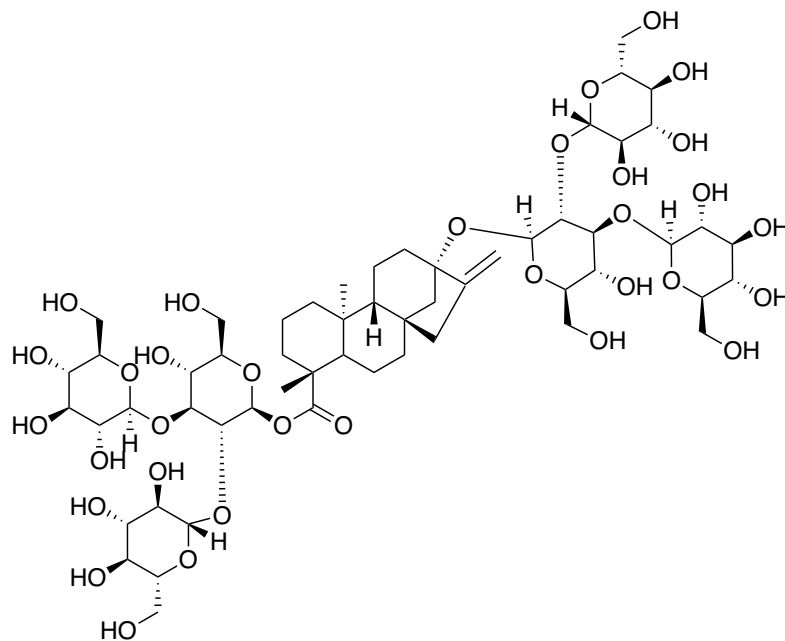


Abbildung 2: Chemische Struktur von Rebaudiosid M.

Ihrer Überprüfung aller verfügbarer Daten zu Grunde liegend hat die „Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit“ (EFSA, 2010) und der „Gemeinsame FAO/ WHO Expertenausschuss für Lebensmittelzusatzstoffe“ (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Food and Agriculture Organization of the United Nations, und World Health Organization, 2010) eine zulässige tägliche Aufnahme von 4 mg/kg Körpergewicht pro Tag, ausgedrückt als Stevioläquivalente, für Steviol-Glykoside festgelegt.

Diese tägliche Aufnahme gilt für alle Steviol-Glykoside, da davon ausgegangen wird, dass alle Substanzen dieser Familie zu dem identen Metaboliten Steviol durch die, mit der Darmflora assoziierten, β -Glukosidase anaerob metabolisiert werden (Purkayastha u. a., 2014). *In vitro* und *ex vivo* Studien haben gezeigt, dass Steviol-Glykoside nicht durch Verdauungsenzyme des oberen GI hydrolysiert werden und daher nicht über den oberen GI absorbiert werden (Hutapea u. a. 1997; Koyama u. a. 2003; Geuns u. a. 2003; 2007). Steviol-Glykoside werden demzufolge erst verdaut, wenn sie den Dickdarm erreichen, wo sie anschließend von Mitgliedern der *Bacteroidaceae*-Familie mikrobiell hydrolysiert werden, was zu der Freisetzung des Aglycons Steviol führt. Danach wird beim Übergang in den enterohepatischen Kreislauf ein Teil des Steviols im Dickdarm absorbiert und anschließend in der Leber glucuronidiert, während das restliche Steviol mit dem Fäzes ausgeschieden wird (Renwick und Tarka, 2008). Mittels der von Purkayastha u. a. (2014) erzielten Ergebnisse, des vergleichenden *in vitro* Metabolismus durch humane Kothomogenate, konnte gezeigt werden, dass Steviol-Glykoside innerhalb von 24 Stunden vollständig zu Steviol metabolisiert werden, wobei der Großteil bereits in den ersten acht Stunden verstoffwechselt wird. Laut des Artikels von Chen u. a. (2018) weist Steviol eine intensive inhibitorische Aktivität auf sechs menschliche gastrointestinale Krebszellen auf. Angesichts der metabolischen Eigenschaften von Steviol und seiner Zytotoxizität kann es als potentiell Chemotherapeutikum für die Krebsbehandlung weiter untersucht werden (Chen u. a., 2018). Zudem werden Steviol-Glykoside bereits zur Behandlung von verschiedensten Krankheiten wie Diabetes, Karies, Fettleibigkeit und Mageninfektionen empfohlen (Yadav und Guleria, 2012).

2.1.3 Sucralose

Das Disaccharid Sucralose wird aus Sucrose hergestellt, wobei drei Hydroxylgruppen im Zuckermolekül selektiv gegen drei Chloratome ausgetauscht werden. Die dadurch erzielte Inversion der Glukosekonfiguration am Kohlenstoff vier Atom führt zur Umwandlung der Glukose zu Galaktose (Frank u. a., 2008; Grotz und Munro, 2009). Der künstliche Süßstoff ist ungefähr 400- bis 800-mal so süß wie Sucrose, wodurch eine kleine Menge Sucralose eine hohe Sucrosekonzentration ersetzen kann. Seit dem Jahr 1999 ist Sucralose von der „U.S. Food & Drug Administration“ (FDA) für die Verwendung als Allzwecksüßstoff für alle Lebensmittel- und Getränke Kategorien genehmigt worden (FDA, 1999). Zudem ist Sucralose in der Europäischen Union seit 2004 als Lebensmittelzusatzstoff E955 zugelassen (Roth und Lück, 2012). In Abbildung 3 ist die chemische Struktur der Sucralose illustriert.

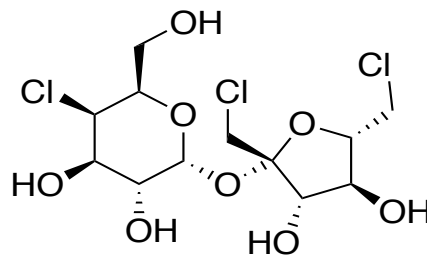


Abbildung 3: Chemische Struktur von Sucralose.

Trotz der vernachlässigbaren Menge an Kalorien des oftmals beigemengten Volumenverstärkers Maltodextrin gilt Sucralose als kalorienfreies Süßungsmittel, da es im Gegensatz zu Sucrose weder verdaut noch zur Energiegewinnung verstoffwechselt wird (FDA, 1999). Dadurch werden keine Kalorien aus Sucralose gewonnen und der Blutzuckerspiegel wird nicht beeinflusst. Diese Eigenschaft führt dazu, dass Sucralose weltweit bei der Herstellung von kalorienarmen Lebensmitteln und Getränken stark verbreitet ist und den US-amerikanischen Markt von künstlichen Süßstoffen und Zuckerersatzstoffen dominiert (Magnuson, Roberts, und Nestmann, 2017; Bornemann u. a., 2018). Der Wissenschaftliche Lebensmittelausschuss der Europäischen Union (SCF), heute EFSA, hat im Jahr 2000 eine zulässige tägliche Sucralose Aufnahme von 15 mg/kg Körpergewicht pro Tag festgelegt (SCF, 2000). Mittels Sensorikstudien konnte gezeigt werden, dass Sucralose im Vergleich zu anderen nicht kalorischen Süßstoffen keinen bitteren Nachgeschmack aufweist (Wiet und Beyts, 1992; Kuhn u. a., 2004). Zudem wurde durch Metabolismusstudien gezeigt, dass nach dem Verzehr ein Großteil der oral aufgenommenen Sucralose (~ 85%) nicht aus dem GI absorbiert, sondern unmetabolisiert mit dem Fäzes exkretiert wird. Weiters wird die Mehrheit der vom GI aufgenommenen Sucralose unverändert im Urin oder als Glucuronid-Konjugat ohne Dechlorierung oder Katabolismus ausgeschieden, wodurch es keine Energiequelle darstellt (Roberts u. a., 2000). Basierend auf Studien (Lord und Newberne, 1990; Sasaki u.a., 2002; Soffritti u.a., 2016) Lange Zeit stand Sucralose unter dem Verdacht krebserregend zu sein, jedoch haben Berry u. a. (2016) Studien zum kanzerogenen Potential von Sucralose zusammengefasst und sind zu der Conclusio gekommen, dass dieser Süßstoff selbst keine krebserzeugende Wirkung hat, auch wenn das Belastungsniveau mehrere Größenordnungen über dem Bereich der erwarteten täglichen Einnahme von Sucralose liegt.

2.1.4 Neohesperidin-Dihydrochalkon

Das semisynthetische Süßungsmittel Neohesperidin-Dihydrochalkon (NHDC) entsteht durch die katalytische Hydrierung von dem, aus Zitrusfrüchten wie Bitterorangen extrahierten, Flavanon-Glykosid Neohesperidin, durch die Behandlung mit Kaliumhydroxid oder anderen starken Basen (Han u. a., 2018). Diese Flavonoide sind in der Natur stark verbreitet und befinden sich hauptsächlich in den Schalen von Früchten, wo sie zur Farb- und Geschmacksgebung beitragen (DuBois u. a., 1977). Die chemische Struktur von NHDC ist in Abbildung 4 dargestellt. Der Isovanillyl-Süßstoff ist rund 1500-mal so süß wie Sucrose, hat geschmacksmodifizierende Eigenschaften, die Fähigkeit in Kombination mit anderen Süßungsmitteln die Süßequalität und das Süßprofil zu verbessern. Das Süßungsmittel besitzt außerdem Synergie-Effekte, wobei die Intensität der Süße von unterschiedlichen Faktoren, einschließlich des pH-Wertes des Produktes abhängt. Die geschmacksverstärkende Wirkung konnte in unterschiedlichen Produkten wahrgenommen werden, insbesondere bei Fruchtaromen (Glória, 2003). Beim Menschen hat NHDC durch die Stimulation des Süßrezeptors TAS1R2/TAS1R3 einen intensiv süßen Geschmack. In diesem Zusammenhang konnte demonstriert werden, dass die Rezeptorbindung von NHDC speziesabhängig ist und Ratten keine Reaktion auf die süß-schmeckende Verbindung zeigen (Atta-ur-Rahman, 2005; Winnig u. a., 2007). NHDC findet als kalorienarmes, künstliches Süßungsmittel, sowie als Bitterkeitsblocker und Geschmacksverstärker eine breite Anwendung in verschiedenen Getränken, Lebensmitteln und Arzneimitteln, jedoch ist dessen Verwendung als Einzelsüßstoff durch unerwünschte sensorische Eigenschaften, wie eine verzögertes Einsetzen der Süße und einem anhaltenden Menthol- beziehungsweise Lakritz-ähnlichen Nachgeschmack bei höheren NHDC-Konzentrationen, eingeschränkt (DuBois u. a., 1977; DuBois, Crosby, und Stephenson, 1981; Shi u. a., 2015).

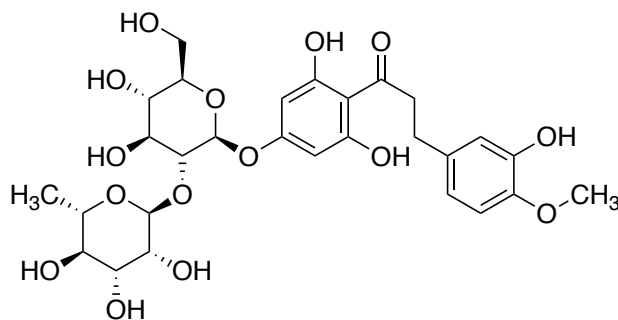


Abbildung 4: Chemische Struktur von Neohesperidin-Dihydrochalkon.

Aus dem menschlichen Dünndarm wird, wie auch bei anderen diätischen Flavonoiden, nur eine begrenzte Menge von NHDC unverändert resorbiert. Der Abbauweg von NHDC beginnt mit der schrittweisen Deglykosylierung mittels menschlicher Darmbakterien durch die Spaltung der glykosidischen Seitenkette und der einhergehenden Bildung des Aglykons Hesperetin-Dihydrochalkon. Das Aglykon wird mittels bakterieller Glykosidasen weiter zu 3-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-Propionsäure und zu dem A-Ring Metaboliten Phloroglucin gespalten. Während die 3-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-Propionsäure weiter zu 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-Propionsäure demethyliert wird, wird Phloroglucin schnell zu Butyrate und/oder Acetat durch Bakterien degradiert. Es kommt zur Exkretion über Urin oder Galle, wobei zuvor Modifikationen wie Hydroxylierung, Dehydroxylierung und Dealkylierung möglich sind. Das im Darm verbleibende, nicht hydrolysierte, NHDC wird primär unverändert über den Fäzes ausgeschieden (O'Brien Nabors und Miller, 1991; Glória, 2003; Braune, Engst, und Blaut, 2005). NHDC ist daher nicht gänzlich kalorienfrei und der Energiegehalt beträgt 2 kcal/g, wobei dieser kalorische Gehalt für die Ernährung aufgrund der geringen Einsatzmenge von weniger als 100 mg/kg vernachlässigt werden kann (Glória, 2003). Studien haben gezeigt, dass Zitrusflavonoide unterschiedliche pharmakologische Wirkungen haben können, inklusive einer entzündungshemmenden, krebshemmenden und kardiovaskulären Aktivität (Benavente-García und Castillo, 2008). Lo Furno u. a. (2016) haben demonstriert, dass die Zitruspflanze Bergamotte die Adipogenese verringern und die Lipolyse erhöhen kann. Zudem haben Han u. a. (2018) in einer Studie starke Auswirkungen von NHDC Analoga auf die adipogene Differenzierung von, aus menschlichem Fettgewebe gewonnenen, Stammzellen festgestellt, was als mögliches therapeutisches Mittel zur Überwindung von Fettleibigkeit dienen könnte.

2.2 Der Süßrezeptor TAS1R2/TAS1R3

Grundsätzlich hat der Mensch die Fähigkeit zwischen fünf Grundgeschmacksarten zu unterscheiden, nämlich süß, salzig, umami, bitter und sauer. Nagetier- und Humanstudien deuten darauf hin, dass fettig als sechste Geschmacksmodalität definiert werden könnte, da der linguale Lipidsensor CD36 als Geschmackslipidsensor fungiert (Khan und Besnard, 2009; Martin u. a., 2011). Darüber hinaus gibt es noch weitere Geschmacksqualitäten, die diskutiert werden, einschließlich dem metallischen Geschmack und dem Kokumi-Geschmack (Maruyama u. a., 2012; Di Pizio u. a., 2019). Die Verarbeitung des Geschmacks beginnt zunächst auf der Ebene der Geschmacksrezeptorzellen (GRZ), welche sich zu kelchförmigen Geschmacksknospen gruppieren und überwiegend auf der dorsalen Oberfläche der Zunge und am weichen Gaumen lokalisiert sind (Fernstrom u. a., 2012). Zudem konnten Geschmacksrezeptoren auch in extraoralen Bereichen einschließlich Fettgewebe (Simon u. a., 2013), Atmungssystem (Lee und Cohen, 2014), zentralem Nervensystem (Kohno, 2017), Spermen (Meyer u. a., 2012) und Gastrointestinaltrakt (GI) (Jang u. a., 2007) gefunden werden. Die Aktivierung dieser Rezeptorzellen mittels bestimmter Geschmacksreize setzt Neurotransmitter aus den basalen Enden von Geschmackszellen auf benachbarte afferente Hirnnervenfasern frei und bewirkt die Übertragung von Geschmacksinformationen zu bestimmten Bereichen des Gehirns, die an der Geschmackswahrnehmung beteiligt sind. Gemeinsam mit anderen sensorischen Informationen, welche olfaktorischer, thermischer und struktureller Natur sein können, werden die Geschmacksinformationen verarbeitet und interpretiert, um die passende Geschmackswahrnehmung hervorzurufen (Fernstrom, 2012; Fernstrom u. a., 2015; Lee und Owyang, 2017).

Es wurden vier morphologische Subtypen von GRZ identifiziert, wobei einzelne Geschmackszellen nur einen von mehreren Geschmacksrezeptortypen exprimieren. Gliaartige Zellen vom Typ I übertragen den salzigen Geschmack. Der süße, bittere und umami Geschmack kann durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), welche von Typ II Zellen exprimiert werden, detektiert werden. Während Typ III Zellen Ionenkanäle exprimieren, um saure Reize zu erkennen, können Typ IV Basalzellen als Stamm- oder Vorläufergeschmackszellen angesehen werden (Yarmolinsky, Zuker, und Ryba, 2009; Janssen und Depoortere, 2013). Die von den GRZ exprimierten Rezeptoren sind für die Erkennung und Selektivität des Geschmacksstimulus verantwortlich, wobei dahingehend

zwei Klassen von Geschmacks-GPCRs identifiziert wurden, die Typ 1-Geschmackrezeptorfamilie (TAS1R) und die Typ 2-Geschmacksrezeptorfamilie (TAS2R). Subtypen der TAS1R-Familie heterodimerisieren zur Detektion von umami und süßen Geschmacksstoffen, wobei der Umamirezeptor aus den TAS1R1- und TAS1R3- Untereinheiten und der Süßrezeptor aus den TAS1R2- und TAS1R3- Untereinheiten zusammengesetzt ist. Im Nachfolgenden werden humane Gen- und Proteinnamen durch Großbuchstaben abgekürzt, während die kleingeschriebene Form auf murine Gen- und Proteinnamen verweist.

Viele chemisch unterschiedliche Verbindungen können an den Süßrezeptor TAS1R2/TAS1R3 binden und diesen aktivieren, darunter Zucker (Glukose, Maltose, Fruktose), künstliche Süßstoffe (unter anderem Aspartam, Cyclamat, Sucralose), Pflanzenmetabolite (Stevioside), D-Aminosäuren (D-Tryptophan, D-Phenylalanin, D-Serin) und süße Proteine (Brazzein, Monellin, Thaumatin). Nicht alle diese Liganden binden an die gleichen Domänen des Süßrezeptors, wobei bereits mehrere Bindungsstellen für Süßungsmittel und Inhibitoren des süßen Geschmacks gefunden werden konnten. Die beiden TAS1R-Rezeptoruntereinheiten sind strukturell ähnlich und bestehen aus einer N-terminalen, extrazellulären Venusfliegenfallen-Domäne (VFT), einer 7-Transmembrandomäne (TMD), einer Cystein-reichen Linkerregion (CRD), die die beiden Domänen verbindet, und aus einem C-Terminus der in das Zellinnere ragt (Behrens und Meyerhof, 2011; Fernstrom u. a., 2012; Lee und Owyang, 2017). In Abbildung 5 ist der schematische Aufbau des Süßrezeptors mit den unterschiedlichen Interaktionsstellen skizziert.

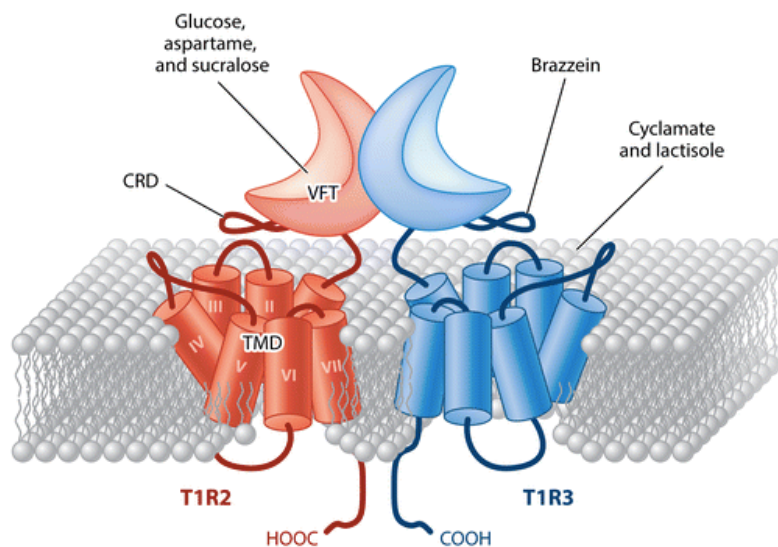


Abbildung 5: Schematischer Aufbau des Süßrezeptors TAS1R2/TAS1R3 (Fernstrom u. a., 2012).

Die Aktivierung des Süßrezeptors durch eine Ligandenbindungen führt zur Konformationsänderung des Süßrezeptors, wodurch die Dissoziation des heterotrimeren G-Proteins ausgelöst wird. Dabei dissoziiert die $G\alpha$ -Untereinheit namens α -Gustducin von der dimeren $G\beta\gamma_{13}$ -Untereinheit (Pérez u. a., 2002; Kinnamon, 2012). Die abgespaltenen $\beta\gamma_{13}$ -Untereinheiten des G-Proteins aktivieren die Phospholipase C $\beta 2$ (PLC $\beta 2$), um das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) in die beiden Second Messenger 1,4,5-Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) zu spalten (Rössler u. a., 1998). Während DAG die Proteinkinase C aktiviert, bindet IP₃ an den Typ III IP₃ Rezeptor, der in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert ist, wodurch eine Freisetzung von Ca^{2+} aus dem intrazellulären Ca^{2+} -Speicher hervorgerufen wird (Clapp u. a., 2001). Ein Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} aktiviert Ca^{2+} -abhängige Proteinkinasen, sowie den transienten Rezeptorpotentialkationenkanal Subfamilie M Mitglied 5 (TRPM5) und andere Rezeptoren (Pérez u. a., 2002; Zhang u. a., 2007; Taruno u. a., 2013). Durch die Öffnung des für monovalente Kationen selektiven Kanals TRPM5 in der Plasmamembran können monovalente Ionen, unter anderem Na^+ , in die Zelle einströmen. Zusätzlich phosphoryliert die aktivierte Proteinkinase C den K^+ -Kanal, wodurch dieser geschlossen und ein K^+ -Ionenaustritt verhindert wird. Dies führt zu einer Membrandepolarisation, der dadurch bedingten Erzeugung von Aktionspotentialen und zur Freisetzung von ATP, vermutlich durch den Pannexin-1 Hemikanal (Huang u. a., 2007).

Im Gegensatz zum $G\beta\gamma$ -abhängigen Signalweg ist jener Pathway, welcher durch die $G\alpha$ -Untereinheit aktiviert wird, weniger gut untersucht. Diesbezüglich konnte nur gezeigt werden, dass eine verkürzte Form des α -Gustducins *in vitro* die Phosphodiesterase (PDE) anregen kann, welche im Anschluss cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) zu Adenosinmonophosphat (AMP) umwandelt (Moriyama u. a., 2002). Durch die Abnahme des intrazellulären cAMPs wird nachfolgend die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) inhibiert, was wiederum den Ca^{2+} Anstieg in der Zelle blockiert und dadurch eine chronische Desensibilisierung gegen süße Geschmacksreize verhindert, wodurch die GRZ responsiv bleiben (Yan u. a., 2001). Dennoch konnte in einer Studie von Striem u. a. (1989) ein Anstieg der cAMP-Konzentration nach einer Stimulation von Rattenzungen mit unterschiedlichen Süßungsmitteln beobachtet werden. Vermutlich kann dies über die Aktivierung der mit α -Gustducin und PLC $\beta 2$ coexprimierten Adenylatcyclase (AC),

welche ATP zu cAMP umwandelt, erfolgen (Abaffy, Trubey, und Chaudhari, 2003; Trubey u. a., 2006). Trubey u. a. (2006) konnten in ihrer Studie einen Ca^{2+} -abhängigen wie auch Ca^{2+} -unabhängigen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration feststellen. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung der AC und die einhergehende Erhöhung der cAMP-Konzentration sowohl direkt durch das G-Protein als auch sekundär durch den Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration reguliert werden kann (Bojahr, 2015). In Abbildung 6 ist die vereinfachte intrazelluläre Signalkaskade nach der Aktivierung des Süßrezeptors TAS1R2/TAS1R3 zu sehen.

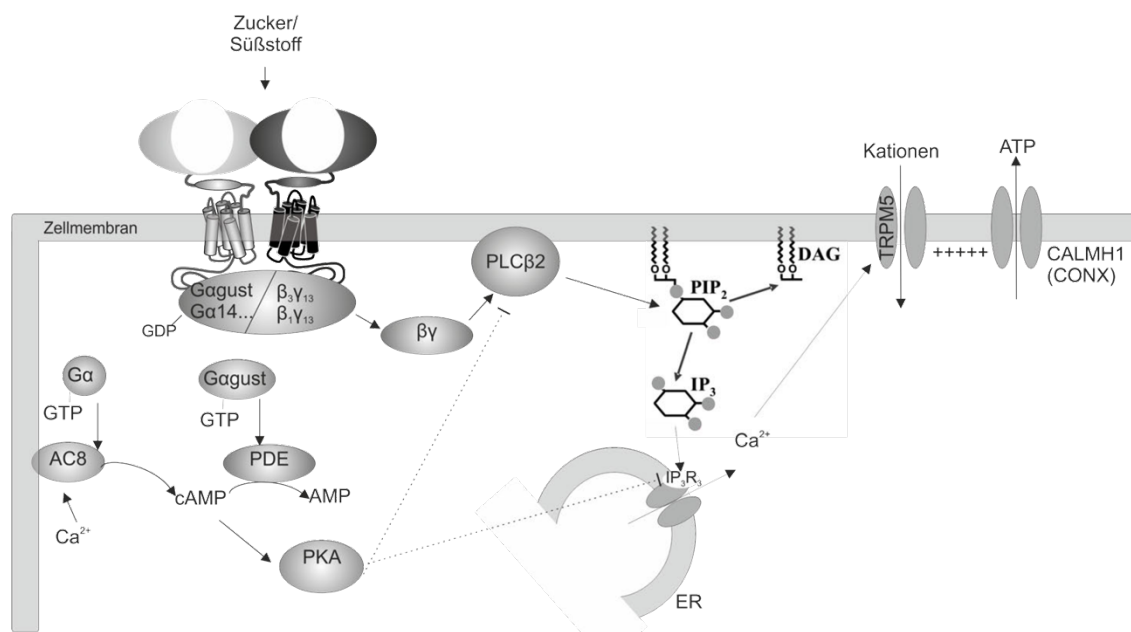


Abbildung 6: Intrazelluläre Signalweiterleitung nach der Aktivierung des Süßrezeptors TAS1R2/TAS1R3 (Bojahr, 2015).

Das von den Typ II GRZ freigesetzte extrazelluläre ATP kann einerseits die ATP-Rezeptoren P2X2/P2X3 von afferenten purinergen Nervenfasern stimulieren, welche dadurch mit dem Zentralnervensystem kommunizieren und in Folge zur Geschmackswahrnehmung führen, und andererseits GRZ vom Typ III durch die Bindung von ATP an den ATP-Rezeptor P2Y aktivieren, was die Sekretion der Neurotransmitter Serotonin und Noradrenalin induziert (Finger u. a., 2005; Huang u. a., 2007; Dvoryanchikov, Tomchik, und Chaudhari, 2007; Behrens und Meyerhof, 2011). Für die Initiierung des purinergen ATP-Effluxes aus den Typ II GRZ wurde von Taruno u. a. (2013) gezeigt, dass der Calciumhomöostasemodulator 1 (CALHM1), der einen spannungsgesteuerten Ionenkanal darstellt, unverzichtbar ist. Dieser ATP-Transport findet als Reaktion auf die TRPM5

vermittelte Depolarisation mit anschließendem Aktionspotential, welches CALHM1 aktiviert, um nicht-vesikuläres ATP freizusetzen, statt (Taruno u. a., 2013; Tordoff u. a., 2015). Shirazi-Beechey u. a. (2014) haben in ihrem Artikel zusammengefasst, dass Mitglieder von TAS1R sowie das G-Protein α -Gustducin in K- und L- neuroendokrinen Zellen im Darmgewebe verschiedenster Spezies coexprimiert werden und dort für die Süßwahrnehmung zuständig sind. Der G-Protein-gekoppelte TAS1R2/TAS1R3 Süßrezeptor in der apikalen Enterozytenmembran kann durch natürliche und künstliche Süßungsmittel aktiviert werden und die in Abbildung 6 gezeigten intrazellulären Signalwege anregen. Diese können zur Sekretion von Darmhormonen, wie dem Glukagon-ähnlichen Peptid 1 und 2 (GLP1 und GLP2) und GIP führen, welche wiederum die Nahrungsaufnahme, Insulin Sekretion, das Darmwachstum und die Glukoseaufnahme beeinflussen können (Shirazi-Beechey u. a., 2014). Da Tas1r3- und TRPM5-Knock-out Mäuse die Geschmackspräferenz gegenüber dem künstlichen Süßungsmittel Sucralose vollständig verlieren, die Reaktion auf Sucrose jedoch beibehalten, wird davon ausgegangen, dass zusätzlich zur primären Süßwahrnehmung über den Süßrezeptor TAS1R2/TAS1R3 weitere TAS1R3- oder TRPM5-unabhängige Detektionsmechanismen vorhanden sind (Damak u. a. 2003; 2006). Diese können unter anderem von Glukosetransportern (GLUT2, GLUT4, GLUT5, GLUT8 und GLUT9), dem Natrium-Glukose-Cotransporter 1 (SGLT1) und ATP-gesteuerten K^+ -Stoffwechselsensoren (K_{ATP}) abhängen (Kir 6.1, SUR1 und SUR2A) (Yee u. a., 2011; Merigo u. a., 2011; Sukumaran u. a., 2016).

2.3 TAS1R-unabhängige Süßwahrnehmung

GRZ, welche auf Zucker und Süßstoffe reagieren, weisen einen TAS1R-abhängigen Weg zur Wahrnehmung von Zuckern und kalorienfreien Süßungsmitteln, sowie einen TAS1R-unabhängigen Pathway zur Detektion von Monosacchariden auf. Es wurde bereits festgestellt, dass Glukosetransporter (GLUT), der Natrium-Glukose-Cotransporter 1 (SGLT1) und ATP-gesteuerte K^+ -Stoffwechselsensoren (K_{ATP}) in Geschmackszellen mit TAS1R3 coexprimiert und für die Erkennung von Zucker verwendet werden (Yee u. a., 2011; Merigo u. a., 2011; Sukumaran u. a., 2016). Diese speziellen TAS1R-unabhängigen Wege würden nur Reaktionen auf Monosaccharide erklären, nicht jedoch auf Disaccharide und Oligosaccharide, die keine Substrate für GLUT oder SGLT1 sind. Falls Disaccharide oder oligomere Zucker als Substrate für die TAS1R-unabhängige Süßwahrnehmung dienen, so müssen diese zuvor durch Enzyme, die am Kohlenhydratverdau beteiligt sind, zu Monosacchariden hydrolysiert werden. In diesem Kontext wurde bereits gezeigt, dass Darmenzyme, wie die α -Amylase oder die Sucrase-Isomaltase, welche diätische Zuckeroligomere zu Monosacchariden hydrolysieren, auch in lingualen Geschmackszellen und -geweben exprimiert werden. Durch diese Hydrolyse von Disacchariden und oligomeren Zuckern zu Monosacchariden ist es möglich, dass ein TAS1R-unabhängiger Weg auch deren Wahrnehmung in GRZ ermöglicht (Merigo u. a., 2009; Yee u. a., 2011; Sukumaran u. a., 2016). Diese Beobachtung wurde von Sukumaran u. a. (2016) bestätigt, welche zeigen konnten, dass die Behandlung der Zunge von Wildtyp C57BL/6 und Tas1r3-Knock-out Mäusen mit den Disaccharidase-Inhibitoren Miglitol (500 μ M) und Voglibose (10 μ M), spezifisch die Reaktionen des Geschmacksnervs auf Disaccharide, jedoch nicht auf Monosaccharide oder nicht kalorische Süßstoffe, verringern können.

2.3.1 K_{ATP} -abhängige Süßwahrnehmung

ATP-sensitive K^+ -Kanäle treten in einer Reihe von Geweben auf, insbesondere in β -Zellen des Pankreas, wo sie als Metabolismus-abhängige Ionenkanäle fungieren, welche sich bei steigender intrazellulärer ATP-Konzentration und der damit einhergehenden Depolarisation der Zelle schließen. Aufgrund des dadurch reduzierten K^+ -Ionen Effluxes kann eine Repolarisation verhindert werden und eine Membrandepolarisation wird initiiert, welche nachfolgend Aktionspotentiale, Ca^{2+} Influx durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle und Insulin Sekretion auslöst. Analog dazu haben Yee u. a. (2011) in Mäusen vor-

geschlagen, dass ein möglicher TAS1R-unabhängiger Pathway von der Glukoseaufnahme in Tas1r3-exprimierende GRZ abhängt, gefolgt von dem Metabolismus zu ATP, welches an den K_{ATP} -Kanal binden kann, diesen Kanal schließt und die GRZ depolarisiert. Mittels quantitativer real-time Polymerase-Kettenreaktion, *in situ* Hybridisierung und Immunohistochemie konnten Yee u. a. (2011) zeigen, dass neben Glukosetransportern auch schwach einwärts gleichrichtende ATP-sensitive K^+ -Kanäle selektiv auf Geschmackszellen, die auch eine Tas1r3-Untereinheit aufweisen, exprimiert werden. Das einwärts gleichrichtende K^+ -Kanalprotein (Kir) 6.1 bildet mit einer regulatorischen β -Untereinheit, dem Sulfonylharnstoff-Rezeptor (SUR) 1 oder 2A, diesen einwärts gleichrichtenden ATP-gesteuerte K^+ -metabolischen Sensor aus.

Für Mäuse wurde demonstriert, dass K_{ATP} -Kanäle in Tas1r3-exprimierenden GRZ eine Möglichkeit darstellen können die Aktivität dieser GRZ entsprechend dem Gehalt an metabolisierbaren, süßen Lösungen zu regulieren. Weiters können diese Kanäle den allgemeinen Stoffwechselzustand des Organismus beeinflussen, indem eine Kommunikation mit Geschmackszellen über Blutzucker und Hormone stattfindet. Sind K_{ATP} -Kanäle in Tas1r3-GRZ apikal angeordnet, würde eine Inhibierung des K^+ -Flusses durch Sulfonylharnstoffe, wie Glibenclamid, oder ATP die Zellen depolarisieren. Die Kombination eines kalorienfreien Süßungsmittels, welches über Tas1r2/Tas1r3 Rezeptor wirkt, um eine Second-Messenger-Signalkaskade zu initiieren, zusammen mit einem kalorischen Süßungsmittel, welches nach der Metabolisierung die Schließung der K_{ATP} -Kanäle auslöst, führt zu einer verbesserten Süßwahrnehmung gegenüber jener, die durch eine süß-schmeckende Verbindung alleine erreicht werden würde. Umgekehrt würde eine geringe Glukose beziehungsweise ein geringer Metabolismus aufgrund der gleichbleibenden, starken Aktivität von K_{ATP} -Kanälen die GRZ hyperpolarisieren, wodurch es unwahrscheinlicher wird, dass die Aktivierung des Tas1r2/Tas1r3 Rezeptors durch einen Süßstoff eine Depolarisation hervorruft. Daher ist es denkbar, dass die Regulation der K_{ATP} -Kanäle von Tas1r3-GRZ eine Möglichkeit darstellt, die Empfindlichkeit der GRZ gegenüber süßen Verbindungen gemäß den Stoffwechselbedürfnissen zu regulieren. Darüber hinaus können K_{ATP} -Kanäle von GRZ möglicherweise die Hormon- und/oder Neurotransmitterfreisetzung aus Tas1r3-Zellen als Reaktion auf Änderungen des Metabolismus in Geschmackszellen beeinflussen (Yee u. a., 2011).

2.3.2 Glukosetransporter-abhängige Süßwahrnehmung

2.3.2.1 Natrium-Glukose-Cotransporter

Flavonoidkonjugate, unter anderem mit Glukose, haben polare Eigenschaften und können die lipidreiche Zellmembran nur mit Hilfe von membranassoziierten Transportproteinen, den Natrium-Glukose-Cotransportern, durchqueren (Gonzales u. a., 2015). Die Familie der Natrium-Glukose-Cotransporter setzt sich aus insgesamt sechs Mitgliedern zusammen, davon haben zwei Mitglieder (SGLT1 und SGLT2) eine Funktion als Zuckertransporter und SGLT3 eine Rolle als Zuckersensor. SGLT1 gehört zur Unterfamilie der Zuckertransporter, welche die Natrium- und Glukosesubstrate aus dem Darmlumen in das Zellinnere von Enterozyten transportieren, wobei die beiden Substrate in die gleiche Richtung über die apikale Membran befördert werden. Beim Symport werden zwei Natriumatome zusammen mit einem Molekül Glukose transportiert, dabei folgt Natrium dem Konzentrationsgradienten nach innen, welcher auf basolateraler Seite durch eine Natrium-Kalium-ATPase aufrecht gehalten wird. Hierbei kann ein Transport der Glukose gegen deren Konzentrationsgradienten erfolgen, auch wenn die Konzentration der luminalen Glukose geringer als jene der Blutglukose ist (Wright, Hirayama, und Loo, 2007; Kellett u. a., 2008; Merigo u. a., 2011). Eine Reihe von Tierstudien hat gezeigt, dass die intestinale Expression des Gens *SLC5A1*, welches für SGLT1 codiert, in Gegenwart von einer unterschiedlichen Menge an luminalen süßen Liganden, einschließlich künstlicher Süßstoffe, erhöht ist. Es ist bereits bekannt, dass dieser Prozess unabhängig vom Stoffwechsel und über einen Rezeptorweg des süßen Geschmacks erfolgt (Dyer u. a., 2003; Stearns u. a., 2010; Moran u. a., 2010). Entscheidend für diese Erkenntnis waren Ergebnisse von Margolskee u. a. (2007), die anhand eines Mausmodells zeigten, dass das intestinale SGLT1 bei Mäusen, welchen das G-Protein α -Gustducin oder die Süßrezeptoreinheit Tas1r3 fehlte, als Reaktion auf Glukose oder Sucralose nicht hochreguliert war. Im Gegensatz dazu erhöhen diätische Zucker und künstliche Süßstoffe die SGLT1 mRNA- und Proteinexpression und die Aufnahmekapazität von Glukose bei Wildtyp C57BL/6 Mäusen (Margolskee u. a., 2007).

Neben Rezeptoren für den süßen Geschmack scheinen auch vagale Reflexwege eine wichtige Rolle bei der SGLT1 Kontrolle zu spielen. Hierbei wurde bei Tieren gezeigt, welche einer selektiven vagalen Ablation unterliegen, dass der erwartete Anstieg des SGLT1 Proteins als Reaktion auf eine akute und chronische Glukoseexposition im Darm, sowie durch ein zirkadianes Muster von Fütterungszeiten, verloren geht (Bates, Sharkey,

und Meddings, 1998; Stearns u. a., 2008; 2010). Dieser neuronale Reflex könnte die Beobachtung erklären, dass die Glukoseexposition isolierter Regionen des GI bei Ratten zu einer erhöhten SGLT1 Proteinexpression in nicht exponierten Regionen führt (Stearns u. a., 2010). Weiters besteht auch die Möglichkeit, dass ein humoraler Reflexweg durch die Glukose im Darm ausgelöst wird, um die SGLT1 Expression anderenorts zu modulieren. Beispielsweise wurde die GIP-Freisetzung als Mechanismus vorgeschlagen, der die Aktivierung des Süßrezeptors im Darm mit der SGLT1 Regulation bei Mäusen verbindet (Margolskee u. a., 2007; Singh u. a., 2008).

Dieser Mechanismus kann möglicherweise nicht auf Menschen übertragen werden. In einer Studie von Ma u. a. (2010) mit gesunden Probanden konnte keine Wirkung von Sucralose bei der Verbesserung der Glukoseaufnahme, glykämischen Antwort oder des Inkretin-Effekts beobachten werden, wenn Glukose akut intraduodenal infundiert wurde. Die Konzentration der, bei dieser Studie infundierten, Glukose könnte jedoch die verfügbaren Glukosetransporter gesättigt haben, worin eine mögliche Synergie zwischen Sucralose und Glukose geschlossen werden könnte. Es muss zudem noch gezeigt werden, ob eine längere Exposition mit diätischen Süßungsmitteln die Glukoseabsorption im Darm des Menschen sowie bei den Mäusen erhöhen kann (Margolskee u. a., 2007) oder ob es beim Menschen zu Süßungsmittel-spezifischen Reaktionen kommen kann.

2.3.2.2 *Glukosetransporter*

Die natriumunabhängige GLUT-Familie, deren Vertreter ausschließlich Hexosen bidirektional und energieabhängig über die Zellmembran befördern und sich auf der basolateralen Membran befinden, besteht aus 14 Mitgliedern, wobei GLUT1 - 5 die bekanntesten Glukosetransporterisoformen sind, die unterschiedliche regulatorische und/oder kinetische Eigenschaften aufweisen (Scheepers, Joost, und Schürmann, 2004; Wright, Hirayama, und Loo, 2007). Dieser bidirektionale Transportmechanismus gilt, trotz geringer Affinität, auch für andere Zucker wie Mannose oder Galaktose, jedoch nicht für Fruktose, die nur von GLUT2 ausgestoßen werden kann (Cheeseman, 1993), aber von der GLUT5-Isoform aus dem Darmlumen aufgenommen werden muss (Burant u. a., 1992). Im Darm wird der Transport von Glukose als wichtiges Beispiel dafür angesehen, wie süße Reize im Lumen eine regulatorische Wirkung auf Glukosetransporter haben, da Änderungen der Zuckerkonzentration, die während der Verdauung im Darmlumen erzeugt werden, adaptive Reaktionen von Glukosetransportern im Darmepithel induzieren.

Mehrere *in vivo* und *in vitro* Experimente haben eine enge Verbindung zwischen der Expression von intestinalen Glukosetransportern und der Menge und Zusammensetzung der Nahrung nachgewiesen (Merigo u. a., 2011).

SGLT1 kann bei einer hohen Glukosekonzentration, zum Beispiel nach einer Mahlzeit, gesättigt werden und spielt daher eine wichtige Rolle bei der Aussendung des ersten wesentlichen Signals, welches zur Erzeugung einer zusätzlichen Transportkapazität durch schnelle Translokation von GLUT2 aus der basolateralen in die apikale Membran von Enterozyten führt, um überschüssige Glukose absorbieren zu können (Kellett u. a., 2008). Es erfolgt jedoch so lange keine Insertion neuer GLUT2, bis das zweite essentielle Signal durch die Aktivierung des Süßrezeptors in der apikalen Membran erzeugt wird (Li u. a., 2002; Mace u. a., 2007). Erst bei Glukosekonzentrationen von 30 mM – 100 mM stellt GLUT2 den Hauptabsorptionsweg der Glukose dar. Alternativ kann die apikale GLUT2 Insertion bei einer niedrigen Glukosekonzentration von 20 nM durch die Aufnahme von künstlichen Süßstoffen induziert werden (Mace u. a., 2007; 2009). Diese Daten deuten darauf hin, dass zumindest in Ratten, Süßrezeptoren die vorhandenen Süßungsmittel oder hohe Glukosekonzentrationen im Darm mit einem gesteigerten Glukosetransport über GLUT2 verbinden (Young, 2011). Möglicherweise ist dieser Transportweg speziesspezifisch, da apikale GLUT2 in Darmepithelzellen von Schweinen nach einer kohlenhydratangereicherten Mahlzeit nicht nachgewiesen werden konnte (Moran u. a., 2010). Darüber hinaus spricht der Gendefekt Glukose-Galaktose-Malabsorption, welcher aus Mutationen im, für SGLT1 codierenden, *SLC5A1* Gen resultiert und bei Babys nur selten auftritt, gegen das Vorhandensein eines menschlichen Mechanismus, der zur Translokation von GLUT2 in die apikale Bürstensaummembran der Enterozyten führt (Turk u. a., 1991; Young, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass inaktivierende Mutationen im Gen *SLC2A2*, welches für GLUT2 codiert, vorübergehend Diabetes mellitus bei Neugeborenen verursacht, wobei dieses Krankheitsbild nach 18 Monaten verschwindet. Dies weist darauf hin, dass in den ersten Lebensmonaten GLUT2 kurzzeitig für die Kontrolle der Insulinsekretion benötigt wird (Sansbury u. a., 2012).

2.4 Zellmodelle der intestinalen Barriere

Das Darmepithel ist eine der größten Schleimhautoberflächen des Körpers, die eine physikalische und biochemische Barriere gegen die äußere Umgebung bildet. Der Großteil (~ 80%) der epithelausbildenden Zellen sind absorptive Enterozyten mit Barriere-, Nährstoffabsorption- und immunologischer Funktion. Zusätzlich zu den Enterozyten werden für die Stoffwechsel- und Verdauungsfunktionen des Darmepithels noch weitere spezialisierte Darmepithelzellen wie Mucus-produzierende Becherzellen, enteroendokrine Zellen, Paneth-Zellen, Tufts-Zellen und Microfold-Zellen (M-Zellen) benötigt (Haller, Grune, und Rimbach, 2013; Kleiveland, 2015). Den zweitgrößten Teil der epithelausbildenden Zellen stellen Mucus-produzierende Becherzellen dar, wobei diese 10 – 24% des Epithels, abhängig von der GI-Region in der sie sich befinden, ausmachen (Hilgendorf u. a., 2000).

Die Epithelschicht des Darms ist durch eine Schleimschicht vom Inhalt des Darmlumens getrennt. Diese Mucusschicht wirkt als physikalische und chemische Abwehr gegen Lebensmittelpartikel, Chemikalien, Enzyme, Mikrobiota, mikrobielle Produkte und sekretierte Produkte wie Gallensäuren (Johansson u. a., 2008). Sekretierte Mucine sind große, stark O-glykosylierte Glykoproteine, die die wichtigsten makromolekularen Bestandteile des Schleims bilden und von spezialisierten Becherzellen produziert werden. Die Mucusschicht überzieht die gesamte Epithelschicht und stellt somit eine erste Barriere dar, um den Kontakt von intestinalem Epithel und Mikroorganismen zu minimieren (McGuckin u. a., 2011; Haller, Grune, und Rimbach, 2013). Durch eine gemeinsame Kultivierung der CaCo-2 und HT29-MTX-E12 Zelllinien kann ein *in vitro* Modell erhalten werden, das die im humanen Epithel am stärksten vertretenen Zelltypen, die Enterozyten und die Mucus-produzierende Becherzellen, inkludiert und somit eine verbesserte Näherung zum humanen Darmepithel darstellt. Sowohl die Morphologie als auch die Permeabilität der Zellschicht, die aus den kokultivierten CaCo-2 Zellen und HT29-MTX Zellen besteht, ähnelt jener des intestinalen Epitheliums. Walter u. a. (1996) verglichen die Permeabilität des Kokultur Modells mit den absorbierten Fraktionen bestimmter Arzneimittel beim Menschen, wobei eine gute Korrelation gefunden werden konnte.

2.4.1 CaCo-2 Zellmodell

Die humane Epithelzelllinie Cancer coli-2 (CaCo-2) wurde von J. Fogh am Sloan Kettering Cancer Research Institute aus einem humanen kolorektalen Adenokarzinom gewonnen und wird seither häufig als Modell für die Darmepithelbarriere verwendet (Fogh, Fogh, und Orfeo, 1977). Eine der vorteilhaften Eigenschaften dieses Zellmodells ist die Fähigkeit sich in einen adhärenen Zellmonolayer mit vielen Charakteristika, die für absorbierende Enterozyten im Dünndarm typisch sind, auszudifferenzieren. Während der Ausbildung eines konfluenten Monolayers beginnen sie zu säulenförmigen, absorbierenden Zellen zu polarisieren und auf ihrer apikalen Oberfläche eine charakteristische Bürstensaummembran mit Mikrovilli auszubilden (Lea, 2015). Darüber hinaus kommt es zwischen benachbarten Zellen zur Ausbildung von Tight Junctions, zur Expression von Nährstofftransportern wie SGLT1, GLUT1 und GLUT2 und zur Sekretion von typischen Verdauungsenzymen, Membranpeptidasen und Disaccharidasen des Dünndarms (Hidalgo, Raub, und Borchardt, 1989; Mahraoui u. a., 1994). Einige dieser typischen Charakteristika des differenzierten CaCo-2 Phänotyps sind in Abbildung 7 illustriert.

Aufgrund der abweichenden Kultivierungsbedingungen in den unterschiedlichen Laboratorien und der variierenden Anzahl von Passagen haben CaCo-2 häufig heterogene Eigenschaften erworben, wobei sich die Expression der, für die Enterozyten typischen, Differenzierungsmarker mit zunehmender Anzahl an Passagen verändert (Artursson, Palm, und Luthman, 2001). Weiters wurde berichtet, dass sich Parameter wie der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) und die Proliferationsrate mit steigender Passagennummer verändern können (Briske-Anderson, Finley, und Newman, 1997). Das *in vitro* CaCo-2 Modell kann Informationen über die biologischen und biochemischen Barriereigenschaften der Darmschleimhaut, aber auch entscheidende Aussagen über die Absorption von Arzneimitteln und Lebensmittelkomponenten liefern, die sowohl für die Pharmazie als auch für die Lebensmittelindustrie relevant sind (Tang u. a., 1993; Nerurkar, Burton, und Borchardt, 1996; P. S. Burton u. a., 1996, 1997; Knipp u. a., 1997; Shimizu, 2010).

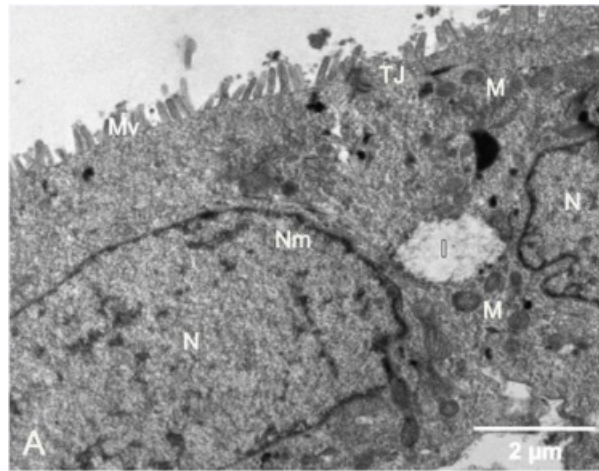


Abbildung 7: Differenzierte CaCo-2 Enterozyten 21 Tage nach dem Ausstreuen. Abkürzungen der Zellstrukturen: Mitochondrien (M), Mikrovilli (Mv), Nucleus (N), Kernmembran (Nm), Tight Junction (TJ) (Abal u. a., 2017).

Im Vergleich zum natürlichen humanen Darmepithel weist das CaCo-2 Zellmodell dennoch mehrere Einschränkungen auf. Einerseits besteht das humane Darmepithel neben Enterozyten noch aus weiteren Zelltypen und andererseits ist im CaCo-2 Modell keine Mucusschicht vorhanden. Zudem wirken sich einige nichtzelluläre Parameter *in vivo* auf die Absorption von bestimmten Verbindungen in die Zellen aus. Folglich wird der Transport von lipophilen Molekülen stark durch vorhandene Gallensäuren und Phospholipiden beeinflusst. Auch die Löslichkeit der Verbindungen in der Mucusschicht führt zur Veränderung der Aufnahme *in vivo*, da die Absenz von Mucus den hoch diffusionsfähigen kleinen Molekülen einen erleichterten Zugang zu den Zellen ermöglicht, was oftmals zu einer Überschätzung der Permeabilität solcher Verbindungen führt (Hidalgo, 1996; Johansson u. a., 2008). Ergänzend dazu wurde dieses Modell oftmals kritisiert, da die Permeabilität des CaCo-2 Monolayers für hydrophile Verbindungen, die im Allgemeinen durch parazelluläre Mechanismen transportiert werden, aufgrund der relativ hohen Anzahl an Tight Junctions der CaCo-2 Zellen, schlecht ist (Artursson, Palm, und Luthman, 2001). Obwohl festgestellt wurde, dass CaCo-2 eine große Anzahl von Enzymen und Transportproteinen exprimiert, die auch im natürlichen humanen Darmepithel vorhanden sind, legen Studien nahe, dass es Unterschiede in den Genexpressionsprofilen von Epithelzelllinien wie CaCo-2 und HT29 mit dem menschlichen Darmepithel gibt. Daher können die Daten aus den *in vitro* CaCo-2 Experimenten nicht direkt mit der *in vivo* Situation verglichen werden. Dennoch bietet das CaCo-2 Darmepithelzellenmodell aufgrund der Einfachheit und Reproduzierbarkeit einige Vorteile, die einen Vergleich der Ergebnisse zwischen den Laboratorien ermöglicht (Lea, 2015).

2.4.2 HT29-MTX-E12 Zellmodell

Fogh und Trempe (1975) isolierten aus einem Primärtumor einer 44 Jahre alten kaukasischen Frau die humane Kolonadenokarzinom-Zelllinie HT29, welche ursprünglich dazu verwendet wurde, die Biologie von humanen Kolonkarzinomen zu untersuchen. Seither haben diese Zellen jedoch, aufgrund ihrer Fähigkeit Eigenschaften reifer Darmzellen auszubilden, insbesondere für Studien, die sich auf die Verdauung von Lebensmitteln und Bioverfügbarkeit fokussieren, Interesse geweckt. Unter den Standardwachstumsbedingungen, das heißt hohe Glukosekonzentration und 10% fötales Kälberserum (FBS), zeigen diese Zellen einen undifferenzierten Phänotyp, wobei sie als adhärenter Monolayer von unpolarisierten und undifferenzierten Zellen wachsen, die funktionell keine typischen Merkmale von Darmepithelzellen aufweisen (Martínez-Maqueda, Miralles, und Recio, 2015). Seitdem gezeigt wurde, dass der Ersatz der Glukose durch Galaktose im Kulturmedium eine reversible enterozytische Differenzierung induziert, sind HT29 Zellen ein einzigartiges Modell für die Untersuchung der molekularen Mechanismen der Darmzell-differenzierung geworden (Pinto u. a., 1982). Durch die Behandlung der HT29 Zellkultur mittels Methotrexat konnte eine stabile homogene Subpopulation von schleimsekretierenden Zellen erhalten werden (Lesuffleur u. a., 1990).

Der differenzierte, polarisierte Phänotyp ist durch spezifische physiologische, morphologische und durch biochemische Marker charakterisiert. In Abbildung 8 ist der Phänotyp der differenzierten HT29-MTX Becherzellen mit diesen spezifischen Markern dargestellt. Die Differenzierung ist wachstumsbedingt und beginnt nach der Konfluenz, wobei die Zellen einen Monolayer mit Tight Junctions zwischen den Zellen, mit weniger Tight Junctions im Vergleich zu CaCo-2, und einer apikalen Bürstensaummembran ausbilden. Zusätzlich exprimieren differenzierte HT29-MTX Zellen Bürstensaum-assoziierte Hydrolasen und Proteine, die normalerweise in Darmmikrovilli vorhanden sind, jedoch keine Laktase. Es konnte beobachtet werden, dass die enzymatische Aktivität geringer ist als die *in vivo* vorherrschende (Zweibaum, Alvarado, und van Os, 1986; Zweibaum u. a., 2011; Martínez-Maqueda, Miralles, und Recio, 2015). Einen entscheidenden Hauptunterschied zu CaCo-2 Zellen stellt deren Fähigkeit dar, größere Mengen an Mucinen produzieren zu können (Huet u. a., 1987; Maoret u. a., 1989). Dabei können HT29-MTX nicht nur das membrangebundene MUC1 produzieren, sondern auch das schleimbildende MUC5 (Kleiveland, 2015). Es muss jedoch beachtet werden, dass

HT29-MTX Zellen hauptsächlich Magen-ähnliche Mucine, wie das MUC5AC, sekretieren, welche sich von den Mucinen MUC2 und MUC3 des Darms unterscheiden (Lefuffleur u. a., 1993; Hennebicq-Reig u. a., 1997).

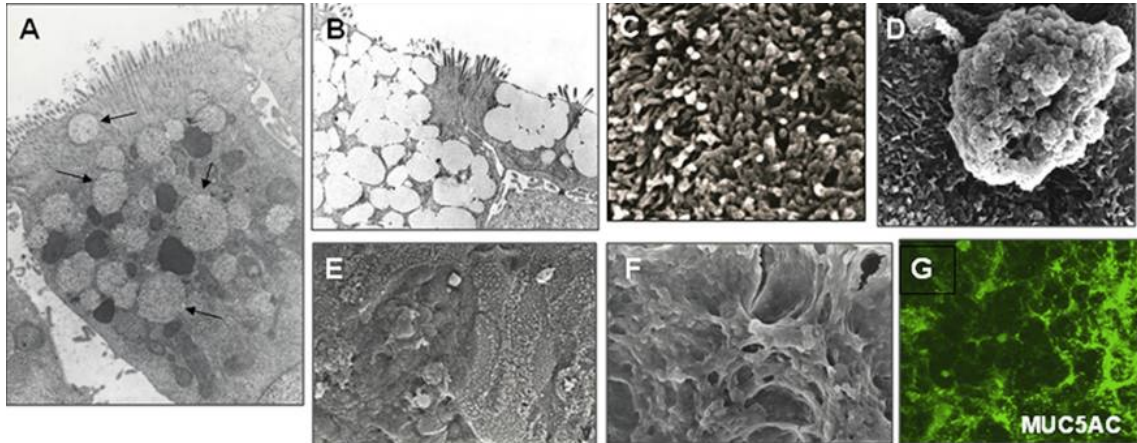


Abbildung 8: Differenzierte schleimsekretierende HT29-MTX Becherzellen. (A) Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahme von konfluenten, vollständig differenzierten HT29-MTX Zellen mit der polarisierten Organisation der Zellen, einer apikalen Bürstensaummembran und intrazellulären Mucin-Vesikeln, (B) TEM mit intrazellulären Mucin-Vesikeln nahe der apikalen Seite, (C) Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme der Bürstensaummembran nach der Entfernung des Schleims, (D) REM Aufnahme der Schleimsekretion an der Zelloberfläche, (E-F) REM Aufnahme der Schleimschicht auf der Zelloberfläche, (G) Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie Aufnahme des immunfluoreszenzmarkierten MUC5AC (Liévin-Le Moal und Servin, 2013).

HT29 Zellen und HT29 abgeleitete Zelllinien, wie auch HT29-MTX Subtyp E12, wurden in großem Umfang eingesetzt, um die potentiell krebshemmenden Effekte von verschiedenen Lebensmittelkomponenten und deren GI Verdauung zu untersuchen (Pérez u. a., 2002; Guil-Guerrero u. a., 2011). Zusätzlich ist dieses Modellsystem wichtig für die Abschätzung der Darmpermeabilität, da die Mucusbarriere der Absorption bestimmter lipophiler Verbindungen entgegenwirkt. Des Weiteren wurden mit diesem Modell immunregulatorische und antioxidative Aktivitäten sowie Barriere-Eigenschaften bewertet (Behrens u. a., 2001; Collins, 2004; Wagar u. a., 2009; Rieder u. a., 2011). Zudem kann eine Anwendung für Transportstudien von Arzneimitteln und Lebensmittelverbindungen erfolgen oder es kann die intestinale Immunantwort auf bakterielle Infektionen und das Überleben, die Adhäsion oder die Invasion von Mikroorganismen untersucht werden.

Wie auch im CaCo-2 Zellmodell, können diese signifikante Unterschiede in der Genexpression von Transportproteinen und Enzymen, verglichen mit natürlichen humanen Darmzellen, aufweisen (Langerholc u. a., 2011). Jedoch konnte eine ähnliche Proteinexpression in HT29 Zellen und den entsprechenden Darmabstrichen gefunden werden, wovon einige Proteine für das menschliche Darmepithel *in vivo* charakteristisch zu sein scheinen. Dennoch wurden mehrere Proteine, einschließlich einiger Transportproteine, über- oder unterexprimiert (Lenaerts u. a., 2007). Bourguine u. a. (2012) verglichen die Expressionsprofile von 377 Genen in HT29 und vier weiteren intestinalen Zelllinien, welche als *in vitro* Modelle des Darmepithels Anwendung finden, mit den entsprechenden Gewebebiopsien des GI. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass differenzierte HT29 Zellen und menschliches Darmgewebe nicht signifikant unterschiedlich sind. Obwohl die HT29 Zelllinie in ihrem differenzierten Phänotyp den epithelausbildenden Zellen in Bezug auf deren Struktur, das Vorhandensein Bürstensaum-assoziiierter Hydrolasen und Proteinen ähnelt, weist dieses Zellmodell einige Einschränkungen auf. Da es sich bei den Zellen um maligne Zellen handelt, haben sie einen erhöhten Glukoseverbrauch und stellen eine Beeinträchtigung des Glukosestoffwechsels dar, zudem imitieren diese zwar einige Eigenschaften von Mucus-produzierenden Becherzellen, weisen aber nicht alle Hydrolasen auf (Zweibaum u. a. 2011). Es wurde zudem postuliert, dass diese Zellen den humanen fetalen Kolonzellen aufgrund der exprimierten Hydrolasen und der intrazellulären Konzentration von akkumuliertem Glykogen besonders ähnlich sind (Hekmati, Polak-Charcon, und Ben-Shaul, 1990).

2. Zielsetzung und Hypothesen

Der weltweit ansteigende Konsum von Lebensmitteln mit hohem Energiegehalt, welcher primär auf Zucker zurückzuführen ist, steht nicht nur im Zusammenhang mit Übergewicht und Adipositas, welche sich seit 1975 mehr als verdoppelt haben, sondern auch mit der Pathogenese von Diabetes mellitus Typ II und Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Burke und Small, 2015; World Health Organization, 2018; Sánchez-Tapia u. a., 2019). Aus diesem Grund wird empfohlen, den Zuckergehalt in Lebensmitteln und Getränken zu reduzieren und die Aufnahme von freien Zuckern auf maximal 10% der Gesamtenergieaufnahme zu beschränken (World Health Organization, 2015). Eine mögliche Strategie dafür ist der Einsatz von künstlichen, kalorienfreien Süßstoffen, um den Kaloriengehalt zu reduzieren ohne die Nahrungsmittelaufnahme zu senken und gleichzeitig den süßen Geschmack aufrechtzuerhalten (Beidler, 1982; Fernstrom, 2015). Ein Großteil der dazu veröffentlichten Studien im Menschen fokussiert sich auf Monosaccharide (Tappy, 2018), jedoch sind nur wenige Arbeiten bekannt, die natürliche, komplexe Süßstoffe wie Steviolglykoside oder künstliche Süßstoffe einschließlich Neohesperidin-Dihydrochalcon analysieren. Auch ein Einfluss einer Langzeitbehandlung mit natürlichen, komplexen Süßstoffen oder künstlichen Süßstoffen wurde bisher nur in Mäusen, nicht aber in humanen Darmepithelmodellen untersucht (Shi, Zhu, und Deng, 2019).

Das bislang für *in vitro* Untersuchung der humanen intestinalen Barriere etablierte CaCo-2 Zellmodell bringt mehrere Limitationen mit sich. Zum einen weist das CaCo-2 Modell im Gegensatz zum humanen Darmepithel, welches aus diversen, spezialisierten Darmepithelzellen besteht, nur absorptive Enterozyten auf, zum anderen kann dieses Modell keine, für die Epithelschicht des Darms charakteristische, Schleimschicht aufgrund fehlender Mucus-produzierender Zellen, ausbilden. Weiters zeigt das CaCo-2 Zellmodell aufgrund von zahlreichen Tight Junctions, laut einiger Studien, eine eingeschränkte parazelluläre Permeabilität verglichen mit dem humanen intestinalen Epithel (Artursson, Palm, und Luthman, 2001; Bourguine u. a., 2012). Die Hypothese ist nun, dass durch die Cokultivierung von CaCo-2 Enterozyten und Mucus-produzierenden HT29-MTX-E12 Zellen das etablierte *in vitro* Darmepithelmodell verbessert werden kann. Um dieses Cokultur Modell vollständig zu charakterisieren und mit dem standardmäßig verwendeten CaCo-2 Monokultur Modell zu vergleichen, wurden transepitheliale elektrische Wider-

standsmessungen, ein Permeabilitätstest mit Lucifer Yellow zur Überprüfung der Integrität des Zellmonolayers und eine Alcianblau Färbung zur Sichtbarmachung des, durch die HT29-MTX-E12 Zellen, produzierten Schleims durchgeführt.

Bei einer anhaltenden Aufnahme von Süßungsmitteln werden die Untereinheiten TAS1R2 und TAS1R3 des Süßrezeptors aktiviert (Sánchez-Tapia u. a., 2019). Diese Rezeptoren für den süßen Geschmack sind nicht nur in Geschmacksknospen im Mundraum vorhanden, sondern konnten unter anderem auch im GI nachgewiesen werden, wobei das menschliche Darmepithel eine besonders hohe Dichte von Geschmacksrezeptorproteinen aufweist (Meyer u. a., 2012; Simon u. a., 2013; Lee und Cohen, 2014; Kohno, 2017). Wie die Rezeptoren des süßen Geschmacks auf der lingualen Oberfläche, reagieren die Süßrezeptoren im GI ebenso auf kalorische und nicht kalorische Süßungsmittel (Jang u. a., 2007). Zudem wurde bereits festgestellt, dass Glukosetransporter (GLUT), Natrium-Glukose-Cotransporter 1 (SGLT1) und ATP-gesteuerte K^+ -Stoffwechselsensoren (K_{ATP}) in Geschmackszellen mit der TAS1R3-Untereinheit coexprimiert werden und einen Weg der TAS1R-unabhängigen Süßwahrnehmung darstellen (Yee u. a., 2011; Merigo u. a., 2011; Sukumaran u. a., 2016). Diesbezüglich konnte bereits gezeigt werden, dass die Wahrnehmung von süß-schmeckenden Verbindungen durch den Süßrezeptor, im Speziellen durch die TAS1R3-Untereinheit, sowohl die Expression des passiven Glukosetransportes GLUT2, als auch jene des aktiven Natrium-Glukose-Cotransporters SGLT1 in Nagetieren reguliert werden kann, jedoch gibt es noch keine vergleichbaren Studien im Menschen (Margolskee u. a., 2007; Mace u. a., 2007).

Nach der Validierung des neuen, humanen *in vitro* Darmepithelmodells sollte daher eine weitere Hypothese bearbeitet werden, die einen Einfluss einer mehrwöchigen Süßungsmittelexposition auf die Genexpression in einer CaCo-2 Monokultur und in einem Cokultur Modell vermutet. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Veränderung der Genexpression von *SLC5A1* (SGLT1), *SLC2A2* (GLUT2), *TAS1R3* und *KCNJ8* (Kir 6.1), als Marker für K_{ATP} , durch die Langzeitbehandlung der beiden Zellmodelle, über den Zeitraum der dreiwöchigen Differenzierung, mit den süß-schmeckenden Verbindungen Sucrose, Rebaudiosid M (Reb M), Sucralose und Neohesperidin-Dihydrochalkon (NHDC) zu analysieren. Außerdem sollte eine mögliche Rolle der Süßintensität bei der Genexpressionsänderung geklärt werden, wobei zwei unterschiedliche Konzentrationen der süß-schmeckenden Verbindungen gewählt wurden, zum einen eine äquimolare Konzentration (0.1 mM) und

zum anderen eine, zu 5%-iger Sucrose, äquisüße Konzentration des jeweiligen Süßungsmittels.

3. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tabelle 1: Geräte

Geräte	Hersteller
Autoklav, 3870 ML	Tuttnauer Europe B.V., Breda, NL
Chopstick Elektrodenset für das EVOM	World Precision Instruments Inc., Sarasota, US
Voltohmmeter, STX2, 4 mm	
CO ₂ Inkubator, C150	BINDER GmbH, Tuttlingen, DE
C1000 Touch™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, US
Elektrische Pipettierhilfe, PipetBoy, acu 2	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, CH
Elektrophorese-Kamm, 34-Well, 1.5 mm	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Elektrophoresekammer, 40-1515	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Elektrophorese-Stromquelle, EV233	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Endohm-24 SNAP, Endohm für 24 mm Zellkultur-Inserts	World Precision Instruments Inc., Sarasota, US
Epithelialer Voltohmmeter EVOMX	World Precision Instruments Inc., Sarasota, US
Erlenmeyerkolben, 250 mL	SIMAX Professional, Sázava, CZ
EVOS® FL Fluoreszenzmikroskop, Cell Imaging System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Mehrkanalpipette (300 µL)	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg, DE
Imager, FUSION-FX7™	Vilber Lourmat™ Deutschland GmbH, Eberhardzell, DE
Inkubationsschüttler, INCU-Line®, ILS 4	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank MSC Advantage	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US

Mikroliterpipette, Research plus [®] , (0.1 – 2.5 µL; 0.5 - 10 µL; 2 - 20 µL; 10 - 100 µL; 20 - 200 µL; 100 - 1000 µL; 0,5 - 5 mL)	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Mikrotiterplatten-Schüttler, PMS-1000i	Grant Instruments [™] , Cambridge, UK
Mikroskop, IT400 Trino	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Mikrowelle	STUDIO, Aldi Süd, Mülheim an der Ruhr, DE
Mini-Taumelmischer	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Präzisionswaage, Entris 224I-1S	Satorius AG, Göttingen, DE
Präzisionswaage, Pioneer [™]	OHAUS, Parsippany, US
StepOnePlus [™] , Real-Time PCR System	Applied Biosystems [™] , Foster City, US
Tecan Infinite [®] M200 Plattenlesegerät	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Tecan NanoQuant [®] Platten	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Trockenschrank, Dry-Line [®]	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Ultraschallbad, Ultrasonic Cleaner	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Vortexer, RS-VA10	Phoenix Instruments, Garbsen, DE
Wasseraufbereitungsanlage, Reinstwasser System, arium pro [®]	Satorius AG, Göttingen, DE
Wasserbad, open bath steel	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Zählkammer, Neubauer [®] improved bright-line, 0.1 mm Tiefe, 0.0025 mm ²	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, DE
Zentrifuge, Microcentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifuge, Centrifuge 5804R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
12 Megapixel Dualkamera, CMOS Bildsensor	Sony Corporation, Tokio, JPN

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
Aspirations-Pipetten, steril, 2 mL	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Cryoröhrchen mit Innengewinde, 2 mL, steril	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
CytoOne® Zellschaber, 220 mm, 11 mm fixierte Klinge	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg, DE
CytoOne®, 100 × 20 mm, unbehandelt, steril	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg, DE
Einmalkanüle, Sterican® Standard-kanülen, Gr. 2, steril	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Einmalspritze, Injekt® Solo, steril, 2 mL, 5 mL, 10 mL	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Laborhandschuhe, Microflex™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
XCEED™ Puderfreie Nitril Handschuhe	
Menzel Deckgläser 18 x 18 mm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
DURAN Objektträger, 76 x 26 mm	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, DE
ROTILABO® Spritzenfilter, steril, PVDF Porengröße 0.22 µm, Ø Membran 30 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
ROTILABO® Spritzenfilter, steril, PVDF Porengröße 0.45 µm, Ø Membran 30 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Pasteurpipette, ohne Wattestopfen, Kalksoda-Klarglas	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Pipettenspitzen, TipOne® (10 µL; 200 µL; 300 µL; 1000 µL; 5 mL)	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg, DE
Präzisionstücher, Kimtech Science	Kimberly-Clark, Irving, US
Sarstedt Deckgläser, 13 mm, steril	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Serologische Pipetten, steril (5 mL; 10 mL; 25 mL; 50 mL)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
SuperLock Mikrozentrifugengefäß, 1.5 mL	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg, DE

Wischtücher, Rotizell®-Taschentücher	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Zellkulturflasche (T75, T175), steril	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Zellkultur-Insert, 6- und 24-Well, PET, durchsichtig, 0.4 µm	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Zellkulturschale, Falcon™, 10 cm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Zellkultur Multi-Well-Platten, Standard F, steril (6-, 12-, 24- und 96-Well-Platten)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Zellkultur Multi-Well Platten, Cell+, Standard F, steril (6-Well-Platten)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Zentrifugenröhrchen, Falcon™, konisches Zentrifugengefäß (15 mL, 50 mL)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
1,5 mL Reaktionsgefäße ROTILABO®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE

Tabelle 3: Verwendete Programme

Programme	Hersteller
ChemDraw® Professional	PerkinElmer® Informatics Inc., Waltham, US
EVOS® FL Cell Imaging System Software	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Fusion-Capt™ Software	Vilber Lourmat™ Deutschland GmbH, Eberhardzell, DE
LinRegPCR Version 2016.0	Heart Failure Research Center, Academic Medical Center Amsterdam, NL
Microsoft Excel, Version 16.32	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Plattenlesegerät Software, i-control™ 1.6	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Prism 8	GraphPad Software Inc, San Diego, US
StepOne™ Software Version 2.1	Applied Biosystems™, Foster City, US

4.1.2 Chemikalien

Tabelle 4: Allgemeine Chemikalien und molekularbiologisches Material

Produkt	Hersteller
Albumin Fraktion V (BSA), $\geq 98\%$, pulv., für die Molekularbiologie	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Alcian Blue 8 GS, für Mikroskopie	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
AmpliTaQ Gold™ 360 Master Mix	Applied Biosystems™, Foster City, US
CaCo-2 Zelllinie	CLS Cell Lines Service GmbH, Eppe- lheim, DE
D – (+) – Glukose, wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Dimethylsulfoxid, 99,5%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
DNA Gel Ladepuffer (6 ×)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Dulbecco's Modified Eagle's Medium, viel Glukose, GlutaMAX™ Zusatz	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
Erythrosin B (0,1% in PBS, steril filtriert)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
Essigsäure, 100%, p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Ethanol, 96%	LACTAN Chemikalien & Laborgeräte GmbH & Co. KG, Graz, AT
Ethanol $\geq 96\%$, vergällt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Formaldehyd, für Molekularbiologie, 38% in Wasser	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
GAPDH Forward Primer	VBC-Biotech Services GmbH, Wien, AT
GAPDH Reverse Primer	VBC-Biotech Services GmbH, Wien, AT
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
SLC2A2 Forward Primer	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE

SLC2A2 Reverse Primer	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), 1 M, pH 7.0-7.6, steril filtriert, BioReagent, für Zellkultur	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
HPRT Forward Primer	VBC-Biotech Services GmbH, Wien, AT
HPRT Reverse Primer	VBC-Biotech Services GmbH, Wien, AT
HT29-MTX-E12 Zelllinie	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Kir 6.1 Forward Primer	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
Kir 6.1 Reverse Primer	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
Lucifer Yellow CH, Lithium Salt, 25 mg	Invitrogen™ AG, Carlsbad, US
Luna® Universal qPCR Master Mix	New England Biolabs® GmbH, Massachusetts, US
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
Natriumdihydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Nuklease-freies, autoklaviertes, Diethyl-dicarbonat-behandeltes Wasser	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Penicillin-Streptomycin, steril filtriert, 10000 Einheiten Penicillin, 10 mg/mL Streptomycin, 0,9% NaCl	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
peqGOLD Universal Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
1 × Phosphatgepufferte Salzlösung	Hergestellt aus der 10 × Stammlösung
ROTI® Gel-Stain	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
ROTI® Nukleinsäurefrei, 500 ml, Sprayfl.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE

Salzsäure (HCl), 36%	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
SLC5A1 Forward Primer	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
SLC5A1 Reverse Primer	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
Sulforhodamine 101 (SR-101)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
TAS1R3 Forward Primer	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
TAS1R3 Reverse Primer	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
Thiazolylblau, $\geq 98\%$, für die Biochemie	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Acetat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
1 $\times$ Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)	Hergestellt aus der 50 $\times$ Stammlösung
Trypanblau Lösung, 0.4%, steril filtriert, flüssig	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
Trypsin-EDTA Lösung, steril filtriert	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE

Tabelle 5: Süßstoffe und Zucker

Produkt	Hersteller
Neohesperidin-Dihydrochalcon	Symrise AG, Holzminden, DE
Rebaudiosid M	Symrise AG, Holzminden, DE
Sucralose	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
Sucrose	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE

Tabelle 6: Kits

Produkt	Hersteller
LunaScript™ RT SuperMix Kit	New England Biolabs® GmbH, Massachusetts, US
Monarch® Total RNA Miniprep Kit	New England Biolabs® GmbH, Massachusetts, US
PureLink™ Quick PCR Purification Kit	Invitrogen™ AG, Carlsbad, US

4.1.3 Zusammensetzung der Lösungen

Tabelle 7: 10 × PBS

Chemikalie	Menge [g/500 mL]
KCl	1.0064
KH ₂ PO ₄	1.3609
NaCl	40.0314
Na ₂ HPO ₄	7.098

Tabelle 8: MTT Reagenz

Chemikalie	Menge
Thiazolylblau	250 mg
PBS	50 mL

Tabelle 9: HEPES gepufferte HBSS-Lösung

Chemikalie	Menge
HBSS	49 mL
HEPES	1 mL

Tabelle 10: 50 × TAE

Chemikalie	Menge
0.5 M EDTA	100 mL
TRIS-Acetat	242.3 g
Essigsäure	57.2 mL
pH 8.2 – 8.4	

Tabelle 11: DAPI/SR-101 Lösung

Chemikalie	Konzentration
TRIS-Acetat	200 mM
NaCl	200 mM
DAPI	8 μ M
SR-101	50 μ M
pH 7.6	

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur CaCo-2

Die CaCo-2 Zelllinie wurde in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), welches mit 10% FBS, 2% stabilen L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin (Pen./Strep.) angereichert war, bei 37°C und 5% CO₂ in einem befeuchteten Inkubator kultiviert. Sowohl die Kultivierung als auch das Passagieren und der Mediumwechsel der Zellen fanden unter sterilen Bedingungen statt. Der Mediumwechsel erfolgte je nach Bedarf, spätestens aber nach vier Tagen. Zum Feststellen von möglichen Kontaminationen oder Ablösen der Zellen wurde die Zellkultur täglich makro- und mikroskopisch begutachtet. Aufgrund des Nährstoffverbrauchs und der damit verbundenen Bildung von pH senkenden Stoffwechselprodukten oder aufgrund einer bakteriellen Kontamination konnte sich der pH-Wert des Mediums mit der Zeit in den sauren Bereich verschieben. Da zu hohe Konzentrationen dieser Stoffwechselprodukte toxisch sind, wurde zur optischen Kontrolle des pH-Wertes und somit der Wachstumsbedingungen der Zellen der, im DMEM enthaltene, pH-Indikator Phenolrot verwendet. Durch einen Farbumschlag von magenta nach gelb zeigte der Indikator eine zunehmende Ansäuerung des Mediums an und signalisierte damit einen notwendigen Mediumwechsel. Kam es zu einer Verschiebung des pH-Wertes in den basischen Bereich, so ändert sich die Farbe von magenta nach rotviolett (Jawetz, Melnik, und Adelberg, 2013).

4.2.1.1 Auftauen der CaCo-2 Zellen

Die aliquotierten, gefrorenen CaCo-2 Zellen wurden in flüssigem Stickstoff bei -196°C bis zur Verwendung gelagert. Bei Bedarf wurden die cryokonservierten Zellen entnommen und im 37°C warmen Wasserbad so schnell wie möglich unter kontinuierlichem Schwenken aufgetaut, da im Cryoröhrchen 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) enthalten war, welches in der zugesetzten Konzentration für die Zellen bei 37°C toxisch ist. Um die zytotoxische Wirkung von DMSO zu umgehen, wurde unmittelbar nach dem Auftauen der DMSO-Gehalt auf 1% verdünnt, indem 1 mL der Zellen zu 9 mL Medium zupipettiert wurden. Anschließend wurde für zehn Minuten bei 25°C und 110 × g zentrifugiert, um nachfolgend den Überstand zu verwerfen. Das Zellpellet wurde in frischem Nährmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Im Anschluss erfolgte eine Kultivierung der Zellsuspension bei 37°C und 5% CO₂ im befeuchteten Inkubator.

4.2.1.2 Passagieren der CaCo-2 Zellen

Für das Passagieren der CaCo-2 Zellen sollte eine 80 – 90%-ige Konfluenz in der Zellkulturflasche festgestellt werden. Kurz vor der Verwendung wurden alle benötigten Reagenzien bei 37°C aufgewärmt oder bei Raumtemperatur aufgetaut. Damit eine Inaktivierung des Trypsins durch Selbstverdau vermieden werden konnte, erfolgte nur eine kurze Erwärmung des Trypsins. Nach dem Erreichen der Konfluenz wurde das alte Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt und die adhärenenten Zellen mit 5 mL einer sterilen phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) gewaschen, um alle Mediumreste zu entfernen. Nach dem Absaugen des PBS, erfolgte eine Zugabe von 0.5 - 2.5 mL Trypsin, abhängig von der Größe der Zellkulturflasche, wodurch alle Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst wurden. Es wurde vorsichtig geschwenkt, sodass die Zellen gleichmäßig mit Trypsin benetzt wurden und anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C. Durch Klopfen der Flasche und anschließender Begutachtung unter dem Mikroskop konnte die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden überprüft werden. Nach einer Einwirkzeit von fünf Minuten wurde die enzymatische Reaktion durch die Zugabe von 2 - 7.5 mL frischem Nährmedium gestoppt. Mittels mehrmaligem Auf- und Abpipettieren mit einer serologischen Pipette wurde die Zellkulturflasche abgespült und die Zellen dadurch vereinzelt. Nach dem Überführen der Zellsuspension in ein 50 mL Reaktionsgefäß wurde mit einer 1000 µL Pipette erneut rund zehnmal auf- und abpipettiert. Die Zellen wurden jeweils bis zu der Passagennummer 25 weitergeführt.

4.2.1.3 Ausstreuen der CaCo-2 Zellen

Die Zellzahl der, gemäß Abschnitt 4.2.1.2, geernteten Zellen wurde mit Hilfe einer Neubauer® improved bright-line Zählkammer (0.1 mm Tiefe, 0.0025 mm²) bestimmt. Um tote Zellen pink anzufärben und alle lebenden Zellen auszuzählen, wurde ein 20 µL Aliquot der Zellsuspension entnommen und in einem Reaktionsgefäß mit 80 µL Erythrosin B (0.1%) vermischt. Die kolorierte Zellsuspension wurde in die Zählkammer pipettiert und im Anschluss wurden die ungefärbten lebenden Zellen pro Großquadrat unter dem Mikroskop bestimmt. Als Kontrolle konnten die rötlichen, toten Zellen in den vier Großquadraten ebenfalls ermittelt werden. Die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension wurde durch die Multiplikation des Mittelwertes der Zellen pro Großquadrat mit dem Verdünnungsfaktor 5 und dem Zählkammerfaktor 10⁴ berechnet. Je nach durchzuführendem Versuch wurden 12-Well-Platten, 24-Well-Platten oder 96-Well-Platten mit der verdünnten Zellsuspension ausgestreut, so dass sich etwa $2 \cdot 10^5$ Zellen/cm² in jedem Well befanden.

Diese wurden anschließend für zwei Tage bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Nach zwei Tagen wurden die CaCo-2 Zellen im restlichen Zeitraum von 19 Tagen ausdifferenziert, wobei alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt wurde. Dieses Medium enthielt entweder ein kalorisches Süßungsmittel, ein nicht kalorisches Süßungsmittel oder keinen Zusatz. Zusätzlich wurde eine 0,1% DMSO-Kontrolle (K_{DMSO}) getestet, um zytotoxische Effekte des Lösungsmittels ausschließen zu können. Die vier verwendeten süß-schmeckenden Verbindungen NHDC, Reb M, Sucralose und Sucrose wurden in den jeweils angegebenen Konzentrationen, welche in Tabelle 12 aufgelistet sind, eingewogen, wobei zu Beginn von jeder Testsubstanz eine 1000-fach Stocklösung in DMSO hergestellt wurde. Sucrose wurde im Gegensatz zu den anderen Substanzen nicht in DMSO, sondern in serumfreiem Medium gelöst. Zum Weiterführen der Zelllinie wurden $(10/2^T)$ mL (T = Tage bis zum nächsten Passagieren) in eine Kulturflasche überführt, da sich CaCo-2 Zellen etwa alle 24 Stunden verdoppeln, und Nährmedium zugegeben, so dass sich insgesamt 40 mL der verdünnten Zellsuspension in einer 175 mL Zellkulturflasche befanden.

Tabelle 12: Süßstoffe und Zucker in den verwendeten Konzentrationen

Substanzen	Konzentration äquimolar [mM]	Konzentration äquisüß [mM]
NHDC	0.1	0.1
Reb M	0.1	0.2
Sucralose	0.1	0.2
Sucrose	0.1	150

4.2.1.4 Mykoplasmentest der CaCo-2 Zellen

Aufgrund der parasitären Eigenschaften und der guten Anpassung an Wirtszellen stellt die Kontamination der Zellkultur mit Mykoplasmen ein großes Problem der zellbiologischen Forschung dar, wobei Mykoplasmen die Physiologie der Zellen beeinflussen und verändern können (Drexler und Uphoff, 2002). Mykoplasmen können unbemerkt über längere Zeiträume sowohl intra- als auch extrazellulär in Kulturen überdauern und weisen, aufgrund der Tatsache, dass Mykoplasmen keine Zellwand besitzen, Resistenzen gegen zahlreiche Antibiotika auf. Da davon ausgegangen wird, dass etwa 30% der Zellkulturen mit Mykoplasmen kontaminiert sind, ist es empfehlenswert, Zellkulturen regelmäßig auf Kontaminationen mit Mykoplasmen zu überprüfen (Drexler und Uphoff, 2002). Der Nachweis von Mykoplasmen kann durch eine Färbung mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) und Sulforhodamine 101 (SR-101) erfolgen. Das DNA-spezifische Fluorochrom DAPI kann zur Färbung der nuklearen DNA herangezogen werden, während das Protein-spezifische Fluorochrom zur Färbung der zellulären Proteine verwendet werden kann (Ulrich, 1992). Die Zytoplasmaproteine wurden durch SR-101 rötlich gefärbt, während die DNA durch die DAPI-Färbung anhand der blauen Kolorierung nachweisbar wurde. Bei Vorliegen einer Kontamination mit Mykoplasmen wären zusätzlich zu den blau gefärbten Zellkernen kleine blaue Punkte im Zytoplasma rund um den Zellkern erkennbar (Gstraunthaler und Lindl, 2013).

Für die Färbung wurden die CaCo-2 Zellen mit einer Zellzahl von $3,64 \cdot 10^5$ in einer 24-Well-Platte ausgestreut und für 21 Tage ausdifferenziert, wobei alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel erfolgte. Nach der Kultivierung wurden die Zellen zweimal mit 500 μ L PBS gewaschen und für 30 Minuten mit 4%-igem Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal mit 500 μ L PBS gewaschen. Nachfolgend wurden 26 μ L der DAPI/SR-101 Lösung auf die Zellen getropft, wobei alle Zellen bedeckt sein mussten. Vor der Aufnahme der Bilder mit einer $20 \times$ Vergrößerung auf dem EVOS[®] FL Fluoreszenzmikroskop wurde die Färbelösung entfernt und die Zellen darauffolgend zweimal mit 500 μ L PBS abgespült. Die Zellkerne wurden durch einen DAPI-Filter begutachtet, während zelluläre Proteine mit einem Cy5-Filter betrachtet werden konnten.

4.2.2 Zellkultur HT29-MTX-E12

Die HT29-MTX-E12 Zelllinie wurde, analog der CaCo-2 Zelllinie aus Kapitel 4.2.1, in DMEM, welches mit 10% FBS, 2% stabilen L-Glutamin und 1% Pen./Strep. angereichert war, bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Gemäß der CaCo-2 Zelllinie erfolgte die Kultivierung, das Passagieren und der Medienwechsel unter sterilen Bedingungen, wobei das Medium spätestens nach vier Tagen gewechselt wurde. Die Zellkultur wurde täglich makro- und mikroskopisch begutachtet, um mögliche Veränderungen detektieren zu können.

4.2.2.1 Auftauen der HT29-MTX-E12 Zellen

Die Lagerung der HT29-MTX-E12 Zellen erfolgte bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff bei -196°C. Bei Bedarf wurden die cryokonservierten Zellen entnommen und kongruent den CaCo-2 Zellen aufgetaut, wobei nach der Zugabe von 9 mL Medium für sieben Minuten bei 25°C und 120 × g zentrifugiert wurde. Das Zellpellet wurde in frischem Nährmedium durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt, in eine Zellkulturflasche überführt und bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

4.2.2.2 Passagieren der HT29-MTX-E12 Zellen

Zum Passagieren der HT29-MTX-E12 Zellen sollte eine 70 – 80%-ige Konfluenz in der Zellkulturflasche vorliegen. Die Arbeitsschritte des Passagierens der HT29-MTX-E12 Zellen erfolgten analog jener der CaCo-2 Zelllinie aus Kapitel 4.2.1.2. Die Zellen wurden jeweils zwischen Passagennummer 51 bis 66 für die nachfolgenden Versuche verwendet.

4.2.2.3 Ausstreuen der HT29-MTX-E12 Zellen

Die Zellzahl der, gemäß Abschnitt 4.2.2.2, erhaltenen Zellen wurde entsprechend Kapitel 4.2.1.3 bestimmt, wobei Trypanblau (0.4%) für die Färbung eingesetzt wurde. Für den prospektiven Versuch wurden 24-Well-Platten mit der verdünnten Zellsuspension ausgestreut, so dass sich etwa 2×10^5 Zellen/cm² in jedem Well befanden. Die Zellen wurden nachfolgend für einen Zeitraum von 21 Tagen ausdifferenziert. Während der Differenzierung wurde alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel mit unsubstituiertem Medium durchgeführt. Zum Weiterführen der Zelllinie wurden $(10/2^T)$ mL (T= Tage bis zum nächsten Passagieren) in eine Kulturflasche überführt und Nährmedium zugegeben, so dass sich insgesamt 40 mL Zellsuspension in einer 175 mL Zellkulturflasche befanden.

4.2.2.4 Mykoplasmentest der HT29-MTX-E12 Zellen

Analog zu Kapitel 4.2.1.4 erfolgte der Nachweis von Mykoplasmen in HT29-MTX-E12 Zellen durch eine DNA beziehungsweise Protein Fluorochrom Färbung mittels DAPI und SR-101.

4.2.3 Cokultur aus HT29-MTX-E12 und CaCo-2 Zellen

4.2.3.1 Ausstreuen der Cokultur aus HT29-MTX-E12 und CaCo-2 Zellen

Die trypsinisierten Zellen der HT29-MTX-E12 und CaCo-2 Zelllinie wurden für die Cokultur in einem Verhältnis von neun Teilen CaCo-2 Zellen und einem Teil HT29-MTX-E12 Zellen, jeweils bezogen auf die benötigte Gesamtzellzahl, in die Wells pipettiert. Dabei wurden, abhängig vom durchzuführenden Versuch, 12-Well-Platten, 24-Well-Platten oder 96-Well-Platten mit einer Suspension aus HT29-MTX-E12 Zellen, CaCo-2 Zellen und Medium ausgestreut, so dass sich etwa $2 \cdot 10^5$ Zellen/cm² in jedem Well befanden. Nach zwei Tagen wurde die Cokultur analog den CaCo-2 Zellen aus Kapitel 4.2.1.3 im restlichen Zeitraum von 19 Tagen unter Zusatz von, in Tabelle 12 angegebenen, süßschmeckenden Verbindungen, Medium oder DMSO ausdifferenziert, wobei alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt wurde. Bei jedem Versuch erfolgten mindestens drei biologischen Replikate.

4.2.4 Transepitheliale elektrische Widerstandsmessung

Das Kultivieren von Zellen auf einer porösen Membran verbessert die Qualität der Nachahmung von *in vivo* ähnlichen Bedingungen, indem es die Diffusion zwischen dem apikalen und basolateralen Kompartiment ermöglicht. Dadurch wird die Zelldifferenzierung gefördert und die morphologische sowie funktionelle Ähnlichkeit mit dem nativen Gewebe erhöht (Zegers u. a., 2003). Die Messung des TEER-Wertes wird verwendet, um die Barrierefunktion von Zellen auf den porösen Transwell-Inserts zu bewerten. Bei der Beurteilung der elektrischen Impedanz fließt ein kontinuierlicher Strom über die Zellen, sowohl auf transzellulären als auch auf parazellulären Wegen (Powell, 1981). Der transzelluläre Widerstand besteht hauptsächlich aus der apikalen und basolateralen Plasmamembran, während der parazelluläre Widerstand auf Zell-Zell-Kontakte zurückzuführen ist. Es ist bekannt, dass spezifische Tight Junction-Proteine die Epithelresistenz stark beeinflussen (Lo, Keese, und Giaever, 1999; Anderson, 2001). Daher spiegeln die gemessenen TEER-Werte physikalische Strukturen und Eigenschaften von membrangewachsenen Epithelkulturen wider. Bisher wurde die TEER-Messung hauptsächlich zur Beurteilung der Permeabilität von Tight Junctions oder Störungen der Membran durch Giftstoffe auf Darm- und Nierenepithelzelllinien angewendet (Narai, Arai, und Shimizu, 1997; Velarde u. a., 1999; Madgula u. a., 2007).

Für die TEER-Messungen wurden sowohl CaCo-2 Zellen als auch Zellen der Cokultur mit einer Gesamtzellzahl von 8.9×10^5 in Zellkultur Transwell-Inserts für 6-Well-Platten beziehungsweise einer Gesamtzellzahl von 6×10^4 in Zellkultur Transwell-Inserts für 24-Well-Platten ausgestreut. Die TEER-Werte der 6-Well-Platten Inserts wurden anschließend routinemäßig vor jeder Fütterung dreimal pro Woche mittels eines Voltohmmeters gemessen. Um einen Temperatureinfluss des Mediums auf die Messwerte des Monolayers zu verhindern, erfolgte die Messung innerhalb von fünf Minuten nach Herausnehmen der Zellkulturplatten aus dem Inkubator. Das Transwell-Insert wurde in die mit Medium befüllte, gesäuberte Messvorrichtung überführt und der ohmsche Widerstand ermittelt. Parallel dazu wurde der ohmsche Widerstand eines Blank-Wertes, bei welchem ein Transwell-Insert ohne Zellen in die Messvorrichtung gelegt wurde, gemessen. Die Bestimmung der TEER-Werte in den 24-Well Transwell-Inserts erfolgte mittels der Chopstick Elektrode direkt in der Platte. Um den Probenwiderstand zu erhalten und somit auf die Konfluenz zu schließen, wurde der Blank-Wert vom Gesamtwiderstand der Probe abgezogen. Der endgültige Flächenwiderstand (Ωcm^2) wurde berechnet, indem der Probenwiderstand mit der effektiven Fläche der Membran multipliziert wurde. Diese betrug 0.3 cm^2 für Transwell-Inserts bei 24-Well-Platten beziehungsweise $4,5\text{ cm}^2$ für Transwell-Inserts bei 6-Well-Platten. Bei diesem Versuch wurden jeweils fünf biologische Replikate durchgeführt.

4.2.5 Permeabilitätstest zur Überprüfung der Integrität des Zellmonolayers

Die Integrität der Tight Junctions und die Permeabilität des Zellmonolayers können neben der TEER-Messung auch durch den passiven Transport kleiner hydrophiler Moleküle über die Monoschicht detektiert werden. Diese hydrophilen Verbindungen passieren den Monolayer vorwiegend passiv über den parazellulären Weg, der durch Tight Junctions gebildet und kontrolliert wird. Demzufolge können diese Verbindungen verwendet werden, um Informationen über die Dichtigkeit der Tight Junctions zu erhalten. Ein leicht nachweisbarer Marker ist Lucifer Yellow (LY), welcher nicht von Epithelzellen absorbiert wird und für die Bewertung der parazellulären Permeabilität von der apikalen Seite des Monolayers zur basolateralen Seite verwendet werden kann (Hossain und Takahashi, 2008; Lea, 2015; Ferraretto u. a., 2018).

Für den Permeabilitätstest wurden sowohl CaCo-2 Zellen, HT29-MTX-E12 Zellen als auch eine Kombination der beiden Zelllinien aus neun Teilen CaCo-2 und einem Teil HT29-MTX-E12 mit einer Gesamtzellzahl von 6×10^4 in Zellkultur Transwell-Inserts für

24-Well-Platten analog Kapitel 4.2.1.3 und 4.2.3.1 ausgestreut. Alle zwei bis drei Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, zudem erfolgte ein erneuter Mediumwechsel der Transwell-Inserts zwei Stunden vor dem Permeabilitätstest. Da die Temperatur bei diesem Experiment eine entscheidende Rolle spielte, wurden die Multi-Well-Platten während des gesamten Versuchs auf einer konstanten Temperatur von 37°C gehalten. Die LY-Stocklösung wurde unmittelbar vor dem Experiment mit HEPES gepufferter HBSS-Lösung auf eine Endkonzentration von 100 μM verdünnt. Vor dem Versuch erfolgte eine Messung der TEER-Werte mittels einer Chopstick Elektrode gemäß Kapitel 4.2.4. Um alle Mediumreste zu entfernen, wurden die Transwell-Inserts zweimal mit 0.5 mL einer vorgewärmten, HEPES gepufferten HBSS-Lösung gewaschen. Anschließend wurden 0.5 mL LY-Arbeitslösung in das Transwell-Insert auf die apikale Seite des Monolayers und 1.2 mL vorgewärmte, HEPES gepufferte HBSS-Lösung in das basolaterale Well pipettiert. Die Multi-Well-Platten wurden im Anschluss auf einen Orbitalschüttler gestellt, wobei nach 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten eine 0.5 mL Probe von der basolateralen Seite entnommen wurde und durch 0.5 mL einer vorgewärmten, HEPES gepufferten HBSS-Lösung ersetzt wurde (Lea, 2015).

Während dieser Inkubationszeit mit LY wurden ausgehend von einer 100 μM LY-Arbeitslösung, Verdünnungen für eine Standardgerade vorbereitet, wobei dafür Konzentrationen zwischen 0.00375 μM und 75 μM gewählt wurden. Nach der letzten Probenentnahme wurden jeweils 200 μL der Verdünnungen der Standardgeraden, sowie 200 μL der entnommen Proben nach 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten in Duplikaten in eine 96-Well-Platte pipettiert. Die fluorometrische Messung erfolgte am Tecan Infinite® Plattenlesegerät bei einer Anregungswellenlänge von 428 nm und einer Emissionswellenlänge von 536 nm. Während der fluorometrischen Messung wurde die Integrität des Monolayers erneut mittels TEER-Messung überprüft, wobei eine Abnahme der TEER-Werte um > 25% im Vergleich zur anfänglichen TEER-Messung als Indikator für den Verlust des Monolayers herangezogen wurde. Wurde eine Reduktion des TEER-Wertes von mehr als 25% im Vergleich zur initialen TEER-Messung verzeichnet, so wurden die Ergebnisse des Permeabilitätstests für dieses Transwell-Insert verworfen (Pontier u. a., 2001). Ausgehend von den Ergebnissen der fluorometrischen Messung konnte mit den nachfolgenden Formeln die parazelluläre Permeabilität, ausgedrückt als %LY_{basal}, und der Permeabilitätskoeffizient P_{app} , berechnet werden. Bei diesem Versuch wurden fünf biologische Replikate durchgeführt.

Formel 1: Parazelluläre Permeabilität

$$\%LY_{\text{basal}} = 100 * \frac{LY_t}{LY_0}$$

LY_t steht für die LY-Konzentration in der basolateralen Kammer nach einer bestimmten Inkubationszeit ($t = 15, 30, 60, 90$ oder 120 Minuten), LY_0 ist die Konzentration der LY-Arbeitslösung in der apikalen Kammer am Beginn der 120-minütigen Inkubation ($100 \mu\text{M}$).

Formel 2: Permeabilitätskoeffizient

$$P_{\text{app}} \left(\frac{\text{cm}}{\text{s}} \right) = \frac{1}{F * C_0} * \frac{dQ_t}{dt}$$

Die Abkürzung F steht für die Fläche der Transwell-Insert Membran (0.3 cm^2), C_0 ist die Anfangskonzentration der LY-Arbeitslösung im apikalen Kompartiment ($100 \mu\text{M}$), $\frac{dQ_t}{dt}$ repräsentiert die Flussrate über den Monolayer und gibt die Anzahl der LY-Moleküle, die in einer gewissen Zeitperiode ($t = 15, 30, 60, 90$ oder 120 Minuten) von der apikalen auf die basolaterale Seite transportiert wurden, an ($\frac{\mu\text{mol}}{\text{s}}$).

4.2.6 Alcianblau Färbung von Mucus-produzierenden Becherzellen

Aufgrund der Eigenschaft von Alcianblau, in sauren Lösungen ($\text{pH} \sim 2,5$) die carboxylierten und sulfatierten Proteoglykane, nicht aber Nukleinsäuren, selektiv zu färben, bietet sich dieser Farbstoff für die Färbung von Mucosubstanzen an (Böck, 1984). Kommt es zu einem Kontakt des Farbstoffes mit Mucin-Glykoproteinen, so kann eine Salzbindung ausgebildet werden, welche eine tiefblaue Farbe zeigt (Pan u. a., 2015). Um die Schleimproduktion von HT29-MTX-E12 Zellen zu untersuchen wurden HT29-MTX-E12 Zellen sowohl in einer Monokultur als auch in einer Cokultur mit CaCo-2 Zellen mit einer anfänglichen Zelldichte von $3,64 * 10^5$, analog Kapitel 4.2.1.3 und 4.2.3.1, auf Deckgläsern in einer 24-Well-Platte in Duplikaten ausgestreut. Nach einer Kultivierung für 14 beziehungsweise 21 Tage wurde das Zellkulturmedium verworfen und die Zellen zweimal mit $500 \mu\text{L}$ PBS gewaschen (Chen, Elisia, und Kitts, 2010). Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten mit 4%-igem Formaldehyd fixiert. Nach erneutem, zweimaligem Waschen mit $500 \mu\text{L}$ PBS wurden $500 \mu\text{L}$ einer 0.1%-igen Salzsäure zugegeben, wodurch

der pH-Wert der Zellen verringert wurde. Anschließend wurden 500 μL des, in 3%-iger Essigsäure gelösten, 1%-igen Alcianblaus mit einem pH-Wert von 2,5 zugegeben, um den Schleim für 30 Minuten bei 25°C zu färben. Vor der Aufnahme der Bilder mittels einer 12 Megapixel Dualkamera durch das IT400 Trino Durchlichtmikroskop wurde noch zweimal mit 500 μL PBS gewaschen (Pan u. a., 2015; Strugari u. a., 2018).

4.2.7 MTT-Test zur Bestimmung der Zellvitalität

Um den Einfluss der zugesetzten Substanzen auf die metabolische Aktivität der Zellen und somit deren Zellvitalität festzustellen, wurde ein MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) Test durchgeführt. Das Prinzip des MTT-Tests beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes, welches leicht von Zellen aufgenommen werden kann, zu violetten, wasserunlöslichen Formazankristallen durch den aktiven Zellmetabolismus (Morgan, 1998; Stockert u. a., 2018). Die zelluläre Bio-reduktion des MTT passiert zum Großteil außerhalb der Mitochondrien unter der Beteiligung von Enzymen des ER und der reduzierenden Pyridinnukleotid-Cofaktoren Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) und zu einem geringen Anteil auch durch Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) (M. V. Berridge u. a., 1993; M. V. Berridge und Tan, 1993). Diese Umwandlung von MTT zu Formazan ist schematisch in Abbildung 9 dargestellt. Die Menge des gebildeten Formazans kann nach dem Lösen in DMSO spektrophotometrisch bei einem Absorptionsmaximum von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm gemessen werden. Der Absorptionswert ist direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen und kann Auskunft über das Ausmaß der Zellschädigung und Zytotoxizität der, während der Differenzierung zugesetzten, Testsubstanzen geben. Dies beruht auf der Tatsache, dass Zellen, welche aufgrund einer Substanztoxizität absterben, die Fähigkeit verlieren MTT umzuwandeln, wodurch die Bildung von Formazan ein guter Marker für Zellviabilität ist (Morgan, 1998; Riss u. a., 2004).

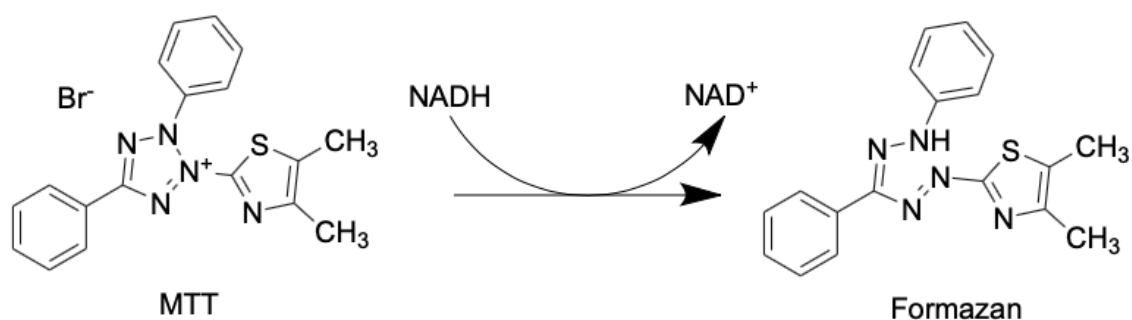


Abbildung 9: Umwandlung von MTT zu Formazan mit Hilfe von NADH.

Die CaCo-2 Zellen, sowie die Zellen der Cokultur wurden, wie in Kapitel 4.2.1.3 und 4.2.3.1 beschrieben, mit einer Gesamtzellzahl von 2.16×10^6 in einer 96-Well-Platte ausgestreut und für 21 Tage unter Behandlung mit vier unterschiedlichen Substanzen in zwei verschiedenen Konzentrationen ausdifferenziert. Zusätzlich wurden zur Kontrolle Zellen einerseits mit Medium und andererseits mit DMSO (Medium + 0.1% DMSO) versetzt. Das Medium wurde nach der 21-tägigen Kultivierung abgesaugt und 100 μ L MTT Arbeitslösung, bestehend aus einem Teil MTT Stammlösung und fünf Teilen serumfreiem Medium, hinzupipettiert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation für rund fünf Minuten, worauf nachfolgend das MTT Reagenz vollständig abgesaugt wurde. Nach der raschen Zugabe von 150 μ L DMSO konnte die Absorption bei 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm am Tecan Infinite® Plattenlesegerät gemessen werden. Dieser Versuch zur Bestimmung der Zellvitalität wurde an mindestens vier biologischen Replikaten wiederholt.

4.2.8 Isolierung der RNA

Die Isolierung von RNA ist im Allgemeinen der erste Schritt bei der Analyse der Genexpression, da nur jene Gene, welche zum Zeitpunkt der Isolierung in der Zelle exprimiert werden, als RNA vorliegen (Sivakumar, Franco, und Thayumanavan, 2007). Die Gewinnung großer Mengen an RNA ist ein schwieriger Prozess, da ein wirksames Verfahren zum Aufbrechen von Zellen und ein Aufreinigungsverfahren, welches die Nukleinsäuren von anderen Zellkomponenten trennt, benötigt werden. Für die Vermeidung des Abbaus oder der Denaturierung der empfindlichen RNA muss diese von Nukleasen, starken mechanischen Kräften, hohen Temperaturen und extremen pH- und Ionenstärken geschützt werden (Poulson, 1973). Um die oben genannten Kriterien zu erfüllen wurde zur RNA Isolierung das *Monarch® Total RNA Miniprep Kit* von New England Biolabs® GmbH eingesetzt („Manual Monarch Total RNA Mini Prep Kit“, 2020). Dabei wurden die Zellen lysiert, die genomische DNA (gDNA) entfernt und die gesamte RNA aus einer Vielzahl von biologischen Proben aufgereinigt. Die aufgereinigte RNA wurde im Anschluss für die quantitative real-time PCR-Analyse (qRT-PCR) verwendet. Die RNA-Isolierung erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers nach dem nachfolgenden Schema, wobei die Zentrifugation zu allen Zeitpunkten bei $10.000 \times g$ und 25°C durchgeführt wurde.

Es wurde zu vier Zeitpunkten (vor dem Ausstreuen, nach 7-, 14- und 21-tägiger Inkubation) eine Probe von den, mit unterschiedlichen Testsubstanzen behandelten,

Zellen gezogen. Dafür wurden die Zellen aus jedem Well mit 500 μ L PBS gewaschen und anschließend mit 400 μ L DNA/RNA Protection Reagenz benetzt, die Zellen aus dem Well geschabt und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Bei Bedarf wurden diese aufgetaut und anschließend mit 400 μ L Lysepuffer versetzt. Das gesamte Volumen der Probe wurde in eine Säule mit passender Sammelröhre überführt, welche gDNA abfiltert. Nachdem für 30 Sekunden zentrifugiert wurde, wurde der Flow-Through mit einem äquivalenten Volumen an Ethanol ($\geq 95\%$) vermengt und mittels mehrmaligem Pipettieren gut vermischt. Das Gemisch wurde erneut in eine RNA Aufreinigungssäule mit passender Sammelröhre transferriert und für 30 Sekunden zentrifugiert, der gesammelte Flow-Through wurde verworfen. Um die verbleibende gDNA zu entfernen wurden 500 μ L RNA Waschpuffer auf die RNA Aufreinigungssäule pipettiert und für 30 Sekunden zentrifugiert, wobei der Flow-Through ebenfalls verworfen wurde. Währenddessen wurden in einem RNase-freien Mikroreaktionsgefäß 5 μ L DNase I und 75 μ L DNase I Reaktionspuffer vereinigt und im Anschluss in die Mitte der Säulenmatrix getropft. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei 25°C wurden 500 μ L RNA Priming Puffer auf die Säulenmatrix pipettiert und für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Flow-Through wurde im Anschluss verworfen, 500 μ L RNA Waschpuffer wurden auf die Säulenmatrix getropft und sukzedan wurde zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Flow-Through erneut verworfen und ein weiteres Mal wurden 500 μ L RNA Waschpuffer in die RNA Aufreinigungssäule zugegeben, wonach eine zweiminütige Zentrifugation erfolgte. Die Sammelröhre wurde in ein RNase-freies Reaktionsgefäß überführt und 50 μ L nukleasefreies Wasser wurden in die Mitte der Säule getropft. Nachfolgend wurde für 30 Sekunden zentrifugiert, um die RNA von der Säulenmatrix zu eluieren. Die RNA wurde dann bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt.

4.2.9 Bestimmung der RNA Konzentration

Die Konzentration der RNA, sowie deren Qualität wurde mittels des Monochromator-basierten Tecan Infinite® Plattenlesegerätes bestimmt. Bei der Spektralphotometrie wurde die optische Dichte bei dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, was einer Wellenlänge von 260 nm gleichkommt, gemessen. Dazu wurden 2 μ L der jeweiligen Probe in Duplikaten auf die NanoQuant® Platte des Lesegerätes revers pipettiert, wobei nukleasefreies Wasser als Leerwert diente. Als Referenzwellenlänge wurde bei einer Messung das Absorptionsmaximum von Proteinen gewählt, welches einer Wellenlänge von 280 nm entspricht und bei einer zweiten Messung eine Wellenlänge von 230 nm

verwendet, dessen Ratio mit 260 nm als Maß für organischen Verunreinigung fungiert (Bilgin, DeLucia, und Clough, 2009). Die Software i-controlTM ermittelte anhand dieser Wellenlängen die Konzentration [ng/μL] und die beiden Verhältnisse, die über die Qualität der Probe Aufschluss gaben. Das Ratio sollte bei A_{260}/A_{280} zwischen 1.8 und 2.0 sowie bei A_{260}/A_{230} über 2.0 liegen. Eine Ratio von A_{260}/A_{280} unter 1.8 deutet auf mögliche Verunreinigung durch Proteine, Phenole oder andere Kontaminaten, welche stark bei 280 nm absorbieren, hin (Arnemann, 2019), während ein niedriges Ratio von A_{260}/A_{230} auf Rückstände von Lösungsmittel oder chaotropen Salzen in der RNA Lösung deuten kann (Cirera, 2013).

Die isolierte RNA wurde im Anschluss direkt für das Umschreiben zu cDNA gemäß Kapitel 4.2.10 weiterverwendet.

4.2.10 cDNA Synthese

Mittels der reversen Transkriptase (RT) kann aus dem einzelsträngigen RNA Template stabilere komplementäre DNA (cDNA) hergestellt werden. RT sind RNA-abhängige 5'-3' DNA Polymerasen, welche bei einer Vielzahl von biologischen Prozessen eine Rolle spielen. Häufig handelt es sich bei den kommerziell erhältlichen RT um retrovirale RT, die aufgrund der bestehenden RNase H Aktivität die RNA während oder kurz nach der „Erst-Strang cDNA-Synthese“ degradieren. Da die RT keine 3'-5' Exonuklease-Aktivität besitzt, kommt es bei der Transkription im Vergleich zu DNA Polymerasen zu erhöhten Fehlerraten (Boone, De Koker, und Callewaert, 2018).

Die zuvor isolierte RNA wurde nach der Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des *LunaScriptTM RT SuperMix Kits* von New England Biolabs® in cDNA umgeschrieben und im Anschluss für eine qRT-PCR weiterverwendet („Protocol for LunaScript® RT SuperMix Kit (E3010) | NEB“, 2018). Dazu wurde der Mittelwert der Konzentrationen der beiden Duplikate, welche in Kapitel 4.2.9 durch die Software i-controlTM ermittelt wurden, berechnet und daraus die μL, die 1 μg Gesamt-RNA enthalten, kalkuliert. Aus der Differenz dieses Volumens und dem Gesamtvolumen von 16 μL konnte die, für das Kit benötigte, Menge an nukleasefreiem Wasser errechnet werden. Um ein Endvolumen von 20 μL zu erhalten, mussten 4 μL *LunaScriptTM RT SuperMix* hinzugefügt werden, welcher aufgrund eines enthaltenen RNase Inhibitors das RNA Template vor Degradierung durch RNasen schützte. Aus den berechneten Werten wurde das Reaktionsgemisch für die cDNA Synthese hergestellt (Tabelle 13), wobei eine

Kontrollreaktion ohne RT durchgeführt wurde (Tabelle 14). Final wurde die RNA im C1000 Touch™ in cDNA umgeschrieben, wobei das in Tabelle 15 angeführte Programm verwendet wurde.

Tabelle 13: Reaktionsgemisch für die cDNA Synthese

Komponente	20 µL Reaktion	Finale Konzentration
LunaScript™ RT SuperMix (5×)	4 µL	1×
RNA Probe	Variabel	1 µg
Nukleasefreies Wasser	Bis 20 µL	

Tabelle 14: Reaktionsgemisch für die Kontrollreaktion ohne RT

Komponente	20 µL Reaktion	Finale Konzentration
No-RT Control Mix (5×)	4 µL	1×
RNA Probe	Variabel	1 µg
Nukleasefreies Wasser	Bis 20 µL	

Tabelle 15: Thermal Cycler LunaScript™ Programm

Zyklusschritt	Temperatur	Zeit
Primer Annealing	25°C	2 Minuten
cDNA Synthese	55°C	10 Minuten
Hitze Inaktivierung	95°C	1 Minute

4.2.11 Primer Validierung

Mittels PrimerBank und Primer-BLAST wurden die in Tabelle 16 aufgelisteten, geeigneten Primer für das humane *TAS1R3*, *KCNJ8* und *ABCC8* Gen für die anschließende qRT-PCR ermittelt und subsektiv bestellt.

Tabelle 16: TAS1R3, KCNJ8 und ABCC8 Primer

Gen	Primer	Primer-Sequenz	Primer Länge	Schmelztemperatur	Produktgröße
<i>TAS1R3</i>	Forward Primer	CCGCAGTGTG ACTGCATCAC	20 bp	61.9 °C	90 bp
	Reverse Primer	CACGCTATACAC AGCTGCGTAGA	23 bp	62.61 °C	
<i>KCNJ8</i>	Forward Primer	AACCTGGCGCA TAAGAACATC	21 bp	58.98 °C	132 bp
	Reverse Primer	CCACATGATAG CGAAGAGCAG	21 bp	58.87 °C	
<i>ABCC8</i>	Forward Primer	GCAAGTCCTC GCTCCTTCTA	20 bp	59.18 °C	200 bp
	Reverse Primer	CTCCACAGTG GCATTTAGCA	20 bp	58.17 °C	

Damit eine ideale Primerkonzentration festgelegt werden konnte, wurden die Primer zu Beginn am StepOnePlus™ auf deren Effizienz getestet, wobei diese über 1.8 liegen sollte. Dafür wurde ein Reaktionsgemisch angesetzt, welches sich aus $2 \times$ Luna® Universal qRT-PCR Master Mix von New England Biolabs®, den jeweiligen Forward- und Reverse-Primern in Konzentrationen von 100 nM – 900 nM und nukleasefreiem Wasser zusammensetzte. Ein Aliquot von 29.7 µL dieses Gemisches wurde in ein Mikroreaktionsgefäß vorgelegt und 3.3 µL einer synthetisierten CaCo-2 cDNA zugegeben. Nach vorsichtigem Vermengen wurden 10 µL jeder Reaktionsmischung in Triplikaten auf die 96-Well-Platte pipettiert, mit einer Folie versiegelt, kurz zentrifugiert und darauffolgend das Programm in Tabelle 17 am StepOnePlus™ gestartet.

Tabelle 17: StepOnePlus™ Programm

Zyklusschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	1 Minute	1
Denaturierung	95°C	15 Sekunden	40-45
Verlängerung	60°C	30 Sekunden	
Schmelzkurve	60-95°C; 0.5°C Schritte	Variabel	1

Im nächsten Schritt wurde ein 3%-iges Agarose Gel aus 3.6 g Agarose und 120 mL $1 \times$ TAE-Puffer hergestellt. Diese Chemikalien wurden in einem Erlenmeyerkolben vermengt und der 250 mL Erlenmeyerkolben mit beinhalteter Mischung gewogen. Der Kolben wurde in der Mikrowelle solange erhitzt bis Blasenbildung detektiert werden konnte, wobei der Kolben zwischendurch immer wieder vorsichtig geschwenkt wurde. Im Anschluss wurde der Kolben, um ein konstantes TAE-Volumen zu gewährleisten, erneut gewogen und $1 \times$ TAE zugegeben, bis das ursprüngliche Gewicht eingestellt werden konnte. Nach dem Abkühlen des Kolbens auf Handwärme wurden 8 µL ROTI®-Gel-Stain zur Agarosemischung beigemengt, um die Banden im Anschluss sichtbar zu machen. Darauffolgend wurde die Mischung in die Gelkammer gegossen und eine Stunde zum Festigen des Gels stehen gelassen. War das Gel fest, so konnten die PCR-Proben mit $6 \times$ DNA Gel Ladepuffer vermengt und anschließend auf das Gel aufgetragen werden. Für einen Größenvergleich wurde die GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder auf das Gel

geladen. Nach drei Stunden bei 100 V und 200 mA wurde mittels des FUSION-FX7™ Imagers eine Aufnahme des Gels gemacht. Hatte das Produkt die gewünschte Größe aufgewiesen, wurde erneut eine PCR durchgeführt, wobei der *AmpliTaQ Gold™ 360 Master Mix*, ohne SYBR® Green Farbstoff, verwendet wurde. Das dafür angesetzte Reaktionsgemisch mit einem Volumen von 28 µL bestand aus $2 \times \text{AmpliTaQ Gold™ 360 Master Mix}$, Forward- und Reverse-Primer, nukleasefreiem Wasser und cDNA. Final wurde die PCR im C1000 Touch™ Thermal Cycler ausgeführt, wobei das aufgelistete Programm aus Tabelle 18 verwendet wurde.

Tabelle 18: Thermal Cycler AmpliTaq Gold™ Programm

Zyklusschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
AmpliTaQ Gold™ 360 Master Mix Aktivierung	95°C	10 Minuten	1
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	40
Primer Annealing	60°C	30 Sekunden	
Elongation	72°C	30 Sekunden	
Finale Extension	72°C	7 Minuten	1

Das erhaltene PCR-Produkt konnte nachfolgend mittels des *PureLink™ Quick PCR Purification Kits* aufgereinigt werden. Dafür wurde die, durch die PCR erhaltene, DNA mit vierfachem Volumen eines Bindepuffers mit zugesetztem Isopropanol vermischt und gut durchmischt. Hiernach wurde die gesamte Probe in eine PureLink® Spinsäule überführt und für eine Minute bei $10.000 \times g$ zentrifugiert. Der Flow-Through wurde verworfen und 650 µL Waschpuffer mit zugesetztem Ethanol auf die Spinsäule zugegeben. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei $10.000 \times g$ wurde der Flow-Through verworfen und die Spinsäule erneut bei $16.000 \times g$ für eine Minute zentrifugiert, um den Ethanol restlos zu entfernen. Nachfolgend wurde die Säule in ein Elutionsröhrchen gesteckt und 50 µL Elutionspuffer auf die Säule pipettiert. Im Anschluss an eine einminütige Inkubation bei 25°C wurde die Säule für zwei Minuten bei $16.000 \times g$ zentrifugiert. Die Konzentration des nun aufgereinigten PCR-Produktes wurde mittels des Tecan Infinite® Plattenlesegerätes für weitere Anwendungen bestimmt.

Für die Sanger Sequenzierung bei Eurofins Genomics musste die aufgereinigte Probe auf eine Endkonzentration von 1 ng/ μ L und einem Endvolumen von 15 μ L mit nukleasefreiem Wasser verdünnt werden. Die gesamte Reaktionsmischung wurde für jeden Primer jeweils in ein SuperLock Mikrozentrifugengefäß überführt. Weiters wurden von jedem Primer jeweils 15 μ L in ein SuperLock Mikrozentrifugengefäß pipettiert, wobei eine Primer-Endkonzentration von 10 pmol/ μ L vorliegen musste. Diese vier Mikrozentrifugengefäße wurden nach der Beschriftung und Beklebung mit Barcode Stickern zur Sequenzierung an Eurofins Genomics gesendet. Das durch die Sequenzierung erhaltene Ergebnis wurde anschließend mittels Nucleotide BLAST® überprüft, um festzustellen, ob das gewünschte Gen durch die erstellten Primer amplifiziert wurde.

4.2.12 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine *in vitro* Amplifikation von spezifischen Nukleinsäuresequenzen. Der Ablauf einer PCR wird grundsätzlich in drei Phasen unterteilt (1) Denaturierung der doppelsträngigen Template DNA, (2) Hybridisierung von sequenzspezifischen Oligonukleotiden an das komplementäre 3'-Ende der DNA Einzelstränge, (3) Elongation durch die DNA Polymerase ausgehend von den Primern, um die DNA zu vervielfältigen. Diese Schritte werden bis zu 30-mal wiederholt, um eine Vielzahl von DNA Kopien zu erzeugen, wobei sich die Anzahl der Kopien in jedem Zyklus verdoppelt (Karcher, 1995). Das Prinzip der in diesem Versuch verwendeten qRT-PCR beruht auf einer Vervielfältigung der ausgewählten DNA-Abschnitte und dem gleichzeitigen Einbau eines Fluoreszenzreporters in die neu synthetisierten Strängen bei jedem PCR Zyklus. Diese Echtzeitquantifizierung kann mittels Fluoreszenz-Messungen während des PCR Zykluses stattfinden, wobei die Detektion der Signalstärke des Fluorophors am Ende der Elongationphase erfolgt. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der amplifizierten PCR-Produkte zu, wodurch eine Aussage über die unterschiedliche Anzahl der in den Proben enthaltenen Templates getroffen werden kann. Daraus kann rückgeschlossen werden, wie viel RNA in den ursprünglichen, mit süß-schmeckenden Testsubstanzen behandelten, Zellen vorlag (Jia, 2012).

Für die Farbstoff-basierte qRT-PCR wurde mit dem *Luna® Universal qPCR Master Mix* von New England Biolabs® gearbeitet, welcher SYBR® Green als Fluoreszenzfarbstoff verwendet. SYBR® interkaliert nach jedem Zyklus in die doppelsträngige DNA (dsDNA) oder bindet an die kleine Furche der dsDNA und emittiert danach ein Fluoreszenzsignal

welches 1000-fach größer ist als jenes des ungebundenen SYBR® Green Farbstoffes. In jedem Zyklus werden dsDNA Amplikons mittels der *Taq* DNA Polymerase synthetisiert, an welche umgehend der SYBR® Green Farbstoff binden kann. Dadurch nimmt die Fluoreszenzsignalintensität zu, welche direkt proportional zur ansteigenden dsDNA ist. Dieses Detektionssystem ist nicht selektiv, wodurch falsch positive Ergebnisse aufgrund von Primerdimeren und unspezifischer Amplifikation auftreten können. Daher ist die Auswahl von Primern von großer Bedeutung für die Spezifität und Sensitivität dieser Methode (Mortarino u. a., 2004; Thornton und Basu, 2011). Ein zuverlässiger Primer für die qRT-PCR sollte absolute Spezifität aufweisen, weiters sollten keine Haarnadelstrukturen oder Dimerisierungspotentiale vorhanden sein und auch die Temperaturtoleranz ist von Relevanz (Bustin und Huggett, 2017).

Um die Spezifität der qRT-PCR und das Vorhandensein von Primerdimeren zu überprüfen wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Primerdimere können auftreten, wenn zwei PCR-Primer aneinander, anstatt an der Ziel cDNA binden, wobei diese bei der Schmelzkurvenanalyse eine niedrigere Schmelztemperatur aufweisen als das Amplikon (Varga und James, 2006). Die Schmelzkurvenanalyse basiert auf dem stetigen Erhitzen der Proben nach der qRT-PCR. Wenn die Temperatur langsam auf eine Maximaltemperatur von 95°C erhöht wird, beginnen die PCR Produkte zu denaturieren, wobei sich die beiden DNA-Stränge trennen und der SYBR® Green Farbstoff freigesetzt wird. Diese Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffes wird als Veränderung des Fluoreszenzsignals detektiert (Kouhpayeh u. a., 2017). Da jedes PCR-Produkt eine spezifische Schmelztemperatur aufweist, kann man eine erfolgreiche Amplifikation, welche nur einen Peak zeigen sollte, von unerwünschten Nebenprodukten unterscheiden.

Für diesen Versuch wurde die im vorangegangenen Schritt unspezifisch synthetisierte cDNA mit spezifischen Primern für *SLC2A2*, *SLC5A1*, *TASIR3* und *KCNJ8* als genes of interest und als Abgleich mit Primern gegen die, in allen Zellen exprimierte, Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als house-keeping Referenzgene analysiert. Hierzu wurde zu Beginn ein Reaktionsgemisch angesetzt, welches aus $2 \times$ Luna® Universal qPCR Master Mix, Forward- und Reverse-Primer und nukleasefreiem Wasser bestand. Die eingesetzten Primer-Konzentrationen können aus Tabelle 19 entnommen werden. Ein Volumen von 29.7 µL dieses Reaktionsgemisches wurde in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und 3.3 µL

der, wie in Kapitel 4.2.10 beschrieben, synthetisierten cDNA zugegeben. Als Negativkontrolle wurde anstelle von cDNA nukleasefreies Wasser zugegeben. Nach vorsichtigem Auf- und Abpipettieren wurden 10 µL jeder Reaktionsmischung in Triplikaten auf die 96-Well-Platte pipettiert und mit einer Folie versiegelt. Anschließend wurde kurz zentrifugiert und darauffolgend das Programm in Tabelle 17 am StepOnePlus™ gestartet. Mit dem, in Kapitel 4.2.11, entworfenen Primerpaar für das Gen *ABCC8*, welches für SUR1 codiert, konnte nicht weitergearbeitet werden, da nach der Optimierung der Konzentrationen des Primerpaares und des Reaktionsvolumens, der Anpassung der Annealing Temperatur und nach einer Sequenzierung keine eindeutig reproduzierbaren Ergebnisse vorlagen, die für die vollständige Validierung des Primerpaares benötigt worden wären.

Tabelle 19: Primer mit zugehörigen Konzentrationen

Primer	Konzentration [nM]
HPRT	100
GAPDH	200
SLC5A1	100
SLC2A2	100
TAS1R3	300
KCNJ8	100

4.2.13 Statistische Auswertung

Die Aufbereitung der Daten und deren statistische Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel Version 16.32 sowie dem Programm GraphPad Prism 8.

4.2.13.1 Transepitheliale elektrische Widerstandsmessung

Zur Auswertung der gemessenen TEER-Rohdaten wurde zu Beginn der erhaltene Blank-Wert des Transwell-Inserts ohne Zellmonolayer von den TEER-Daten abgezogen. Anschließend wurden die berechneten Daten mit der Fläche des Inserts multipliziert und der Mittelwert der Replikate berechnet. Mittels eines ROUT Tests wurden mögliche Ausreißer ausgeschlossen und mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse gefolgt von einem Tukey post-hoc Test wurde auf statistische Signifikanz getestet.

4.2.13.2 Permeabilitätstest

Aus den Rohdaten, die durch die Messung am Tecan Infinite® Plattenlesegerät erhalten wurden, konnte eine Standardgerade mit zugehöriger Trendlinien-Formel erstellt werden. Anschließend wurde die LY-Konzentration anhand dieser Formel für alle Proben zu jedem Zeitpunkt berechnet. Darauffolgend wurde die Konzentration von LY in 500 µL beziehungsweise 1.2 mL für jede Probe zu allen Zeitpunkten ermittelt. Nach der Berechnung der Gesamtkonzentration pro Sekunde konnten die erhaltenen Werte in Formel 1 beziehungsweise Formel 2 eingesetzt und der Permeabilitätskoeffizient sowie die parazelluläre Permeabilität kalkuliert werden. Mögliche Ausreißer wurden durch einen ROUT Test ausgeschlossen und die statistische Signifikanz durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von einem Tukey post-hoc Test eruiert.

4.2.13.3 MTT-Test

Für die Auswertung der MTT-Tests wurde zunächst der Blank-Wert von den ermittelten Rohdaten abgezogen. Nachfolgend wurden die erhaltenen Ergebnisse auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle, entweder DMSO oder Medium, bezogen und in Prozent angegeben, wobei mit Hilfe eines ROUT Tests mögliche Ausreißer ausgeschlossen werden konnten. Die statistische Signifikanz wurde sukzedan mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse gefolgt von einem Tukey post-hoc Test ermittelt. Der eruierte statistisch signifikante Unterschied wurde durch * $p < 0.05$ angegeben.

4.2.13.4 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion

Die durch den StepOnePlus™ erhaltenen Amplifikationsdaten wurden mit der Software LinRegPCR Version 2016.0 bearbeitet, wobei die Baseline und Effizienz-Ausreißer ermittelt wurden. Für die nachfolgende Auswertung wurden die, aus dem C_T -Wert, der mittleren PCR Effizienz und des N_T -Wert berechneten, N_0 -Werte herangezogen, welche die hypothetische Start-cDNA darstellten. Die erhaltenen N_0 -Werte der genes of interest wurden durch das geometrische Mittel der house-keeping Referenzgene *HPRT* und *GAPDH* normalisiert. Nachfolgend wurde die x-fache Änderung der Genexpression in Bezug auf den Mittelwert der undifferenzierten Probe und der Lösungsmittelkontrolle ermittelt. Im Anschluss wurden mögliche Ausreißer durch einen ROUT Test ausgeschlossen und die statistische Signifikanz der unterschiedlichen Behandlungen durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von einem Tukey post-hoc Test berechnet. Die statistisch signifikanten Unterschiede wurden mit * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ und **** $p < 0.0001$ markiert.

4. Ergebnisse

5.1 Transepitheliale elektrische Widerstandsmessung

Durch die Messung des TEER-Wertes konnte die Entwicklung der Barrierefunktion von CaCo-2 Zellen und HT29-MTX-E12 Zellen in der Monokultur und als Cokultur auf der porösen Transwell-Insert Membran über einen Zeitraum von drei Wochen erfasst werden. Die Ergebnisse der TEER-Messung innerhalb der dreiwöchigen Inkubation sind in Abbildung 10 illustriert.

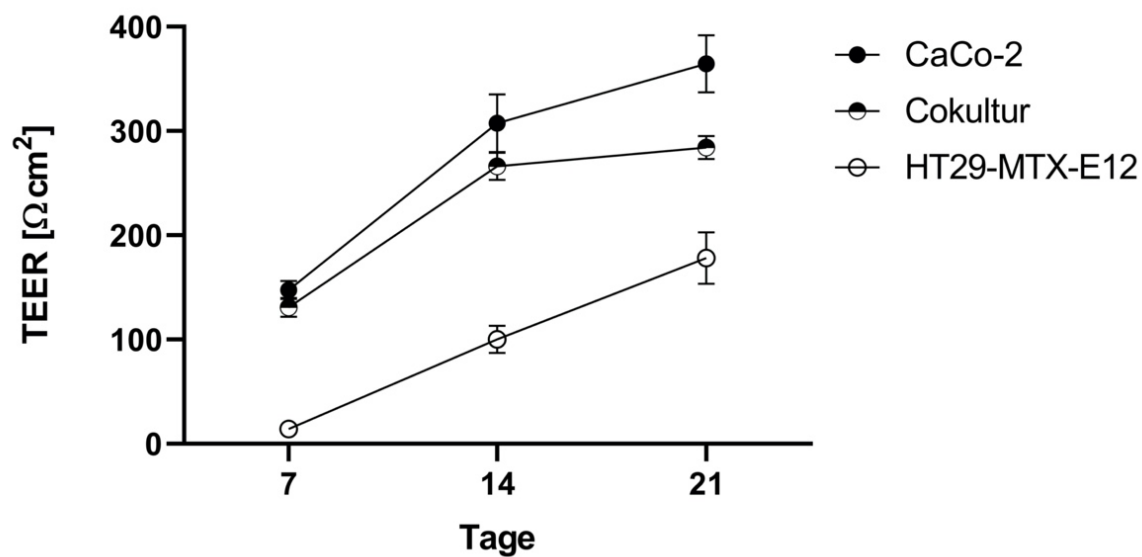


Abbildung 10: Entwicklung der Messwerte des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) [Ωcm^2] des Zellmonolayers der CaCo-2:HT29-MTX-E12 Zellkultur in den Konzentrationen: 1:0; 9:1 und 0:1. Die TEER-Werte wurden am Tag 7, 14 und 21 nach dem Ausstreuen ermittelt. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem CaCo-2 Modell und dem Cokultur Modell wurde durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse und anschließendem Tukey post-hoc Test ausgeschlossen ($p > 0.05$). Alle Werte sind als Mittelwerte $\pm$ SEM dargestellt ($n=10$).

Aus Abbildung 10 geht hervor, dass die TEER-Werte der CaCo-2 Monokultur, der HT29-MTX-E12 Monokultur und der Cokultur, mit steigender Kulturzeit zunahmen und in der CaCo-2 Monokultur am höchsten waren. Nach der 21-tägigen Inkubation der CaCo-2 Monokultur konnte ein TEER-Wert von $364.53 \pm 82.38 \Omega\text{cm}^2$ festgestellt werden, wodurch eine hohe Integrität und Konfluenz angezeigt wurde. Dabei betrug der TEER-Wert bereits nach 14 Tagen Inkubation $307.55 \pm 78.65 \Omega\text{cm}^2$ und lag somit über $250 \Omega\text{cm}^2$. Auch der TEER-Wert der Cokultur stieg ab Tag sieben der Kultivierung stark

an und betrug nach 14 Tagen bei $266.03 \pm 32.17 \Omega\text{cm}^2$. Nach 21 Tagen lag der TEER-Wert der CaCo-2 und HT29-MTX-E12 Cokultur bei $284.09 \pm 27.31 \Omega\text{cm}^2$ und somit niedriger als jener der CaCo-2 Monokultur. Wie erwartet zeigte die HT29-MTX-E12 Monokultur zwar einen konstanten Anstieg des TEER-Wertes, wobei dieser nach 21 Tagen dennoch nur einen Wert von $178.12 \pm 55.54 \Omega\text{cm}^2$ erreichte, was die geringere Anzahl an Tight Junctions im Vergleich zu CaCo-2 Zellen widerspiegelte. Die kontinuierliche Proliferation von Zellen kann die Integrität des Monolayers verbessern, wobei gezeigt wurde, dass sich mit zunehmendem Verhältnis der CaCo-2 Zellen die TEER-Werte erhöhten.

5.2 Permeabilitätstest zur Überprüfung der Integrität des Zellmonolayers

Die Integrität der Tight Junctions und die Entwicklung der Barrierefunktion des CaCo-2 und HT29-MTX-E12 Zellmonolayers in einer Monokultur und in der Cokultur wurden neben der TEER-Messung auch durch den Permeabilitätstest mittels Lucifer Yellow (LY) untersucht. Alle Ergebnisse des Permeabilitätstests mittels LY nach 7, 14 und 21 Tagen sind in Abbildung 11 und Abbildung 12 abgebildet.

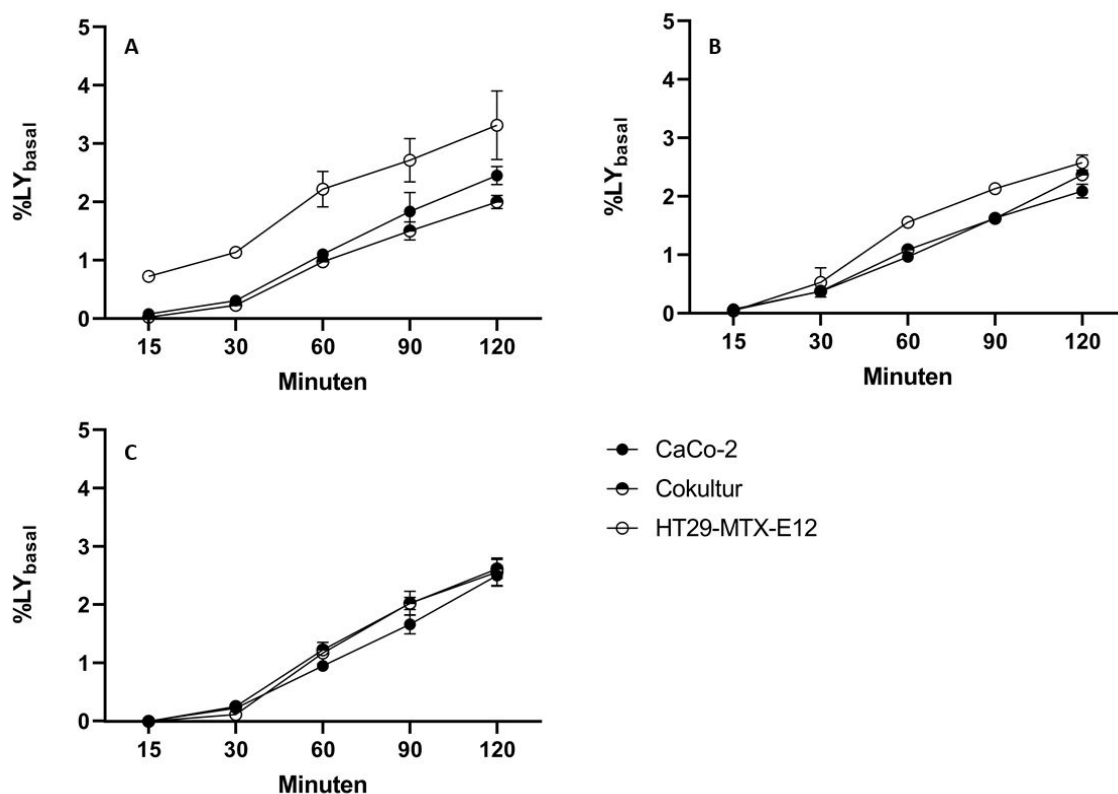


Abbildung 11: Verlauf der parazellulären Permeabilität %LY_{basal} der CaCo-2:HT29-MTX-E12 Zellkultur nach (A) 7 Tagen, (B) 14 Tagen und (C) 21 Tagen in drei unterschiedlichen Konzentrationen: 1:0; 9:1 und 0:1 jeweils nach einer Inkubationszeit von 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten. Mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse und anschließendem Tukey post-hoc Test wurde eine signifikante Änderung der parazellulären Permeabilität ausgeschlossen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte $\pm$ SEM angegeben (n=5).

Aus den Ergebnissen der parazellulären Permeabilität in Abbildung 11 ist ersichtlich, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Cokultur und den CaCo-2 Zellen, unabhängig von der Kultivierungszeit und der Inkubationszeit mit LY, gab. Eine Veränderung der LY-Konzentration über die 120-minütige Versuchsdauer in der basolateralen

Kammer wurde mit Zellmonolayer nach 7, 14 und 21 Tagen Kultivierung untersucht, wobei die basolaterale LY-Konzentration in jedem der drei Zellmodelle besonders zwischen 30 Minuten und 60 Minuten anstieg. Zudem wurde deutlich, dass nach der Inkubation für sieben Tage größere Unterschiede in der parazellulären Permeabilität zwischen den verschiedenen Kulturmodellen als nach der 21-tägigen Kultivierung bestanden. Die parazelluläre Permeabilität lag dabei nach einer siebentägigen Inkubation zum Zeitpunkt $t=120$ bei $2.45 \pm 0.35\%$ für die CaCo-2 Monokultur, bei $2.00 \pm 0.26\%$ für die Cokultur und bei $3.32 \pm 1.31\%$ für die HT29-MTX-E12 Monokultur. Im Gegensatz dazu betrug die parazelluläre Permeabilität nach einer 21-tägigen Inkubation zum Zeitpunkt $t=120$ für das CaCo-2 Modell $2.50 \pm 0.39\%$, für das Cokultur Modell $2.61 \pm 0.37\%$ und für die HT29-MTX-E12 Monokultur $2.56 \pm 0.55\%$.

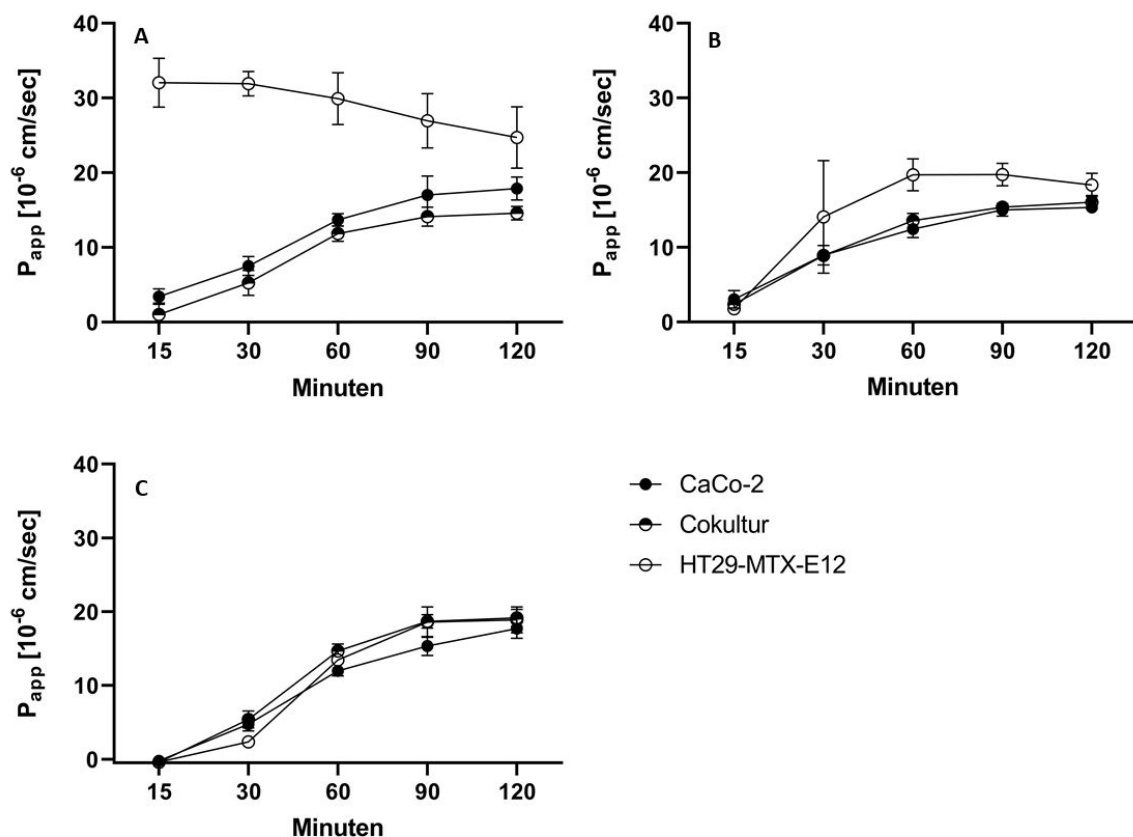


Abbildung 12: Veränderung des Permeabilitätskoeffizienten P_{app} in $[10^{-6} \text{ cm/sec}]$ der CaCo-2:HT29-MTX-E12 Zellkultur nach (A) 7 Tagen, (B) 14 Tagen und (C) 21 Tagen in drei unterschiedlichen Konzentrationen: 1:0; 9:1 und 0:1 jeweils nach einer Inkubationszeit von 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten. Mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse und anschließendem Tukey post-hoc Test konnte keine statistisch signifikante Änderung der parazellulären Permeabilität ermittelt werden. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte $\pm$ SEM angegeben ($n=5$).

In Abbildung 12 wurden die Permeabilitätskoeffizienten P_{app} der drei Zellkulturmodelle dargestellt, wobei diese nach einer 7-, 14- und 21-tägigen Inkubation mittels einer Transportstudie mit LY analysiert wurden. Ein Einfluss der porösen Transwell-Membran auf die Permeabilität konnte durch die Blank-Messung eines zellfreien Transwell-Inserts in Duplikaten ausgeschlossen werden. Die P_{app} Werte für die CaCo-2 Monokultur betrugen bei Zeitpunkt $t=120$ nach sieben Tagen $1.79 * 10^{-5} \pm 3.49 * 10^{-6}$ cm/sec, nach 14 Tagen $1.54 * 10^{-5} \pm 1.69 * 10^{-6}$ cm/sec und nach 21 Tagen $1.77 * 10^{-5} \pm 2.92 * 10^{-6}$ cm/sec. Der Permeabilitätskoeffizient der Cokultur und der HT29-MTX-E12 Monokultur näherten sich mit steigender Inkubationszeit jener der CaCo-2 Monokultur stark an, wobei P_{app} für die Cokultur nach sieben Tagen bei $1.46 * 10^{-5} \pm 2.04 * 10^{-6}$ cm/sec, nach 14 Tagen $1.61 * 10^{-5} \pm 2.03 * 10^{-6}$ cm/sec und nach 21 Tagen bei $1.92 * 10^{-5} \pm 2.58 * 10^{-6}$ cm/sec lag. Die HT29-MTX-E12 Monokultur ergab P_{app} Werte von $2.47 * 10^{-5} \pm 9.21 * 10^{-6}$ cm/sec nach 7 Tagen, $1.83 * 10^{-5} \pm 3.49 * 10^{-6}$ cm/sec nach 14 Tagen und $1.88 * 10^{-5} \pm 3.93 * 10^{-6}$ cm/sec nach 21 Tagen.

Weiters kann aus den Ergebnissen in Abbildung 11 und Abbildung 12 entnommen werden, dass die HT29-MTX-E12 Monokultur die Konfluenz erst nach einer siebentägigen Kultivierung erreichte, da zuvor sowohl die parazelluläre Permeabilität zum Zeitpunkt $t=15$ im Vergleich zu den beiden anderen Kulturen stark erhöht war und bei $0.72 \pm 0.17\%$ lag, als auch der Permeabilitätskoeffizient nach einer 15-minütigen Inkubation mit LY $3.21 * 10^{-5} \pm 7.35 * 10^{-6}$ cm/sec ergab und durch die kontinuierliche Probenentnahme über den restlichen Versuchszeitraum abnahm. Nach einer Kultivierung für drei Wochen stieg P_{app} in jedem der drei Zellmodelle zwischen 30 Minuten und 60 Minuten sehr deutlich an (Abbildung 12 C), wobei auch hier zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen der Cokultur und den CaCo-2 Zellen festgestellt werden konnte.

5.3 Alcianblau Färbung von Mucus-produzierenden Becherzellen

Um die Schleimsekretion der HT29-MTX-E12 Zellen in der Monokultur und in einer Cokultur mit CaCo-2 Zellen über einen Zeitraum von 21 Tagen zu analysieren und mit jener des CaCo-2 Modells zu vergleichen, erfolgte eine Färbung der Mucosubstanzen mit Hilfe von Alcianblau nach einer 7-, 14- und 21-tägiger Kultivierung. Die, durch das Durchlichtmikroskop, generierten Aufnahmen der Alcianblau Färbung der CaCo-2 und HT29-MTX-E12 Zellen in der jeweiligen Monokultur und der Cokultur sind in Abbildung 13 zu sehen.

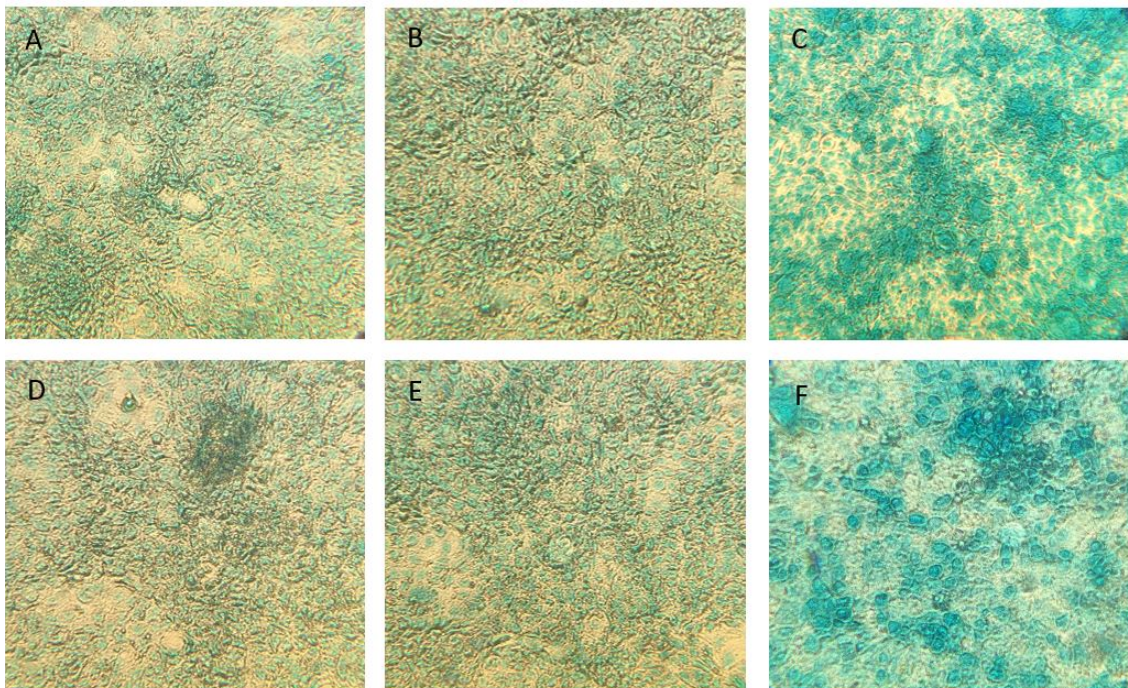


Abbildung 13: Mit Alcianblau gefärbte Zellmonolayer zur Visualisierung von Mucinen. (A) CaCo-2 Zellen nach zwei Wochen, (B) Zellen der Cokultur nach zwei Wochen, (C) HT29-MTX-E12 Zellen nach zwei Wochen, (D) CaCo-2 Zellen nach drei Wochen, (E) Zellen der Cokultur nach drei Wochen und (F) HT29-MTX-E12 Zellen nach drei Wochen.

Man konnte anhand der Aufnahmen erkennen, dass HT29-MTX-E12 Zellen bereits nach 14-tägiger Kultivierung eine nachweisbare blaue Färbung des Mucus auf der gesamten Zelloberfläche aufwiesen (Abbildung 13 C), während CaCo-2 Zellen (Abbildung 13 A, D) auch eine geringe Blaufärbung auf ihrer Oberfläche zeigten. Auch die Cokultur wurde mittels der Alcianblau-Färbung untersucht, wobei anhand der Aufnahmen in Abbildung 13 bestätigt werden konnte, dass durch den geringen Anteil der

HT29-MTX-E12 Zellen die produzierte Schleimmenge, und somit die Intensität der blauen Farbe, in der Cokultur im Vergleich zur CaCo-2 Monokultur erhöht wurde. Durch dieses Resultat wurde demonstriert, dass HT29-MTX-E12 Zellen nicht nur Schleim produzieren wenn sie alleine kultiviert werden, sondern auch wenn eine Cokultivierung mit CaCo-2 Zellen erfolgt.

5.4 MTT-Test

Mittels des MTT-Tests wurde ein negativer Einfluss der süß-schmeckenden Verbindungen Sucrose, Reb M, Sucralose und NHDC auf die Zellvitalität ausgeschlossen. Hierfür wurde sowohl die äquimolare (äm) Konzentration (0.1 mM) als auch eine, zu 5%-iger Sucrose, äquisüße (äs) Konzentration des jeweiligen Süßungsmittels getestet. Sucrose wurde direkt in Medium gelöst, weshalb die erhaltenen Daten in Bezug auf die Mediumkontrolle ($K = 100\%$) angegeben wurden. Hingegen wurden Sucralose, Reb M und NHDC in DMSO gelöst, weshalb deren Werte auf die Lösungsmittelkontrolle (Medium mit 0.1% DMSO ($K_{\text{DMSO}} = 100\%$)) bezogen wurden. Die hier verwendeten Substanzen in den unterschiedlichen Konzentrationen wurden im Anschluss für die qRT-PCR verwendet.

5.4.1 MTT-Test der CaCo-2 Zellen

Die Ergebnisse des MTT-Tests nach einer dreiwöchigen Behandlung der CaCo-2 Zellen mit den Testsubstanzen in beiden Konzentrationen und den beiden Lösungsmitteln sind in Abbildung 14 dargestellt.

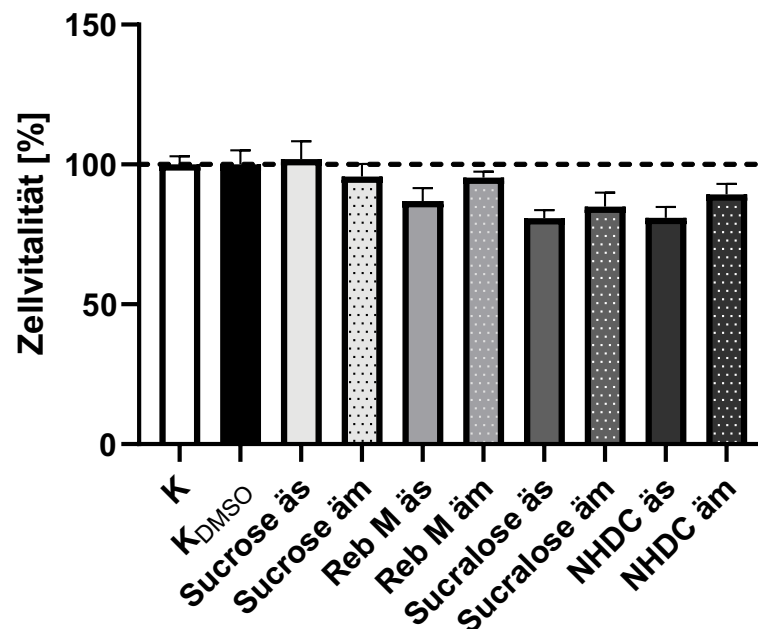


Abbildung 14: Zellvitalität [%] der CaCo-2 Zellen behandelt mit Sucrose äs (150 mM), Sucrose äm (0.1 mM), NHDC äs (0.1 mM), NHDC äm (0.1 mM), Reb M äs (0.2 mM), Reb M äm (0.1 mM), Sucralose äs (0.2 mM), Sucralose äm (0.1 mM), bezogen auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle ($K = \text{Medium}$; $K_{\text{DMSO}} = K + 0.1\% \text{ DMSO}$). Mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse und anschließendem Tukey post-hoc Test wurde

eine signifikante Reduktion der Zellvitalität ausgeschlossen ($p > 0.05$). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte $\pm$ SEM angegeben ($n=4$).

Anhand der MTT Ergebnisse in Abbildung 14 ist ersichtlich, dass keine statistisch signifikante, negative Beeinflussung der Zellvitalität durch die 21-tägige Behandlung der CaCo-2 Zellen mit Sucrose, Sucralose, Reb M und NHDC durch die äquimolare (0.1 mM) als auch durch deren äquivalente (0.1, 0.2, 0.2, 150 mM) Konzentration im Vergleich zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle (=100%) auftrat. Alle verwendeten süßschmeckenden Verbindungen in den beiden Konzentrationen zeigten keine Toxizität im CaCo-2 Zellmodell.

5.4.2 MTT-Test der Cokultur aus HT29-MTX-E12 und CaCo-2 Zellen

Nach einer dreiwöchigen Behandlung der Cokultur mit den vier Testsubstanzen in beiden Konzentrationen und den beiden Lösungsmitteln wurden mittels des MTT-Tests die, in Abbildung 15 dargestellten, Ergebnisse erzielt.

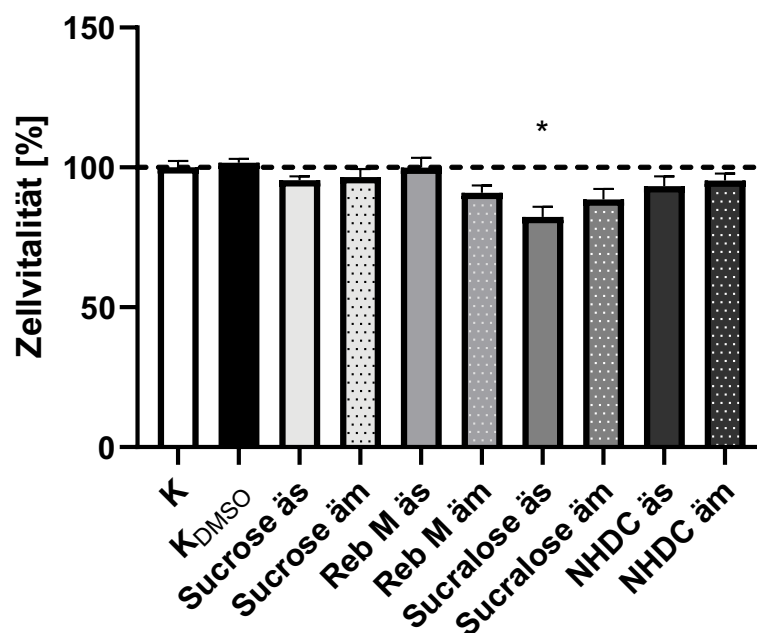


Abbildung 15: Zellvitalität [%] der Cokultur Zellen behandelt mit Sucrose äs (150 mM), Sucrose äm (0.1 mM), NHDC äs (0.1 mM), NHDC äm (0.1 mM), Reb M äs (0.2 mM), Reb M äm (0.1 mM), Sucralose äs (0.2 mM), Sucralose äm (0.1 mM), bezogen auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle (K = Medium; K_{DMSO} = K + 0.1% DMSO). Die statis-

tische Signifikanz wurde mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse und anschließend dem Tukey post-hoc Test bestimmt und mit * $p < 0.05$ angegeben. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte $\pm$ SEM dargestellt ($n=5$).

In Abbildung 15 ist die Vitalität der Zellen im Cokultur Modell nach der dreiwöchigen Behandlung mit 0.1 mM Sucrose, Sucralose, Reb M und NHDC, sowie 0.2 mM Sucralose und Reb M und 150 mM Sucrose im Vergleich zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle (=100%) dargestellt, wobei festgestellt werden konnte, dass eine statistisch signifikante Reduktion der Zellvitalität auf $82.4 \pm 13.93\%$ ($p < 0.05$) nach der Behandlung mit einer äquisüßen Sucralose-Lösung im Vergleich zur Kontrolle auftrat. Jedoch werden gemäß der ISO-Norm 10993-5 Substanzen, die zu einer Vitalität der Zellen von über 80% führen, als nicht zytotoxisch angesehen (ISO 10993-5, 2009).

5.5 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion

Um zu untersuchen, ob sich eine Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen Sucrose, Reb M, Sucralose und NHDC auf die Expressionslevel der Marker-Gene *SLC5A1* (SGLT1), *SLC2A2* (GLUT2), *TAS1R3* und *KCNJ8* (Kir 6.1) in den CaCo-2 Zellen und der Cokultur auswirkt, wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Für diesen Versuch wurden die Zellen zum einen mit einer äquimolaren Konzentration von 0.1 mM und zum anderen mit einer, zu 5%-igen Sucrose, äquisüßen Konzentration der jeweiligen Testsubstanz über einen Zeitraum von 7, 14 oder 21 Tagen behandelt.

5.5.1 Veränderung der Genexpression während der Differenzierung in der CaCo-2 Monokultur und der Cokultur aus HT29-MTX-E12 Zellen und CaCo-2 Zellen

Die zusammengefassten Ergebnisse der qRT-PCR aller Marker-Gene nach der 7-, 14- und 21-tägigen Zugabe von unsubstituiertem Medium zu der CaCo-2 Monokultur und zu der Cokultur aus HT29-MTX-E12 Zellen und CaCo-2 Zellen (1:9) sind in Abbildung 16, jeweils bezogen auf die undifferenzierte Kontrolle, illustriert.

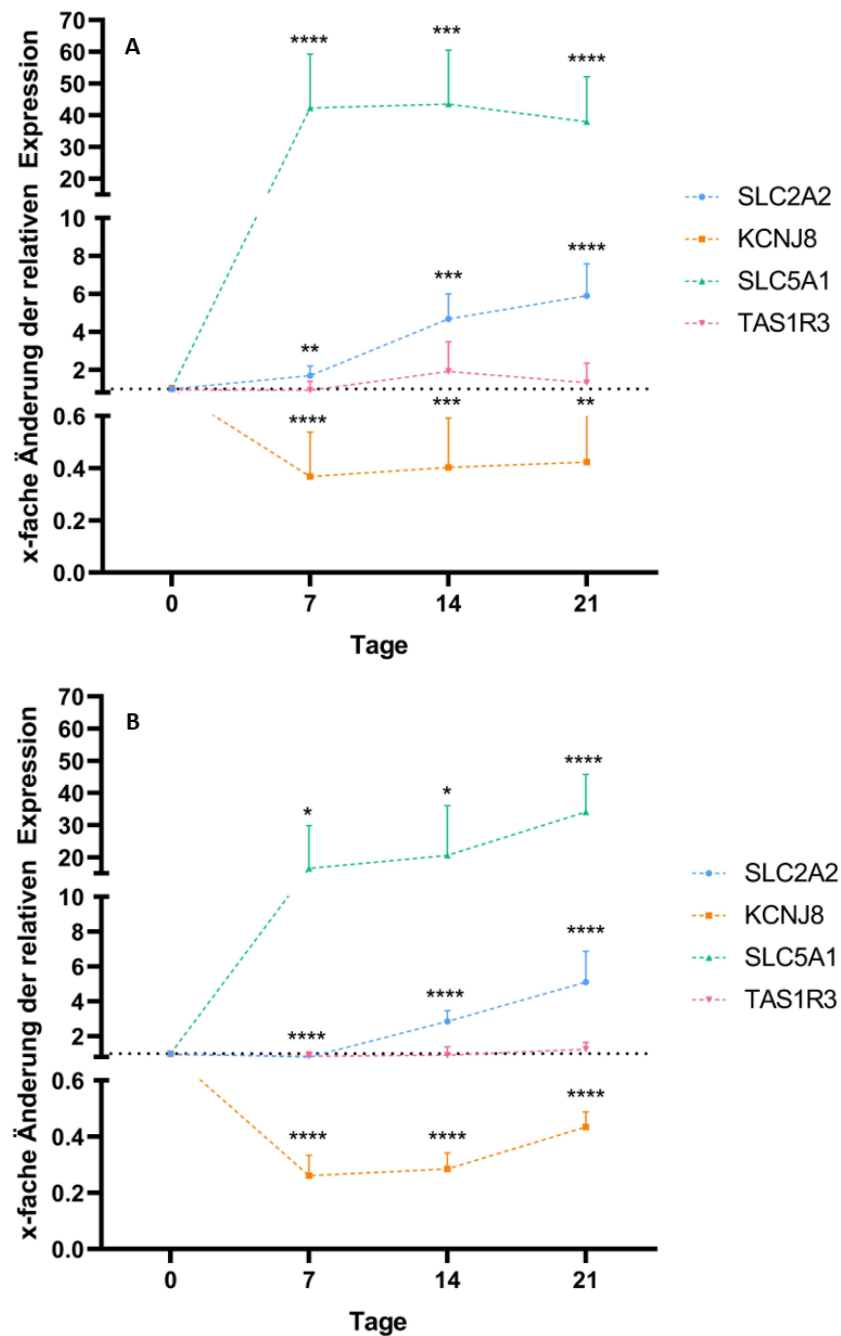


Abbildung 16: Entwicklung der Expression der Marker-Gene *SLC5A1*, *SLC2A2*, *TAS1R3* und *KCNJ8* innerhalb der dreiwöchigen Differenzierungszeit unter Zugabe von Medium normalisiert auf die Referenzgene und bezogen auf die undifferenzierte Kontrolle. (A) CaCo-2 Monokultur, (B) Cokultur. Mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse und anschließendem Tukey post-hoc Test konnte eine statistisch signifikante Änderung der Genexpression im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ermittelt werden und wurde mit * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ und **** $p < 0.0001$ markiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte $\pm$ SEM angegeben (n=4).

Die Ergebnisse in Abbildung 16 wurden zur Veranschaulichung der Expressionsentwicklung der Marker-Gene *SLC5A1*, *SLC2A2*, *TAS1R3* und *KCNJ8* im Laufe der 21-tägigen Differenzierung verwendet. Hierbei wird evident, dass die *TAS1R3* Genexpression in beiden Zellmodellen während der gesamten Kultivierungszeit auf einem konstanten Expressionsniveau mit einer x-fachen Änderung von mindestens 0.92 ± 0.47 bis 1.92 ± 1.56 in der CaCo-2 Monokultur und von 0.86 ± 0.23 bis höchstens 2.26 ± 1.89 in der Cokultur gehalten wurde. Die Expression der Kir 6.1 Untereinheit wurde während der Differenzierung signifikant auf eine x-fache Änderung von 0.42 ± 0.24 ($p < 0.01$) bis zu 0.37 ± 0.17 ($p < 0.0001$) in der CaCo-2 Monokultur und in der Cokultur von 0.62 ± 0.34 ($p < 0.0001$) bis maximal 0.26 ± 0.07 ($p < 0.0001$) signifikant erniedrigt. Entgegen dessen stieg die Expression der zwei Glukosetransporter in beiden Zellmodellen signifikant an. Dabei erreichte die Expression des Gens *SLC2A2* eine x-fache Änderung von 1.7 ± 0.51 ($p < 0.01$) bis höchstens 7.48 ± 5.19 ($p < 0.001$) in der CaCo-2 Monokultur und mindestens 0.73 ± 0.15 ($p < 0.0001$) bis maximal 5.12 ± 1.75 ($p < 0.0001$) in dem Cokultur Modell. Die Genexpression von *SLC5A1* erzielte eine x-fache Änderung von bis zu 55.49 ± 32.41 ($p < 0.001$) für das Monokultur Modell und von mindestens 16.58 ± 13.28 ($p < 0.05$) für die Cokultur.

5.5.2 qRT-PCR der CaCo-2 Zellen

5.5.2.1 qRT-PCR nach dem Treatment mit Testsubstanzen in äquimolaren Konzentrationen

Die Zusammenfassung der Ergebnisse der qRT-PCR aller Marker-Gene nach einer Behandlung der CaCo-2 Zellen für 7, 14 und 21 Tagen mit einer der vier süß-schmeckenden Verbindungen, in einer äquimolaren Konzentration und den beiden Lösungsmitteln sind in Abbildung 17, jeweils bezogen auf die undifferenzierte Kontrolle, abgebildet.

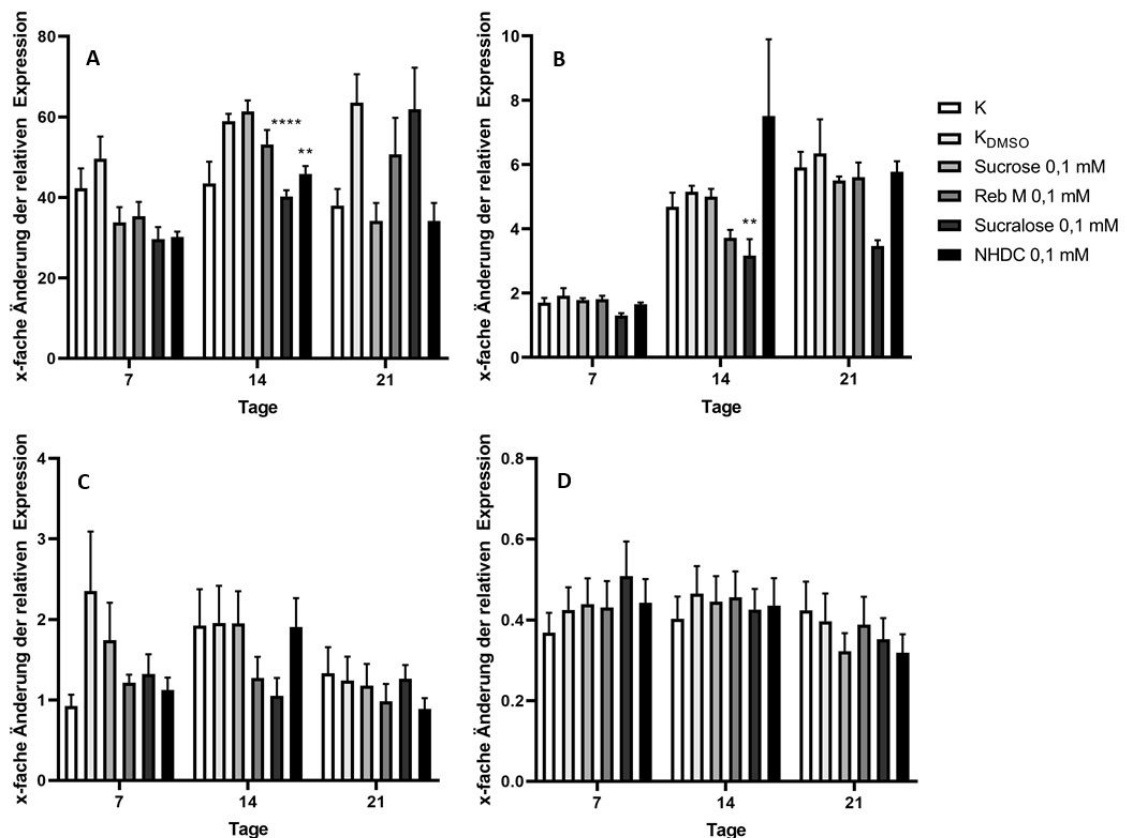


Abbildung 17: x-fache Änderung der relativen Expression der CaCo-2 Monokultur nach einer Langzeitbehandlung für 7, 14 und 21 Tagen mit K, K_{DMSO} und einer äquimolaren Konzentration der Testsubstanzen Sucrose, Reb M, Sucralose und NHDC, normalisiert auf die house-keeping Referenzgene und bezogen auf die undifferenzierte Kontrolle. (A) *SLC5A1* Expression, (B) *SLC2A2* Expression, (C) *TAS1R3* Expression und (D) *KCNJ8* Expression. Mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse und anschließendem Tukey post-hoc Test konnte eine statistisch signifikante Änderung der Genexpression im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ermittelt werden. Diese wurde mit ** $p < 0.01$ und **** $p < 0.0001$ gekennzeichnet. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte $\pm$ SEM dargestellt (n=4).

Generell konnte anhand der Ergebnisse in Abbildung 17 demonstriert werden, dass die Genexpression von *SLC5A1*, *SLC2A2* und *TAS1R3* im gesamten Zeitraum der Behandlung im Vergleich zur undifferenzierten Kontrolle hochreguliert war, während die *KCNJ8* Expression verglichen mit der Kontrolle verringert war. Durch die zweiwöchige Behandlung der CaCo-2 Zellen mit den Testsubstanzen Sucralose und NHDC in der äquimolaren Konzentration wurde die Expression des Transporters SGLT1 im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle, siehe Abbildung 17 A, signifikant reduziert. Dabei lag die x-fache Änderung der *SLC5A1* Genexpression durch die Inkubation mit Sucralose bei

40.28 ± 5.32 ($p < 0.0001$) und mit NHDC bei 45.82 ± 6.01 ($p < 0.01$). Zudem zeigte Sucralose eine 3.17 ± 1.79 -fache Änderung der *SLC2A2* Expression ($p < 0.01$), siehe Abbildung 17 B. Weiters wurde keine signifikante Änderung der Expression von *SLC5A1* und *SLC2A2* nach einem Treatment mit den süß-schmeckenden Verbindungen nach einer oder drei Wochen detektiert. Sowohl die *TAS1R3*, als auch die Expression der Kir 6.1 Untereinheit wurden zu keinem Zeitpunkt von den Testsubstanzen signifikant beeinflusst. Es konnte kein Einfluss der Süßintensität durch das Treatment mit den Süßstoffen in äquimolaren Konzentrationen auf die Genexpression festgestellt werden.

5.5.2.2 qRT-PCR nach dem Treatment mit Testsubstanzen in äquisüßen Konzentrationen

Die Ergebnisse der qRT-PCR der ausgewählten Gene nach einer Behandlung der CaCo-2 Zellen für 7, 14 und 21 Tagen mit einer der vier süß-schmeckenden Verbindungen, in äquisüßen Konzentrationen und den beiden Lösungsmitteln sind in Abbildung 18, jeweils bezogen auf die undifferenzierte Kontrolle, zusammengefasst.

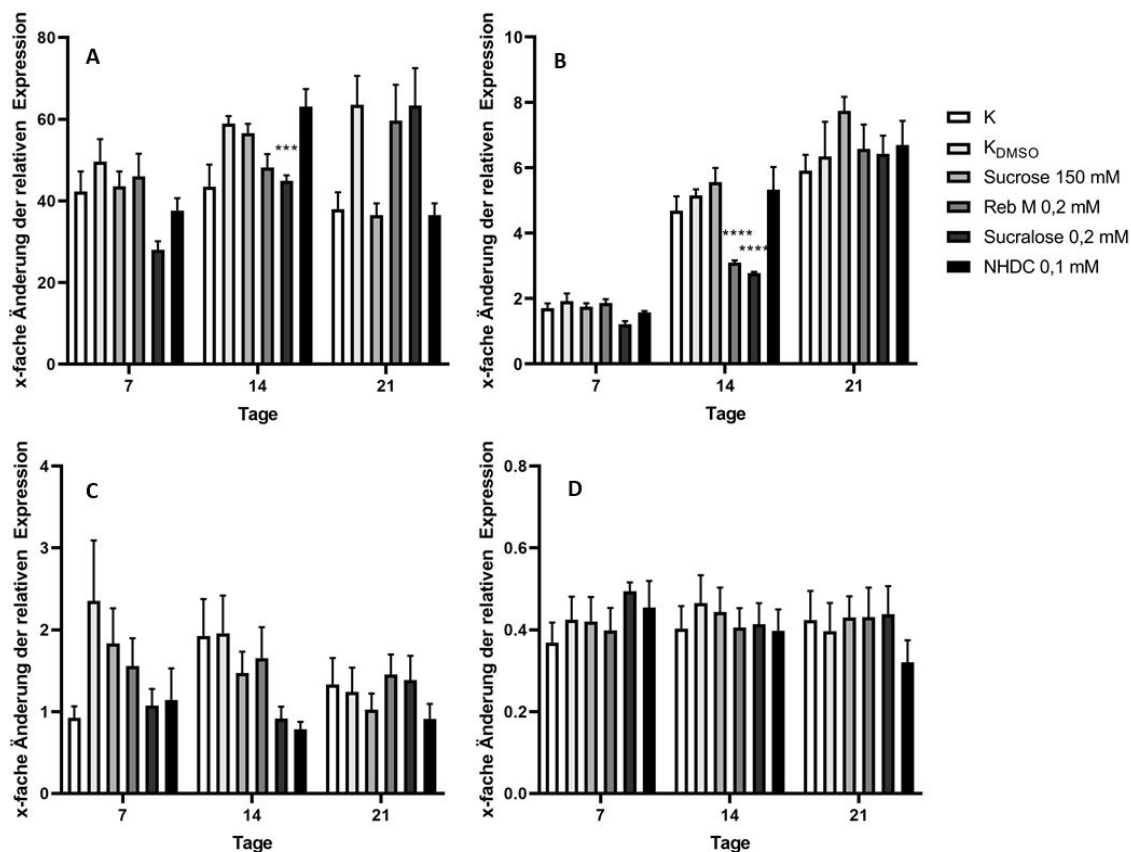


Abbildung 18: x-fache Änderung der relativen Expression der CaCo-2 Monokultur nach einer Langzeitbehandlung für 7, 14 und 21 Tagen mit K, K_{DMSO} und einer äquisüßen Konzentration der Testsubstanzen Sucrose, Reb M, Sucralose und NHDC, normalisiert auf die house-keeping Referenzgene und bezogen auf die undifferenzierte Kontrolle.

(A) *SLC5A1* Expression, (B) *SLC2A2* Expression, (C) *TASIR3* Expression und (D) *KCNJ8* Expression. Mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse und anschließendem Tukey post-hoc Test konnte eine statistisch signifikante Änderung der Genexpression im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ermittelt werden, wobei diese mit *** $p < 0.001$ und **** $p < 0.0001$ markiert wurden. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte $\pm$ SEM angegeben (n=4).

Die 14-tägige Behandlung der CaCo-2 Zellen mit der Testsubstanz Sucralose in einer Konzentration von 0.2 mM führte zu einer x-fachen Änderung der *SLC5A1* Genexpression von 44.92 ± 4.72 ($p < 0.001$), Abbildung 18 A. Nach einem Treatment mit Reb M und Sucralose in einer Konzentration von 0.2 mM für zwei Wochen konnte eine signifikante Reduktion der *SLC2A2* Expression verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle festgestellt werden. Die x-fache Änderung der *SLC2A2* Expression, siehe Abbildung 18 B, lag durch die Inkubation mit Reb M bei 3.10 ± 0.16 ($p < 0.0001$) und durch das Sucralose Treatment bei 2.78 ± 0.14 ($p < 0.0001$). Keine signifikanten Änderungen der Genexpression der beiden Nährstofftransporter SGLT1 und GLUT2 wurden nach einem ein- oder dreiwöchigen Treatment mit den süß-schmeckenden Verbindungen identifiziert. Die CaCo-2 Zellen wiesen für die *TASIR3* und für die *KCNJ8* Expression nach 7, 14 und 21 Tagen keine signifikante Beeinflussung durch die Testsubstanzen auf. Auch hier war auffällig, dass die Genexpression von *SLC5A1*, *SLC2A2* und *TASIR3* grundsätzlich über den gesamten Behandlungszeitraum im Vergleich zur undifferenzierten Kontrolle hochreguliert war, während die Expression der Kir 6.1 Untereinheit verringert war. Basierend auf diesen Ergebnissen kann davon ausgegangen werden, dass die Änderung der Genexpression nicht von der Süße der Testsubstanz abhängig war, sondern substanzspezifische Effekte auf die Expression eines bestimmten Gens identifiziert werden konnten.

5.5.3 qRT-PCR der Cokultur aus HT29-MTX-E12 und CaCo-2 Zellen

5.5.3.1 qRT-PCR nach dem Treatment mit Testsubstanzen in äquimolaren Konzentrationen

Die qRT-PCR-Ergebnisse aller Marker-Gene nach einer Behandlung der Cokultur für 7, 14 und 21 Tagen mit einer der vier süß-schmeckenden Verbindungen, in einer äquimolaren Konzentration, und den beiden Lösungsmitteln sind in Abbildung 19, jeweils bezogen auf die undifferenzierte Kontrolle, gezeigt.

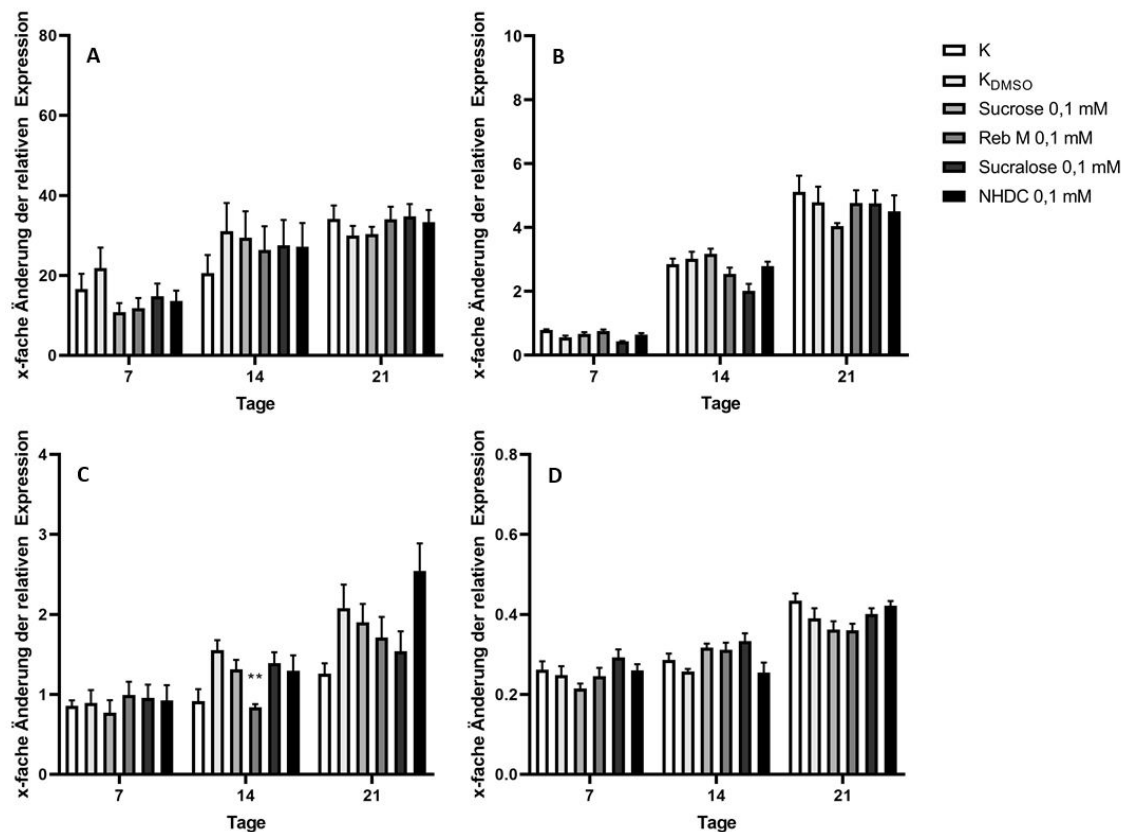


Abbildung 19: x-fache Änderung der relativen Expression der Cokultur nach einer Langzeitbehandlung für 7, 14 und 21 Tagen mit Medium, DMSO und einer äquimolaren Konzentration der Testsubstanzen Sucrose, Reb M, Sucralose und NHDC, normalisiert auf die house-keeping Referenzgene und bezogen auf die undifferenzierte Kontrolle. (A) *SLC5A1* Expression, (B) *SLC2A2* Expression, (C) *TAS1R3* Expression und (D) *KCNJ8* Expression. Mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse und anschließendem Tukey post-hoc Test konnte eine statistisch signifikante Änderung der Genexpression im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ermittelt werden und wurde mit ** $p < 0.01$ und markiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte $\pm$ SEM angegeben ($n=4$).

Die Behandlung der Zellen im Cokultur Modell für 14 Tage mit Reb M in einer Konzentration von 0.1 mM, siehe Abbildung 19 C, führte zu einer 0.84 ± 0.13 -fachen Änderung ($p < 0.01$) der *TAS1R3* Expression. Nach einer ein- oder dreiwöchigen Kultivierung wurde keine signifikante Reduktion der *TAS1R3* Expression durch Reb M hervorgerufen. Die anderen analysierten, süß-schmeckenden Verbindungen führten bei keinem der Marker-Gene, unabhängig von dem Behandlungszeitraum mit der Testsubstanz, zu einer signifikanten Änderung der Expressionslevels. Interessanterweise wurde in Abbildung 19 B eine stufenartig ansteigende Hochregulierung der *SLC2A2* Expression über den 21-tägi-

gen Zeitraum erkennbar, wobei deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Substanzbehandlungen für 7, 14 oder 21 Tage detektiert wurden. Ein Effekt der Süßintensität auf die Genexpressionslevels konnte durch die Resultate dieser Genexpressionsanalyse ausgeschlossen werden.

5.5.3.2 qRT-PCR nach dem Treatment mit Testsubstanzen in äquisüßen Konzentrationen

Die, durch die qRT-PCR gemessenen, Expressionslevels aller Marker-Gene nach einer Behandlung der Kokultur für 7, 14 und 21 Tagen mit einer der vier süß-schmeckenden Verbindungen, in einer äquisüßen Konzentration, und den beiden Lösungsmitteln sind in Abbildung 20, jeweils bezogen auf die undifferenzierte Kontrolle, dargestellt.

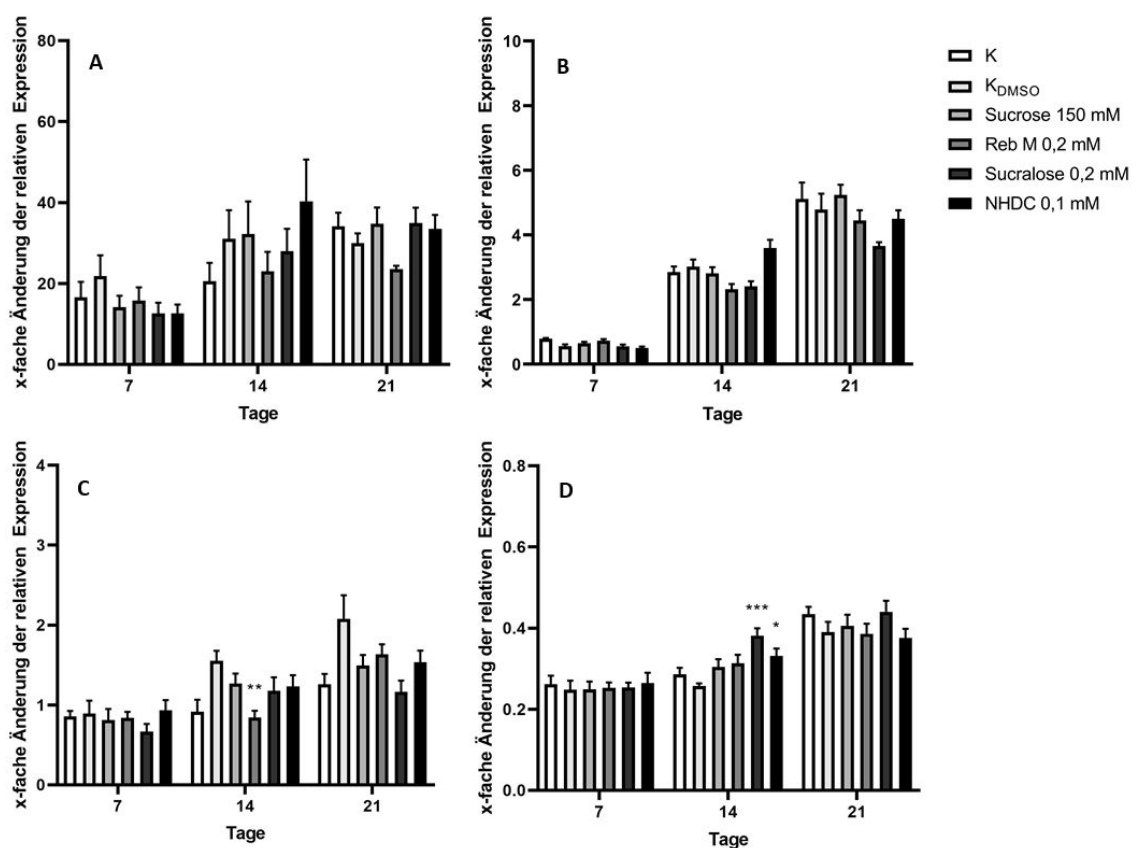


Abbildung 20: x-fache Änderung der relativen Expression der Kokultur nach einer Langzeitbehandlung für 7, 14 und 21 Tagen mit Medium, DMSO und einer äquisüßen Konzentration der Testsubstanzen Sucrose, Reb M, Sucralose und NHDC, normalisiert auf die house-keeping Referenzgene und bezogen auf die undifferenzierte Kontrolle. (A) *SLC5A1* Expression, (B) *SLC2A2* Expression, (C) *TAS1R3* Expression und (D) *KCNJ8* Expression. Mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse und anschließendem Tukey post-hoc Test konnte eine statistisch signifikante Änderung der Genexpression im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ermittelt werden und wurde mit

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$ markiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte $\pm$ SEM angegeben ($n=4$).

Eine 14-tägige Behandlung der Cokultur mit der Testsubstanz Reb M in einer Konzentration von 0.2 mM führte zu einer x-fachen Änderung der *TASIR3* Expression von 0.84 ± 0.29 ($p < 0.01$), siehe Abbildung 20 C. Der Zusatz von Sucralose in einer Konzentration von 0.2 mM und NHDC in einer Konzentration von 0.1 mM für zwei Wochen erhöhte das Expressionlevel von *KCNJ8* im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO signifikant. Die x-fache Änderung der *KCNJ8* Expression, siehe Abbildung 20 D, lag für Sucralose bei 0.38 ± 0.06 ($p < 0.001$) und für NHDC bei 0.33 ± 0.06 ($p < 0.05$). Es konnte keine signifikante Änderung der *TASIR3* und *KCNJ8* Expression nach einem ein- oder dreiwöchigen Treatment mit den süß-schmeckenden Verbindungen identifiziert werden. Die Cokultur wies für die Genexpression der Transporter SGLT1 und GLUT2 nach 7, 14 und 21 Tagen keine signifikante Beeinflussung durch die Testsubstanzen auf. Die Änderung der Genexpression war nicht von der Süße der Testsubstanz abhängig, sondern es konnten substanzspezifische Effekte auf die Expression eines bestimmten Gens bestätigt werden.

5.5.4 Vergleich der qRT-PCR Ergebnisse der CaCo-2 Monokultur und der Cokultur aus HT29-MTX-E12 Zellen und CaCo-2 Zellen

Die Zusammenfassung der Ergebnisse der qRT-PCR aller Marker-Gene nach einer Behandlung der CaCo-2 Monokultur und der Cokultur aus HT29-MTX-E12 Zellen und CaCo-2 Zellen (1:9) für 7, 14 und 21 Tagen mit den vier süß-schmeckenden Verbindungen, sowohl in der äquimolaren, als auch in der äquisüßen Konzentration sind in Abbildung 21, jeweils bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle, dargestellt.

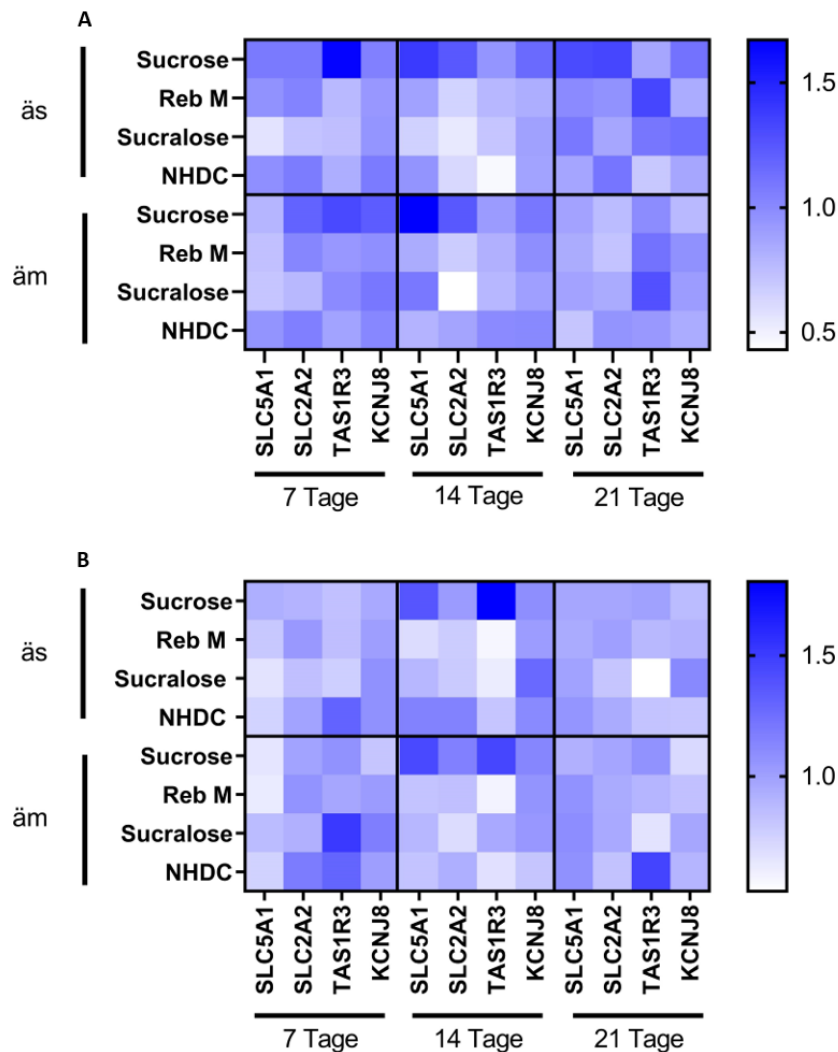


Abbildung 21: Heatmap der Marker-Gene *SLC5A1*, *SLC2A2*, *TAS1R3* und *KCNJ8* nach einer Inkubation für 7, 14 und 21 Tagen mit den unterschiedlichen Testsubstanzen in einer äquimolaren (äm) sowie äquisüßen (äs) Konzentrationen normalisiert auf die house-keeping Referenzgene und bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle. (A) CaCo-2 Monokultur, (B) Cokultur.

Die beiden Heatmaps wurden für eine Mustererkennung herangezogen, wobei deutlich wurde, dass die Genexpressionsmuster der Substanzen in der Monokultur und in der Cokultur relativ ähnlich sind. Deutlich erkennbar war die starke Hochregulierung der *SLC5A1* und *TAS1R3* Genexpression durch Sucrose in den beiden unterschiedlichen Konzentrationen, die bei der Cokultur nach einer 14 Tage langen Behandlung, festgestellt werden konnte. Weiters konnte anhand der Resultate in Abbildung 21 B eine starke Erhöhung der *SLC2A2* Expression in der Cokultur nach der 7-tägigen Inkubation mit Reb M detektiert werden. Es gibt jedoch keinen starken Shift zwischen den äquimolaren und äquisüßen Konzentrationen der Verbindungen, welcher aufgrund der unterschiedlichen

Süßintensität der süß-schmeckenden Testsubstanzen erwartet wurde. Auffällig war zudem der Unterschied zwischen der Heatmap der CaCo-2 Zellen und der Heatmap der Cokultur, wobei deutlich wurde, dass die Süßungsmittel nach 21 Tagen einen stärkeren Einfluss auf die Genexpressionslevel der CaCo-2 Monokultur haben.

6. Diskussion

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit war einerseits, dass die Cokultivierung von CaCo-2 Enterozyten und Mucus-produzierenden HT29-MTX-E12 Zellen zu einer Verbesserung des bisher etablierten *in vitro* Modells der intestinalen Barriere führt. Andererseits sollte herausgefunden werden, ob eine Behandlung mit den ausgewählten süßschmeckenden Verbindungen Sucrose, Rebaudiosid M (Reb M), Sucralose und Neohesperidin-Dihydrochalkon (NHDC) einen Einfluss auf die Expressionslevel der Marker-Gene *SLC5A1* (SGLT1), *SLC2A2* (GLUT2), *TAS1R3* und *KCNJ8* (Kir 6.1) in CaCo-2 Enterozyten mit oder ohne Cokultivierung von Mucin-produzierenden HT29-MTX-E12 Zellen, innerhalb der dreiwöchigen Differenzierung, hat.

Somit wurde in dieser Arbeit zunächst das Cokultur Modell, bestehend aus CaCo-2 Enterozyten und HT29-MTX-E12 Becherzellen, durch unterschiedliche Assays charakterisiert und mit dem standardmäßig verwendeten CaCo-2 Darmepithelmodell verglichen. Hierfür wurden transepitheliale elektrische Widerstandsmessungen, ein Permeabilitätstest mit Lucifer Yellow zur Überprüfung der Integrität des Zellmonolayers und eine Alcianblau Färbung zur Sichtbarmachung des durch die Becherzellen produzierten Mucus, durchgeführt, um festzustellen, ob eine Optimierung des *in vitro* Modells detektiert werden konnte. Nach der Validierung des neuen Modells der intestinalen Barriere konnte ein Einfluss der Testsubstanzen auf die Genexpressionlevel nach einer 7-, 14- oder 21-tägigen Substanzexposition in einem Monokultur Modell und in einem Cokultur Modell geprüft werden. Es wurden hierbei jeweils zwei Konzentrationen pro Süßungsmittel in vier biologischen Replikaten getestet, zum einen eine äquimolare Konzentration (0.1 mM) und zum anderen eine, zu 5%-iger Sucrose, äquisüße Konzentration der jeweiligen Testsubstanz.

6.1 Validierung des Cokultur Modells

In Standardmedium kultivierte CaCo-2 Zellen zeigen deutliche Merkmale einer intestinalen Differenzierung zu einem absorbierenden Phänotyp, wobei im Vergleich zum CaCo-2 Modell der intestinalen Barriere das humane *in vivo* Darmepithel neben absorptiven Enterozyten noch aus weiteren spezialisierten Darmepithelzellen besteht, welche für unterschiedliche Stoffwechsel- und Verdauungsfunktionen benötigt werden (Haller, Grune, und Rimbach, 2013; Kleiveland, 2015). Aus dieser Unmöglichkeit die menschliche intestinale Barriere unter Verwendung einer einzelnen Zelllinie im *in vitro* Zellmodell darzustellen, ergibt sich die Notwendigkeit eine, dem humanen *in vivo* Darmepithel ähnliche, Cokultur zu etablieren. Durch eine gemeinsame Kultivierung der CaCo-2 und HT29-MTX-E12 Zelllinien ist es möglich, ein *in vitro* Modell zu erhalten, das die beiden Zelltypen darstellt, die im natürlichen humanen Epithel am stärksten vertreten sind, nämlich Enterozyten und Mucus-produzierende Becherzellen. Dadurch könnte das Cokultur Modell eine verbesserte Näherung zum humanen Darmepithel darstellen. Der Anteil der beiden Hauptzelltypen im Darm variiert zwischen den unterschiedlichen Darmregionen. Während das Epithel im Zwölffingerdarm zu 90% aus absorptiven Enterozyten und zu 10% aus Schleim-sekretierenden Becherzellen besteht, tragen Becherzellen im Dickdarmbereich 24% zur Gesamtzellzahl bei (Huet u. a., 1987; Forstner und Forstner, 1994). Basierend auf dieser Information wurden CaCo-2 Zellen und HT29-MTX-Zellen in einem Verhältnis von 9:1, welches sich gemäß einer Studie von Pan u.a. (2015) als optimal für Permeabilitätsstudien erwiesen hat, cokultiviert und mit den beiden Monokultur-Ergebnissen verglichen. Aufgrund der geringeren Anzahl an Tight Junctions zwischen HT29-MTX-E12 Zellen und der Fähigkeit Mucine zu produzieren, sollte die Morphologie als auch die Permeabilität der Cokultur-Zellschicht jener des intestinalen Epitheliums stark ähneln (Huet u. a. 1987; Maoret u. a. 1989; Walter u. a. 1996).

Um die *in vivo* ähnlichen Merkmale der Cokultur bezüglich der Durchlässigkeit zu überprüfen, erfolgte die Messung der TEER-Werte über einen Zeitraum von 21 Tagen, durch welche die epitheliale Integrität der Monoschicht verfolgt werden konnte. Wie erwartet waren die TEER-Werte der Cokultur niedriger als jene der CaCo-2 Monokultur und höher als jene des HT29-MTX-E12 Zellmodells. Demzufolge konnte gezeigt werden, dass die Cokultivierung mit HT29-MTX-E12 Zellen zu einer Verringerung der TEER-Werte und somit zu einer Erhöhung des interzellulären Raums führte. Die post-konfluente CaCo-2 Monokultur zeigte TEER-Werte zwischen 225.8 und 490.5 Ωcm^2 , dabei konnten diese

durch die, mittels Cokultur erzielte, Reduktion der TEER-Werte auf 249.3 bis 303.75 Ωcm^2 verringert werden. Durch diese Verminderung der Werte konnten diese an die realistischen TEER-Werte des Dickdarms unter *in vivo* Bedingungen von rund 300-400 Ωcm^2 angenähert werden (Powell, 1987; Srinivasan u. a. 2015). Vergleichbare Resultate wurden in Studien von Ferraretto u. a. (2018) und Strugari u. a. (2018) für CaCo-2 und HT29-MTX-E12 Cokulturen erzielt, wobei in keiner der beiden Arbeiten ein CaCo-2:HT29-MTX-E12 Verhältnis von 9:1 überprüft wurde. Analog den Angaben in der Literatur wurden durch die Cokultivierung mit HT29-MTX-E12 Zellen die TEER-Werte verringert und die Mucusmenge gesteigert (Schimpel u. a., 2014; Pan u. a., 2015; Strugari u. a., 2018). Dieser Unterschied in der Schleimsekretion zwischen den drei Zellmodellen konnte mittels Alcianblau Färbung demonstriert werden, wobei sowohl bei beiden Monokulturen als auch bei der Cokultur eine Schleimbildung zu jedem analysierten Zeitpunkt detektiert werden konnte. Diese ungeahnte, marginale Mucussekretion durch CaCo-2 wurde bereits in einem Paper von Leonard, Collnot, und Lehr (2010) beschrieben.

Der in dieser Arbeit verwendete hydrophile Marker Lucifer Yellow kann den Zellmonolayer über passive parazelluläre Diffusion passieren und wurde für die Bewertung der parazellulären Permeabilität von der apikalen Seite des Monolayers zur basolateralen Seite verwendet. Die hierbei erhaltenen %LY_{basal}- und P_{app}-Werte von Lucifer Yellow der Cokultur stimmten mit den Werten der TEER-Messung überein, wobei der progressive Integritätsverlust des Monolayers durch die Verminderung der Tight Junction Komplexe zu einer Erhöhung der parazellulären Permeabilität führte. Sowohl die %LY_{basal}- als auch die P_{app}-Werte lagen über den in der Literatur beschriebenen Werten, was möglicherweise auf eine schlechte Löslichkeit der in diesen Studien verwendeten Substanzen zurückzuführen ist (Pontier u. a., 2001; Hoppe u. a., 2014; Ferraretto u. a. 2018). Eine schlechte Löslichkeit von Lucifer Yellow, ein Metabolismus durch die kultivierten Zellen, sowie eine Akkumulation des Lucifer Yellows in dem Zellmonolayer konnte in dieser Arbeit aufgrund von P_{app} Werten über 10^{-6} ausgeschlossen werden (Hoppe u. a., 2014). Laut Artursson und Karlsson (1991) liegen P_{app}-Werte für vollständig absorbierbare Substanzen im menschlichen intestinalen Epithel über $1 \cdot 10^{-6}$ cm/sec, wodurch die in dieser Arbeit erhaltenen Werte gut mit der *in vivo* Situation konvergieren. Anhand der erhaltenen Permeabilitätstestdaten konnte man erkennen, dass sich, trotz der

abweichenden TEER-Werte, die parazelluläre Permeabilität mit steigender Kultivierungszeit der drei Zellmodelle immer weiter annäherte. Betrachtet man die Gesamtheit der, aus der Charakterisierung des Cokultur Modells, generierten Ergebnisse, könnte angenommen werden, dass die CaCo-2 Monokultur, sowie die Cokultur bereits 14 Tage nach dem Ausstreuen für Folgeexperimente geeignet sind. Die Verringerung der Tage nach der Konfluenz, die erforderlich sind, um ein gut differenziertes Modell der intestinalen Barriere zu erhalten, ist eine interessante Eigenschaft der vorliegenden 9:1 CaCo-2:HT29-MTX-E12 Cokultur. Einerseits könnte dies auf den ausgeprägten Differenzierungsgrad der CaCo-2 Zellen vor ihrer Konfluenz zurückzuführen sein und andererseits auf die Verwendung von Passagen höher als Passagennummer 18, die laut Ferraretto u. a. (2007) repräsentativ für einen differenzierten Phänotyp sind, der vor allem durch das Vorhandensein eines gut entwickelten Bürstensaumrandes mit Mikrovilli und hoher Enzymaktivität gekennzeichnet ist (Pinto u. a., 1983; Ferraretto u. a., 2007; 2018). Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass die Passagennummer durch unterschiedliche Zählweise in den Laboratorien nicht direkt miteinander verglichen werden kann (Pan u. a. 2015; Ferraretto u. a. 2018). Unter Bedachtnahme aller Ergebnisse hat sich das Cokultur Modell im Verhältnis 9:1 als repräsentatives *in vitro* Darmmodell erwiesen und konnte somit in den nachfolgenden Versuchen eingesetzt werden.

6.2 Einfluss der Testsubstanzen auf die Genexpressionslevel

Aufbauend auf den Ergebnissen der Validierung des Cokultur Modells als eine verbesserte Version des etablierten CaCo-2 Modells der intestinalen Barriere, wurde untersucht, welche Auswirkung die Langzeitbehandlung mit den süß-schmeckenden Verbindungen Sucrose, Reb M, Sucralose und NHDC auf die Expressionslevel bestimmter Gene, insbesondere von jenen die an der Süßwahrnehmung beteiligt sind, im Intestinaltrakt hat.

6.2.1 Effekt der süß-schmeckenden Verbindungen auf die TAS1R-abhängige Süßwahrnehmung in *in vitro* Darmmodellen

Über das intestinale Vorkommen des G-Protein-gekoppelten Süßrezeptors TAS1R2/TAS1R3 der TAS1R-Familie, der die Zuckeraufnahme im Mundraum initiiert, wurde erstmals von Dyer u. a. (2005) berichtet. Analog den Rezeptoren des süßen Geschmacks auf der lingualen Oberfläche, reagieren die Süßrezeptoren im GI ebenso auf kalorische und nicht kalorische Süßungsmittel (Jang u. a., 2007). Die TAS1R2- und TAS1R3-Untereinheiten im Darm können eine Rolle bei der postoralen Absorption und dem Metabolismus von Süßstoffen spielen sowie die Sekretion von Inkretinen stimulieren, die wiederum die Glukosetransporter und die Insulinsekretion regulieren (Mace u. a., 2007). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, hat die Behandlung der Zellen im CaCo-2 Modell für 7, 14 oder 21 Tage mit einer Konzentration von 0.1 mM der süß-schmeckenden Verbindungen keine signifikante Auswirkung auf die Expression der TAS1R3-Untereinheit. Die *TAS1R3* Genexpression wurde nach 21 Tagen tendenziell runterreguliert, wobei dieser Trend nicht signifikant war. Auch ein Treatment mit einer, zu 5%-iger Sucrose, äquisüßen Konzentration der jeweiligen Testsubstanz führte zu keiner signifikanten Änderung der Genexpression im CaCo-2 Modell.

Im Gegensatz zur CaCo-2 Monokultur konnte im Cokultur Modell nach einer 14-tägigen Behandlung mit 0.1 mM Reb M, als auch nach der Inkubation mit 0.2 mM Reb M eine signifikante Reduktion der *TAS1R3* Expression erfasst werden, was auf einen Einfluss der HT29-MTX-E12 Zellen auf die *TAS1R3* Genexpression deutete. Anhand der Inkubation der Zellen mit den süß-schmeckenden Verbindungen in einer äquimolaren Konzentration konnte gezeigt werden, dass die Süßintensität der einzelnen Testsubstanzen keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression der TAS1R3-Untereinheit hat. Ein Effekt der süß-schmeckenden Verbindungen auf die TAS1R2-Untereinheit wurde nicht untersucht, da diese Untereinheit Expressionslevel unterhalb des Detektionslimits

der qRT-PCR aufweist (O'Brien und Corpe, 2016). In mehreren anderen Studien wurde gezeigt, dass durch den Zusatz des künstlichen Süßstoffs Sucralose im Trinkwasser von Wistar-Ratten; ICR Mäusen beziehungsweise C57BL/6 Mäusen das Expressionslevel von *Tas1r3* signifikant erhöht wurde (Shi u. a. 2019; Sánchez-Tapia u. a., 2019; Shi, Zhu, und Deng, 2019). Zudem wurde die *Tas1r3* Expression sowohl durch die Zugabe des Disaccharids Sucrose im Trinkwasser als auch durch Steviol-Glykoside gemeinsam mit Sucrose signifikant hochreguliert (Sánchez-Tapia u. a., 2019). So demonstrierte die Studie von Shi, Zhu und Deng (2019), dass eine zwölfwöchige Fütterung mit einem verringerten Gehalt an verdaulichen Kohlehydraten (55% - 33%) und einem erhöhten Anteil an unverdaulichen Kohlenhydraten (11% - 33%) gemeinsam mit 0.4 g/L Sucralose die Genexpression der *Tas1r3*-Untereinheit des Süßrezeptors im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (66% verdauliche Kohlenhydrate, 0.4 g/L Sucralose) im Zwölffingerdarm der C57BL/6 Mäuse senkte. Die verwendeten Konzentrationen der süß-schmeckenden Verbindungen in diesen drei Nagetierstudien lagen jedoch bis zu 300-fach über den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen und die Behandlung erfolgte über einen drei bis vier Monate langen Zeitraum. Bislang wurden keine vergleichbaren Studien an humanen Modellen durchgeführt, auch eine Beeinflussung der *TAS1R3* Expression durch NHDC wurde bislang noch nicht im Rahmen von Studien erforscht.

6.2.2 Effekt der süß-schmeckenden Verbindungen auf die TAS1R-unabhängige Süßwahrnehmung in *in vitro* Darmmodellen

Wie bereits durch unterschiedliche Studien belegt werden konnte, werden die beiden Glukosetransporter SGLT1 und GLUT2 im Intestinaltrakt mit dem Geschmacksrezeptorprotein TAS1R3 coexprimiert und stellen einen Weg der TAS1R-unabhängigen Süßwahrnehmung dar (Yee u. a., 2011; Merigo u. a., 2011; Sukumaran u. a., 2016). Diesbezüglich wurde herausgefunden, dass durch die TAS1R3-Untereinheit des Süßrezeptors sowohl die Expression des passiven Glukosetransportes GLUT2, als auch jene des aktiven Natrium-Glukose-Cotransporters SGLT1 in Nagetieren reguliert wird (Margolskee u. a., 2007; Mace u. a., 2007). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Behandlung der Zellen im CaCo-2 Modell beziehungsweise im Cokultur Modell für 7, 14 oder 21 Tage mit einer Konzentration von 0.1 mM oder einer, zu 5%-iger Sucrose, äquivalenten Konzentration der süß-schmeckenden Verbindungen zu einer mindestens 28-fachen Änderung der *SLC5A1* Expression in der Monokultur beziehungsweise einer 10.78-fachen Änderung der *SLC5A1* Expression in der Cokultur im Vergleich zur undifferenzierten Kontrolle führte, wobei der Nährstofftransporter SGLT1, codiert durch *SLC5A1*,

erst nach der Konfluenz in CaCo-2 Zellen exprimiert wird (Mahraoui u. a., 1994). Anhand der Mustererkennung konnte festgestellt werden, dass ausschließlich Sucrose, in den Konzentrationen 0.1 mM und 150 mM, sowohl in der Monokultur als auch in der Cokultur, zu einer signifikanten Erhöhung der *SLC5A1* Expression nach 14 Tagen, bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle, führte. Zudem konnte mittels der in der Heatmap dargestellten qRT-PCR Ergebnissen der Cokultur detektiert werden, dass ein 14-tägiges Treatment mit 0.1 mM beziehungsweise 150 mM Sucrose eine deutliche Hochregulation der *TAS1R3* Expression hervorrief. Da es sowohl in dieser Arbeit als auch in einem Paper von Esclatine u. a. (2000) Hinweise darauf gibt, dass CaCo-2 Zellen bereits 14 Tage nach dem Ausstreuen vollständig differenziert sind, könnte dieses Ergebnis zum einen darauf hindeuten, dass das Cokultur Modell 14 Tage nach dem Ausstreuen ein verbessertes Modell des humanen Intestinaltrakts darstellt. Zum anderen könnte es darauf verweisen, dass eine *in vivo* Reaktion auf süß-schmeckende Verbindungen beim Menschen, die durch den Süßrezeptor TAS1R2/TAS1R3 im Darm hervorgerufen wird, nur durch kalorische Süßungsmittel zu einer Hochregulierung des SGLT1 Transporters führt.

Weiters zeigten die Resultate dieser Arbeit, dass die Behandlung der CaCo-2 Zellen für 14 Tage mit einer Konzentration von 0.1 mM NHDC und Sucralose in den Konzentrationen 0.1 mM beziehungsweise 0.2 mM zu einer signifikant reduzierten *SLC5A1* Expression, verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle, führte. Entgegen dieser Ergebnisse resultierte das Treatment der Zellen im Cokultur Modell für 7, 14 oder 21 Tage mit einer Konzentration von 0.1 mM oder einer, zu 5%-iger Sucrose, äquisüßen Konzentration der süß-schmeckenden Verbindungen in keiner signifikanten Veränderung der *SLC5A1* Expression. Es konnte kein direkter Zusammenhang zwischen der TAS1R3 Aktivierung und der Expression des *SLC5A1* Gens, wie von Margolskee u. a. (2007) in Mäusen nachgewiesen, für nicht kalorische Süßungsmittel gefunden werden. Margolskee u. a. (2007) haben dabei gezeigt, dass durch die zweiwöchige Fütterung von Wildtyp C57BL/6 Mäusen mit einer kohlenhydratarmen Diät (1.9% Sucrose) und Wasser, welches 2 mM des künstlichen Süßstoffs Sucralose enthielt, die Menge der SGLT1 mRNA in enteroendokrinen Zellen um das 2.1-fache gegenüber den Kontrollmäusen mit kohlenhydratarmem Futter und unversetztem Wasser erhöht war. Ein ähnliches Ergebnis wurde für Wildtyp C57BL/6 Mäuse erzielt, die eine kohlenhydratreiche Diät (70% Sucrose) für zwei Wochen erhielten, wobei die intestinale SGLT1 mRNA um das 1.6-fache höher war als in Mäusen mit kohlenhydratarmer Fütterung. Jedoch konnte kein Effekt von Zucker und

künstlichen Süßstoffen auf die Expression des *Slc5a1* Gens in Knock-out Mäusen, denen die Tas1r3 Süßrezeptoreinheit oder α -Gustducin fehlte, gefunden werden. Diese Ergebnisse haben nahegelegt, dass α -Gustducin und Tas1r3 an der Regulierung der *Slc5a1* Expression als *in vivo* Reaktion auf luminalen Zucker oder Süßstoff in Mäusen beteiligt sind. In einer Studie von Sánchez-Tapia u. a. (2019) wurde beobachtet, dass eine Fütterung von männlichen Wistar Ratten mit Sucrose (10%), Sucralose (1.5%) oder Steviol-Glykosiden (2.5%) im Trinkwasser für einen Zeitraum von vier Monaten zu einer 2.0-, 1.5- beziehungsweise 1.2-fachen, signifikanten Erhöhung der *Slc5a1* Expression in Enterozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe führte. Auch Shi, Zhu, und Deng (2019) konnten nach einer 12 Wochen langen Trinkwasser-Behandlung von männlichen C57BL/6 Mäusen mit Sucralose in den Konzentrationen 0.27, 0.33, 0.4 beziehungsweise 0.47 g/L eine signifikante Hochregulierung der intestinalen *Slc5a1* Expression feststellen. Auch für NHDC konnte durch Moran u. a. (2010) im Darm von Schweinen bereits gezeigt werden, dass das im Trinkwasser enthaltene 0.02 mM NHDC bei Ferkeln, die mit dem kommerziell erhältlichen Standardfutter (43% verdauliche Kohlenhydrate) gefüttert wurden, zu einer 1.6-fachen Erhöhung der *SLC5A1* Expression in enteroendokrinen Zellen im Vergleich zu Ferkeln, die Wasser ohne Süßungsmittel konsumierten, führte. Diese Resultate der unterschiedlichen Studien bestätigten, dass der Rezeptor für den süßen Geschmack im Darm von Mäusen, Ratten und Schweinen durch die genannten Süßungsmittel aktiviert wird, was durch den Anstieg in der *SLC5A1* Expression als Reaktion auf die süß-schmeckende Verbindung in der Nahrung gemessen werden konnte. Die Daten dieser Arbeit deuten darauf hin, dass der Süßrezeptor im humanen Darm nur durch den kalorischen Süßstoff Sucrose aktiviert wird, da eine erhöhte Expression des *SLC5A1* Gens im Cokultur Modell nur durch Sucrose hervorgerufen werden konnte.

Neben der Analyse der Regulation der humanen *SLC5A1* Expression über Süßstoffe erfolgte auch eine Untersuchung des Einflusses auf andere Glukosetransporter. Die Daten dieser Arbeit zeigten dabei, dass die Inkubation der CaCo-2 Zellen für 14 Tage mit 0.2 mM Reb M oder Sucralose in den Konzentrationen 0.1 mM beziehungsweise 0.2 mM zu einer signifikant reduzierten *SLC2A2* Genexpression, welches für GLUT2 codiert, verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle, führte. Gegenüber diesen Resultaten zeigte die Behandlung der Zellen im Cokultur Modell für 7, 14 oder 21 Tage mit einer Konzentration von 0.1 mM oder einer, zu 5%-iger Sucrose, äquisüßen Konzentration der

süß-schmeckenden Verbindungen keine signifikante Veränderung der *SLC2A2* Expression. Eine Hochregulierung des GLUT2 Transporters durch süß-schmeckende Verbindungen, wie bei Sánchez-Tapia u. a. (2019) anhand von Ratten beschrieben, konnte nicht gefunden werden. In dieser Studie von Sánchez-Tapia u. a. (2019) hatte eine Fütterung von männlichen Wistar Ratten für vier Monate mit Standardfutter und Zusatz von Sucrose (10%), Sucralose (1.5%) beziehungsweise Steviol-Glykosiden (2.5%) im Trinkwasser, zu einer erhöhten Expression des *Slc2a2* Gens in Enterozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche sich von Standardfutter und Wasser ernährten, geführt. Auch in der Mausstudie von Shi, Zhu, und Deng (2019) konnte ein signifikanter Anstieg der GLUT2 mRNA in Enterozyten nach der Trinkwasser-Behandlung mit Sucralose in den Konzentrationen 0.27, 0.33, 0.4 beziehungsweise 0.47 g/L für 12 Wochen im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden. Die Konzentrationen der süß-schmeckenden Verbindungen in den beiden Studien lagen bis zu 300-fach über den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen und die Behandlung erfolgte über einen bis zu vier Monate langen Zeitraum. Direkt vergleichbare Studien an humanen *in vitro* Modellen, die einen Einfluss unterschiedlicher Süßungsmittel analysierten, konnten nicht gefunden werden. Unterschiede zwischen den diversen Spezies dürften für das Fehlen der Wirkung von Sucralose auf den Menschen verantwortlich sein. Es wurde diesbezüglich berichtet, dass es bei Menschen eine viel geringere duodenale Expression von *SLC2A2* gibt als bei Ratten und Mäusen, während die Expression von *SLC5A1* bei Menschen im Vergleich zu Nagetieren viel höher ist (Kim u. a., 2007).

Analog der Expression der Glukosetransporter SGLT1 und GLUT2 wird auch K_{ATP} in Geschmackszellen mit der Süßrezeptoruntereinheit TAS1R3 coexprimiert (Yee u. a., 2011; Sukumaran u. a., 2016). Die Resultate dieser Masterarbeit demonstrierten, dass ein Treatment der CaCo-2 Monokultur für 7, 14 oder 21 Tage mit einer Konzentration von 0.1 mM oder einer, zu 5%-iger Sucrose, äquisüßen Konzentration der süß-schmeckenden Verbindungen keine signifikante Veränderung der, für die Kir 6.1 Untereinheit codierenden, *KCNJ8* Genexpression hervorruft. Allerdings zeigte eine 14-tägige Inkubation der Cokultur mit 0.1 mM Sucralose beziehungsweise 0.1 mM NHDC eine signifikante Erhöhung der Genexpression verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle. Im Gegensatz zu diesen Resultaten wies die Behandlung der Zellen im Cokultur Modell für 7, 14 oder 21 Tage mit einer, zu 5%-iger Sucrose, äquisüßen Konzentration der süß-schmeckenden Verbindungen keine signifikante Veränderung der Expression der Kir 6.1 Untereinheit auf. Es

konnten keine vergleichbaren Arbeiten gefunden werden, die einen Einfluss unterschiedlicher süß-schmeckender Testsubstanzen auf die *KCNJ8* Expression in humanen Darmmodellen untersuchten. Yee u. a. (2011) konnten in Mäusen zeigen, dass Glukosetransporter und K_{ATP} in Geschmackszellen, die auf süße Stimuli reagieren, exprimiert werden und neben dem Süßrezeptor TAS1R2/TAS1R3 ebenfalls als Zuckersensoren dienen können. Dieser TAS1R-unabhängige Weg der Süßwahrnehmung würde nur Reaktionen auf Monosaccharide erklären, nicht jedoch auf Disaccharide und Oligosaccharide, welche die Hauptkomponenten diätischer Kohlenhydrate darstellen. Diesbezüglich konnte durch Sukumaran u. a. (2016) anhand von Mäusen herausgefunden werden, dass linguale Geschmackszellen und -gewebe mehrere α -Glycosidasen, unter anderem die α -Amylase, und intestinale Bürstensaum-assoziierte Disaccharid-hydrolysierende Enzyme, wie zum Beispiel Sucrase-Isomaltase, exprimieren, die diätische Zuckeroligomere lokal zu Monosacchariden hydrolysieren. Auf Basis dieser Ergebnisse wurde davon ausgegangen, dass ein ähnlicher Vorgang auch für die Disaccharide im humanen *in vitro* Darmmodell vorhanden ist, wodurch süß-schmeckende Verbindungen, im Speziellen Sucrose, als Substrate für die TAS1R-unabhängige Süßwahrnehmung dienen könnten. Aufgründessen sollte die *KCNJ8* Genexpression durch die Inkubation mit Sucrose stärker hochreguliert werden, während die Behandlung mit Süßstoffen keinen Effekt zeigen sollte, sofern nicht doch eine Verbindung von K_{ATP} zum Süßrezeptor besteht, welche bislang noch nicht erkannt wurde. Allerdings konnte in dieser Arbeit keine signifikant abweichende Beeinflussung der Expression der Kir 6.1 Untereinheit durch das kalorische Süßungsmittel Sucrose verglichen mit den drei nicht kalorischen Süßungsmitteln Reb M, Sucralose und NHDC detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass der ATP-gesteuerter K^+ -Stoffwechselsensor im menschlichen Darm nicht als Sensor für den süßen Geschmack dient.

7. Schlussbetrachtung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine mögliche Optimierung des etablierten *in vitro* Modells der intestinalen Barriere durch die Cokultivierung von CaCo-2 Enterozyten und Mucus-produzierenden HT29-MTX-E12 Becherzellen, in einem Verhältnis von 9:1, untersucht. Um dieses Cokultur Modell vollständig zu charakterisieren und mit dem standardmäßig verwendeten CaCo-2 Darmepithelmodell zu vergleichen, wurden eine transepitheliale elektrische Widerstandsmessung, ein Permeabilitätstest und eine Alcianblau Färbung durchgeführt. Nach der Validierung des neuen, humanen *in vitro* Darmepithelmodells konnte ein möglicher Einfluss der süß-schmeckenden Testsubstanzen Sucrose, Rebaudiosid M (Reb M), Sucralose und Neohesperidin-Dihydrochalcon (NHDC) auf die Expressionlevel der Marker-Gene *SLC5A1* (SGLT1), *SLC2A2* (GLUT2), *TAS1R3* und *KCNJ8* (Kir 6.1) nach einer 7-, 14- oder 21-tägigen Langzeitexposition in einem CaCo-2 Monokultur Modell und in einem Cokultur Modell analysiert werden. Es wurden hierbei je zwei Konzentrationen pro Süßungsmittel getestet, zum einen eine äquimolare Konzentration (0.1 mM) und zum anderen eine, zu 5%-iger Sucrose, äquivalente Konzentration der jeweiligen süß-schmeckenden Verbindung, um einer Rolle der Süßintensität bei der Genexpressionsänderung nachzugehen.

Die Ergebnisse der Cokultur Charakterisierung zeigten, dass die gemeinsame Kultivierung der CaCo-2 Zellen und der HT29-MTX-E12 Zellen den TEER-Wert nach einer 21-tägigen Inkubation im Vergleich zur CaCo-2 Monokultur um rund 22% senkte, was die geringere Anzahl von Tight Junctions in der Cokultur widerspiegelte. Durch die Reduktion der TEER-Werte und der Erhöhung des interzellulären Raums erfolgte eine Annäherung an die realistischen *in vivo* TEER-Werte des Dickdarms, die bei rund 300-400 Ωcm^2 liegen (Powell, 1987; Srinivasan u. a. 2015). Einige Studien haben bereits nachgewiesen, dass durch eine Cokultivierung der Enterozyten mit Mucus-produzierenden Becherzellen nicht nur der TEER-Wert verringert werden kann, sondern auch eine Steigerung der Schleimproduktion hervorgerufen wird (Schimpel u. a., 2014; Pan u. a., 2015; Strugari u. a., 2018). Analog dieser Beobachtungen aus der Literatur, konnte auch im Zuge dieser Arbeit mittels Alcianblau Färbung eine Erhöhung der Mucushöhe im Cokultur Modell visualisiert werden. Der Lucifer Yellow Permeabilitätstest legte jedoch keinen statistisch signifikanten Einfluss der HT29-MTX-E12 Zellen, im Cokultur Modell, auf die parazelluläre Permeabilität im Vergleich zum etablierten Monokultur Modell dar. Anhand der generierten Daten konnte festgestellt werden, dass sich mit steigender Kultivierungszeit

die Permeabilitätskoeffizienten, sowie die parazelluläre Permeabilitäten der untersuchten Zellmodelle immer weiter annäherten. Zusammengefasst konnte durch die Reduktion der TEER-Werte, der Steigerung der Mucusproduktion und der beinahe unveränderten parazellulären Permeabilität, das Cokultur Modell als eine verbesserte Version des CaCo-2 Modells charakterisiert werden, wodurch die erste Hypothese bestätigt werden konnte. Interessanterweise konnte zudem durch die Assays der Modell Charakterisierung demonstriert werden, dass sowohl das CaCo-2 Modell als auch das Cokultur Modell bereits nach 14-tägiger Kultivierung spezifische Eigenschaften der humanen intestinalen Barriere zeigten und möglicherweise schon 14 Tage nach dem Ausstreuen als *in vitro* Darmmodelle fungieren könnten.

Bei der Analyse der Veränderung der Genexpression durch die Langzeitbehandlung mit den vier süß-schmeckenden Verbindungen in jeweils zwei Konzentrationen, konnte keine signifikante Auswirkung auf die Expression der Kir 6.1 Untereinheit des ATP-gesteuerten K^+ -Stoffwechselsensors und der Süßrezeptor-Untereinheit TAS1R3 im CaCo-2 Modell, und auf die Expression des Natrium-Glukose-Cotransporters SGLT1 und des Glukosetransporters GLUT2 im Cokultur Modell gefunden werden. Aufgrund der Tatsache, dass die süß-schmeckenden Testsubstanzen in einer äquisüßen Konzentration zugegeben wurden, wurde erwartet, dass kein Unterschied zwischen dem Expressionslevel eines Gens nach der Behandlung für 7, 14 oder 21 Tage zwischen den Substanzen zu sehen ist. Anhand der qRT-PCR Ergebnisse konnte aber erkannt werden, dass für einige Gene dennoch Unterschiede in den Genexpressionsleveln detektierbar sind. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Änderung der Genexpression nicht von der Süße der Testsubstanz abhängig war, sondern substanzspezifische Effekte auf die Expression eines bestimmten Gens beobachtet werden konnten. Generell wurde deutlich, dass der Einfluss der süß-schmeckenden Verbindungen im Cokultur Modell nur selten eine statistische Signifikanz erreichte, was auf eine mögliche Interferenz der HT29-MTX-E12 Zellen mit der Expression der untersuchten Marker-Gene deutete. Untersuchungen an Nagetieren konnten bereits zeigen, dass durch die TAS1R3-Untereinheit des Süßrezeptors sowohl die Expression des passiven Glukosetransportes GLUT2, als auch jene des aktiven Natrium-Glukose-Cotransporters SGLT1 reguliert werden (Margolskee u. a., 2007; Mace u. a., 2007). Hinweise auf eine derartige Regulation der Glukosetransporter durch TAS1R3 im humanen Darmepithelmodell konnten in dieser Arbeit ausschließlich durch Sucrose in den Konzentrationen 0.1 mM und 150 mM erfasst werden. Dabei wies

die Cokultur sowohl eine signifikante Erhöhung der *TAS1R3* als auch der *SLC5A1* Expression nach 14 Tagen auf, wenn die Daten auf die Lösungsmittelkontrolle bezogen wurden. Da es in dieser Arbeit auch bei der Modellvalidierung erste Anzeichen dafür gab, dass die CaCo-2 Zellen bereits 14 Tage nach dem Ausstreuen über einen ausgeprägten Differenzierungsgrad verfügen, könnte dieses Genexpressionsergebnis darlegen, dass das Cokultur Modell nach 14-tägiger Inkubation tatsächlich ein optimiertes Modell der humanen *in vitro* Darmepithelbarriere darstellt. Zusätzlich indiziert das Ergebnis, dass eine humane *in vivo* Reaktion auf süß-schmeckende Verbindungen, hervorgerufen durch den intestinalen Süßrezeptor TAS1R2/TAS1R3, nur durch kalorische Süßungsmittel zu einer Hochregulierung der *SLC5A1* Expression führt, nicht aber der *SLC2A2* Expression.

Anhand der Kultivierung der Zellenmodelle mit den süß-schmeckenden Verbindungen in einer äquimolaren Konzentration konnte gezeigt werden, dass die Süßintensität der einzelnen Testsubstanzen keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression der untersuchten Gene hatte. Basierend auf Ergebnissen von Yee u.a. (2011) und Sukumaran u. a. (2016) wurde davon ausgegangen, dass süß-schmeckende Kohlenhydrate, im Speziellen Sucrose, als Substrate für die TAS1R-unabhängige Süßwahrnehmung dienen könnten. Daher sollte die Langzeitbehandlung mit Sucrose die *KCNJ8* Expression stärker hochregulieren, während die Behandlung mit Süßstoffen keinen Effekt zeigen sollte, sofern nicht doch eine bislang unbekannte Konnektivität zwischen Kir 6.1 und dem Süßrezeptor besteht. Jedoch wurde in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter abweichender Einfluss des kalorischen Süßungsmittels Sucrose von den nicht kalorischen Süßungsmitteln detektiert. Dies deutet darauf hin, dass der ATP-gesteuerte K⁺-Stoffwechselsensor im menschlichen Darm nicht als Sensor für den süßen Geschmack dient. Die im Rahmen der Fragestellung formulierte Hypothese, dass die mehrwöchige Exposition einer CaCo-2 Monokultur und eines Cokultur-Modells mit süß-schmeckenden Testsubstanzen einen Einfluss auf die Expression von Marker-Genen hat, konnte nur teilweise verifiziert werden.

Generell wäre für die vollständige Validierung des optimierten *in vitro* Cokultur Modells der intestinalen Barriere eine morphologische Charakterisierung mittels Rasterelektronenmikroskopie oder Transmissionselektronenmikroskopie von Interesse, um zwischen den beiden Zelltypen zu unterscheiden und morphologische Veränderungen an der Zell-

oberfläche zu evaluieren. Für zukünftige Forschung wäre auch relevant, welche Auswirkungen die hier getesteten Süßungsmittel auf die unterschiedlichen Assays der Modell Validierung haben, um mögliche Effekte der süß-schmeckenden Verbindungen auf die Tight Junction Dichte, die Mucusproduktion und die einhergehende parazelluläre Permeabilität zu beleuchten. Zusätzlich wäre es interessant, ob eine längere Exposition mit kalorischen und nicht kalorischen Süßungsmitteln die Glukoseabsorption im Darm des Menschen wie bei den Mäusen erhöhen kann (Margolskee u. a., 2007) oder ob es beim Menschen zu Süßungsmittel-spezifischen Reaktionen führt.

Aufgrund der, in der vorliegenden Arbeit, erhaltenen Indizien, dass das CaCo-2 Modell, sowie das Cokultur Modell bereits nach 14-tägiger Kultivierung vollständig differenziert sind und durch eine 21-tägige Inkubation überdifferenziert werden, könnte in einem nächsten Schritt eine weitere Genexpressionsanalyse erfolgen. Dafür könnten die, im Rahmen dieser Arbeit, gewonnenen cDNA Proben nach der zweiwöchigen Inkubation mittels qRT-PCR auf Differenzierungsmarker wie Sucrase Isomaltase, oder Alkaline Phosphatase getestet werden und den Genexpressionsprofilen der cDNA Proben nach der dreiwöchigen Kultivierung gegenübergestellt werden. Sollte dabei kein signifikanter Unterschied erkennbar sein, so könnten die CaCo-2 Monokultur und die Cokultur, bestehend aus CaCo-2 Zellen und HT29-MTX-E12 Zellen, bereits nach 14 Tagen, die intestinale Barriere modellhaft imitieren und wären somit für Folgeexperimente geeignet.

8. Zusammenfassung

Durch den Einsatz von kalorienarmen Süßstoffen kann der Kaloriengehalt von Lebensmitteln reduziert und gleichzeitig der süße Geschmack aufrechterhalten werden, wodurch das Risiko für Übergewicht und Adipositas gesenkt und der damit assoziierten Pathogenese von Folgeerkrankungen entgegengewirkt werden kann. Die Folgen einer Exposition mit natürlichen oder künstlichen Süßstoffen auf die intestinale Genexpression wurden bisher nur in Nagetieren, nicht aber in humanen Darmepithelmodellen untersucht. Zunächst wurde daher in dieser Arbeit das etablierte *in vitro* Modell der humanen intestinalen Barriere optimiert, welches zuvor einige Limitationen mit sich brachte, indem eine Cokultivierung von CaCo-2 Enterozyten und Mucus-produzierenden HT29-MTX-E12 Zellen, in einem Verhältnis 9:1, erfolgte. Für die Modell-Charakterisierung wurden eine TEER-Messung, ein Permeabilitätstest mit Lucifer Yellow und eine Alcianblau Mucus-Färbung durchgeführt. Die Charakterisierungsergebnisse der Cokultur zeigten eine Senkung der TEER-Werte, eine erhöhte Schleimproduktion und eine *in vivo* ähnliche parazelluläre Permeabilität. Nach der Validierung des verbesserten *in vitro* Darmepithelmodells wurde ein möglicher Einfluss einer mehrwöchigen Süßungsmittelexposition auf die Expression der, an der Süßwahrnehmung beteiligten, Marker-Gene *TAS1R3*, *SLC2A2* (GLUT2), *SLC5A1* (SGLT1) und *KCNJ8* (Kir 6.1) in dem Cokultur Modell untersucht und mit jener des etablierten CaCo-2 Modells verglichen. Dafür erfolgte eine dreiwöchige Behandlung der beiden Zellmodelle mit jeweils zwei Konzentrationen der süß-schmeckenden Verbindungen Sucrose (0.1 mM, 150 mM), Rebaudiosid M (0.1 mM, 0.2 mM), Sucralose (0.1 mM, 0.2 mM) und Neohesperidin-Dihydrochalcon (0.1 mM). Die generierten Daten zeigten, dass die Expressionsveränderung im Cokultur Modell nur selten eine statistische Signifikanz erreichte, was auf einen Einfluss der HT29-MTX-E12 Zellen auf die Expression der untersuchten Gene deutete. Hinweise, wie aus der Literatur für Nagetiere evident, auf eine Regulation der Glukosetransporter durch *TAS1R3* im humanen Darmepithelmodell konnten in dieser Arbeit ausschließlich durch Sucrose erhalten werden. Die Cokultur wies dabei sowohl eine signifikante Erhöhung der *TAS1R3* als auch der *SLC5A1* Expression nach der 14-tägigen Behandlung auf. Ein Einfluss der Süßintensität der Verbindungen auf die Genexpression konnte durch das Treatment mit äquimolaren Konzentrationen ausgeschlossen werden. Gemeinsam mit Indizien aus der Modellvalidierung deuteten die Genexpressionsergebnisse auf eine vollständige Differenzierung der beiden Zellmodelle nach einer Kultivierung für 14 Tage, jedoch muss dies durch zukünftige Forschungsarbeit definitiv belegt werden.

9. Summary

One way to reduce the energy content of foods while maintaining the sweet taste is the application of low-caloric sweeteners, which lower the risk of excess weight and obesity and thus counteract associated secondary diseases such as type II diabetes mellitus and cardiovascular diseases. So far, consequences of the exposure to natural or artificial sweeteners on gene expression have only been investigated in rodents, but not in models of the human intestine. This master thesis started with the optimization of the established model of the human intestinal barrier, which previously entailed some limitations. Therefore, a cocultivation of the absorptive CaCo-2 enterocytes and mucus-producing HT29-MTX-E12 goblet cells, in a ration 9:1, was tested. For the characterization of this new model, a transepithelial electrical resistance measurement (TEER), a paracellular permeability test with Lucifer Yellow to check the integrity of the cell monolayer and an Alcian blue staining to visualize the produced amount of mucus, were conducted. The generated characterization results showed a reduction of the TEER by 22%, an increased mucus production and an *in vivo* like paracellular permeability. Following the validation of the improved *in vitro* model of the intestinal barrier, a possible sweetener influence on the expression of the marker genes *TAS1R3*, *SLC2A2* (GLUT2), *SLC5A1* (SGLT1) and *KCNJ8* (Kir 6.1), which are involved in the perception of sweet taste, was examined in the coculture model and afterwards compared with the CaCo-2 model. For this purpose, the two cell models were treated with two different concentrations of the sweet-tasting compounds sucrose (0.1 mM, 150 mM), rebaudioside M (0.1 mM, 0.2 mM), sucralose (0.1 mM, 0.2 mM) and neohesperidin dihydrochalcone (0.1 mM) for three weeks. The obtained data suggested that the change of the gene expression in the coculture model rarely reached statistical significance, pointing out an influence of the HT29-MTX-E12 on the expression of the examined genes. Indications, as evident in the literature for rodents, on a possible regulation of glucose transporters by *TAS1R3* were only obtained by sucrose in both concentrations. Thereby, the coculture showed a significant increase in *TAS1R3* expression as well as an upregulation of *SLC5A1* after fourteen days of treatment. Furthermore, by the usage of equimolar concentrations it was shown that there was no influence of the sweetness intensity on the expression of the marker genes. Together with hints from the coculture model validation, the gene expression results suggest a completed differentiation process of the two cell models after a cultivation period of fourteen days. This observation has to be validated in future studies.

10. Referenzen

- Abaffy, Tatjana, Kristina R. Trubey, und Nirupa Chaudhari. 2003. „Adenylyl Cyclase Expression and Modulation of CAMP in Rat Taste Cells“. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 284 (6): C1420-1428. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00556.2002>.
- Abal, Paula, M. Carmen Louzao, María Fraga, Natalia Vilariño, Sara Ferreiro, Mercedes R. Vieytes, und Luis M. Botana. 2017. „Absorption and Effect of Azaspiracid-1 Over the Human Intestinal Barrier“. *Cellular Physiology and Biochemistry* 43 (1): 136–46. <https://doi.org/10.1159/000480331>.
- Anderson, J. M. 2001. „Molecular Structure of Tight Junctions and Their Role in Epithelial Transport“. *News in Physiological Sciences: An International Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* 16 (Juni): 126–30. <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2001.16.3.126>.
- Arnemann, J. 2019. „DNA-/RNA-Konzentrationsbestimmung“. In *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, herausgegeben von Axel M. Gressner und Torsten Arndt, 719–719. Springer Reference Medizin. Berlin, Heidelberg: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_3464.
- Artursson, P., und J. Karlsson. 1991. „Correlation between Oral Drug Absorption in Humans and Apparent Drug Permeability Coefficients in Human Intestinal Epithelial (Caco-2) Cells“. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 175 (3): 880–85. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(91\)91647-u](https://doi.org/10.1016/0006-291x(91)91647-u).
- Artursson, P., K. Palm, und K. Luthman. 2001. „Caco-2 Monolayers in Experimental and Theoretical Predictions of Drug Transport“. *Advanced Drug Delivery Reviews* 46 (1–3): 27–43. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00128-9](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00128-9).
- Atta-ur-Rahman. 2005. *Studies in Natural Products Chemistry: Bioactive Natural Products (Part K)*. Bd. K. 30.

Bates, S. L., K. A. Sharkey, und J. B. Meddings. 1998. „Vagal Involvement in Dietary Regulation of Nutrient Transport“. *The American Journal of Physiology* 274 (3): G552–560. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1998.274.3.G552>.

Behrens, I., P. Stenberg, P. Artursson, und T. Kissel. 2001. „Transport of Lipophilic Drug Molecules in a New Mucus-Secreting Cell Culture Model Based on HT29-MTX Cells“. *Pharmaceutical Research* 18 (8): 1138–45. <https://doi.org/10.1023/a:1010974909998>.

Behrens, Maik, und Wolfgang Meyerhof. 2011. „Gustatory and Extragustatory Functions of Mammalian Taste Receptors“. *Physiology & Behavior* 105 (1): 4–13. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.02.010>.

Beidler, Lewis M. 1982. „The Psychobiology of Human Food Selection“. In , 3–15. Chichester: Ellis Horwood Limited.

Benavente-García, O., und J. Castillo. 2008. „Update on Uses and Properties of Citrus Flavonoids: New Findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-Inflammatory Activity“. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (15): 6185–6205. <https://doi.org/10.1021/jf8006568>.

Berridge, M. V., und A. S. Tan. 1993. „Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction“. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 303 (2): 474–82. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1311>.

Berridge, Michael V, An Sen Tan, Kathy D. McCoy, und Rui Wang. 1993. „The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts | Semantic Scholar“ 303 (2): 14–19.

Berry, Colin, David Brusick, Samuel M. Cohen, Jerry F. Hardisty, V. Lee Grotz, und Gary M. Williams. 2016. „Sucralose Non-Carcinogenicity: A Review of the Scientific and Regulatory Rationale“. *Nutrition and Cancer* 68 (8): 1247–61. <https://doi.org/10.1080/01635581.2016.1224366>.

- Bezençon, Carole, Johannes le Coutre, und Sami Damak. 2007. „Taste-Signaling Proteins Are Coexpressed in Solitary Intestinal Epithelial Cells“. *Chemical Senses* 32 (1): 41–49. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjl034>.
- Bilgin, Damla D., Evan H. DeLucia, und Steven J. Clough. 2009. „A Robust Plant RNA Isolation Method Suitable for Affymetrix GeneChip Analysis and Quantitative Real-Time RT-PCR“. *Nature Protocols* 4 (3): 333–40. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.249>.
- Böck, Peter. 1984. „Alcianblau und Alcianblau-PAS“. In *Der Semidünnschnitt*, herausgegeben von Peter Böck, 122–23. Munich: J.F. Bergmann-Verlag. https://doi.org/10.1007/978-3-642-80506-6_43.
- Bojahr, Juliane. 2015. „Aktivierung des humanen Süßgeschmacksrezeptors im zellbasierten Testsystem“. Potsdam: Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Potsdam.
- Boone, Morgane, Andries De Koker, und Nico Callewaert. 2018. „Capturing the ‚Ome‘: The Expanding Molecular Toolbox for RNA and DNA Library Construction“. *Nucleic Acids Research* 46 (6): 2701–21. <https://doi.org/10.1093/nar/gky167>.
- Bornemann, Volker, Stephen C. Werness, Lauren Buslinger, und Susan S. Schiffman. 2018. „Intestinal Metabolism and Bioaccumulation of Sucralose In Adipose Tissue In The Rat“. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* 81 (18): 913–23. <https://doi.org/10.1080/15287394.2018.1502560>.
- Bourguine, Joanna, Ingrid Billaut-Laden, Mélanie Happillon, Jean-Marc Lo-Guidice, Vincent Maunoury, Michel Imbenotte, und Franck Broly. 2012. „Gene Expression Profiling of Systems Involved in the Metabolism and the Disposition of Xenobiotics: Comparison between Human Intestinal Biopsy Samples and Colon Cell Lines“. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 40 (4): 694–705. <https://doi.org/10.1124/dmd.111.042465>.

Braune, Annett, Wolfram Engst, und Michael Blaut. 2005. „Degradation of Neohesperidin Dihydrochalcone by Human Intestinal Bacteria“. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (5): 1782–90. <https://doi.org/10.1021/jf0484982>.

Briske-Anderson, M. J., J. W. Finley, und S. M. Newman. 1997. „The Influence of Culture Time and Passage Number on the Morphological and Physiological Development of Caco-2 Cells“. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 214 (3): 248–57. <https://doi.org/10.3181/00379727-214-44093>.

Burant, C. F., J. Takeda, E. Brot-Laroche, G. I. Bell, und N. O. Davidson. 1992. „Fructose Transporter in Human Spermatozoa and Small Intestine Is GLUT5“. *The Journal of Biological Chemistry* 267 (21): 14523–26.

Burke, Mary V., und Dana M. Small. 2015. „Physiological mechanisms by which non-nutritive sweeteners may impact body weight and metabolism“. *Physiology & behavior* 152 (0 0): 381–88. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.05.036>.

Burton, P. S., R. A. Conradi, N. F. Ho, A. R. Hilgers, und R. T. Borchardt. 1996. „How Structural Features Influence the Biomembrane Permeability of Peptides“. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85 (12): 1336–40. <https://doi.org/10.1021/js960067d>.

Burton, Philip S., Jay T. Goodwin, Robert A. Conradi, Norman F. H. Ho, und Allen R. Hilgers. 1997. „In Vitro Permeability of Peptidomimetic Drugs: The Role of Polarized Efflux Pathways as Additional Barriers to Absorption“. *Advanced Drug Delivery Reviews, In Vitro Models for Selection of Development Candidates*, 23 (1): 143–56. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00432-2](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00432-2).

Bustin, Stephen, und Jim Huggett. 2017. „qPCR primer design revisited“. *Biomolecular Detection and Quantification* 14 (November): 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.001>.

- Caballero, Benjamin, Paul Finglas, und Luiz Trugo, Hrsg. 2003. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition - 2nd Edition*. San Diego: Academic Press. <https://www.elsevier.com/books/encyclopedia-of-food-sciences-and-nutrition/9780122270550>.
- Chaudhari, Nirupa, und Stephen D. Roper. 2010. „The Cell Biology of Taste“. *The Journal of Cell Biology* 190 (3): 285–96. <https://doi.org/10.1083/jcb.201003144>.
- Cheeseman, C. I. 1993. „GLUT2 Is the Transporter for Fructose across the Rat Intestinal Basolateral Membrane“. *Gastroenterology* 105 (4): 1050–56. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(93\)90948-c](https://doi.org/10.1016/0016-5085(93)90948-c).
- Chen, Junming, Yongmei Xia, Xiaochen Sui, Qingrui Peng, Tongtong Zhang, Jian Li, und Jue Zhang. 2018. „Steviol, a natural product inhibits proliferation of the gastrointestinal cancer cells intensively“. *Oncotarget* 9 (41): 26299–308. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25233>.
- Chen, Xiu-Min, Ingrid Elisia, und David D. Kitts. 2010. „Defining Conditions for the Co-Culture of Caco-2 and HT29-MTX Cells Using Taguchi Design“. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 61 (3): 334–42. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2010.02.004>.
- Cirera, Susanna. 2013. „Highly efficient method for isolation of total RNA from adipose tissue“. *BMC Research Notes* 6 (1): 472. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-472>.
- Clapp, T. R., L. M. Stone, R. F. Margolskee, und S. C. Kinnamon. 2001. „Immunocytochemical Evidence for Co-Expression of Type III IP3 Receptor with Signaling Components of Bitter Taste Transduction“. *BMC Neuroscience* 2: 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-2-6>.
- Collins, Andrew R. 2004. „The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations“. *Molecular Biotechnology* 26 (3): 249–61. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>.

Damak, Sami, Mingqing Rong, Keiko Yasumatsu, Zaza Kokrashvili, Cristian A. Pérez, Noriatsu Shigemura, Ryusuke Yoshida, u. a. 2006. „Trpm5 Null Mice Respond to Bitter, Sweet, and Umami Compounds“. *Chemical Senses* 31 (3): 253–64. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjj027>.

Damak, Sami, Mingqing Rong, Keiko Yasumatsu, Zaza Kokrashvili, Vijaya Varadarajan, Shiyong Zou, Peihua Jiang, Yuzo Ninomiya, und Robert F. Margolskee. 2003. „Detection of Sweet and Umami Taste in the Absence of Taste Receptor T1r3“. *Science (New York, N.Y.)* 301 (5634): 850–53. <https://doi.org/10.1126/science.1087155>.

Di Pizio, Antonella, Yaron Ben Shoshan-Galeczki, John E. Hayes, und Masha Y. Niv. 2019. „Bitter and Sweet Tasting Molecules: It’s Complicated“. *Neuroscience Letters* 700: 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.04.027>.

Drexler, Hans G., und Cord C. Uphoff. 2002. „Mycoplasma Contamination of Cell Cultures: Incidence, Sources, Effects, Detection, Elimination, Prevention“. *Cytotechnology* 39 (2): 75–90. <https://doi.org/10.1023/A:1022913015916>.

Dubey, Dr R. C. 2005. *A Textbook Of Biotechnology For Class-XII*. S. Chand Publishing.

DuBois, G. E., G. A. Crosby, und R. A. Stephenson. 1981. „Dihydrochalcone Sweeteners. A Study of the Atypical Temporal Phenomena“. *Journal of Medicinal Chemistry* 24 (4): 408–28. <https://doi.org/10.1021/jm00136a011>.

DuBois, G. E., G. A. Crosby, R. A. Stephenson, und R. E. Wingard. 1977. „Dihydrochalcone Sweeteners. Synthesis and Sensory Evaluation of Sulfonate Derivatives“. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 25 (4): 763–72. <https://doi.org/10.1021/jf60212a056>.

Dvoryanchikov, Gennady, Seth M. Tomchik, und Nirupa Chaudhari. 2007. „Biogenic Amine Synthesis and Uptake in Rodent Taste Buds“. *The Journal of Comparative Neurology* 505 (3): 302–13. <https://doi.org/10.1002/cne.21494>.

- Dyer, J., K. S. H. Salmon, L. Zibrik, und S. P. Shirazi-Beechey. 2005. „Expression of Sweet Taste Receptors of the T1R Family in the Intestinal Tract and Enteroendocrine Cells“. *Biochemical Society Transactions* 33 (Pt 1): 302–5. <https://doi.org/10.1042/BST0330302>.
- Dyer, Jane, Steven Vayro, Timothy P. King, und Soraya P. Shirazi-Beechey. 2003. „Glucose Sensing in the Intestinal Epithelium“. *European Journal of Biochemistry* 270 (16): 3377–88. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03721.x>.
- EFSA. 2010. „Scientific Opinion on the Safety of Steviol Glycosides for the Proposed Uses as a Food Additive“. *EFSA Journal* 8 (4): 1537. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1537>.
- Esclatine, Audrey, Michel Lemullois, Alain L. Servin, Anne-Marie Quero, und Monique Geniteau-Legendre. 2000. „Human Cytomegalovirus Infects Caco-2 Intestinal Epithelial Cells Basolaterally Regardless of the Differentiation State“. *Journal of Virology* 74 (1): 513–17. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.1.513-517.2000>.
- FDA. 1999. „Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption; Sucralose“. Federal Register. <https://www.federalregister.gov/documents/1999/08/12/99-20888/food-additives-permitted-for-direct-addition-to-food-for-human-consumption-sucralose>.
- Fernstrom, John D. 2015. „Non-Nutritive Sweeteners and Obesity“. *Annual Review of Food Science and Technology* 6: 119–36. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015635>.
- Fernstrom, John D., Steven D. Munger, Anthony Sclafani, Ivan E. de Araujo, Ashley Roberts, und Samuel Molinary. 2012. „Mechanisms for Sweetness“. *The Journal of Nutrition* 142 (6): 1134S–1141S. <https://doi.org/10.3945/jn.111.149567>.

Ferraretto, Anita, Michela Bottani, Paola De Luca, Laura Cornaghi, Francesca Arnaboldi, Margherita Maggioni, Amelia Fiorilli, und Elena Donetti. 2018. „Morphofunctional properties of a differentiated Caco2/HT-29 co-culture as an in vitro model of human intestinal epithelium“. *Bioscience Reports* 38 (2). <https://doi.org/10.1042/BSR20171497>.

Ferraretto, Anita, Claudia Gravaghi, Elena Donetti, Stefania Cosentino, Bianca M. Donida, Marzia Bedoni, Giovanni Lombardi, Amelia Fiorilli, und Guido Tettamanti. 2007. „New Methodological Approach to Induce a Differentiation Phenotype in Caco-2 Cells Prior to Post-Confluence Stage“. *Anticancer Research* 27 (6B): 3919–25.

Finger, Thomas E., Vicktoria Danilova, Jennell Barrows, Dianna L. Bartel, Alison J. Vigers, Leslie Stone, Goran Hellekant, und Sue C. Kinnamon. 2005. „ATP Signaling Is Crucial for Communication from Taste Buds to Gustatory Nerves“. *Science (New York, N.Y.)* 310 (5753): 1495–99. <https://doi.org/10.1126/science.1118435>.

Fogh, J., J. M. Fogh, und T. Orfeo. 1977. „One Hundred and Twenty-Seven Cultured Human Tumor Cell Lines Producing Tumors in Nude Mice“. *Journal of the National Cancer Institute* 59 (1): 221–26. <https://doi.org/10.1093/jnci/59.1.221>.

Fogh, Jørgen, und Germain Trempe. 1975. „New Human Tumor Cell Lines“. In *Human Tumor Cells in Vitro*, herausgegeben von Jørgen Fogh, 115–59. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-1647-4_5.

Forstner, J.F., und G.G. Forstner. 1994. „Physiology of the Gastrointestinal Tract“. In , 3. Aufl. New York: Raven Press.

Frank, Guido K. W., Tyson A. Oberndorfer, Alan N. Simmons, Martin P. Paulus, Julie L. Fudge, Tony T. Yang, und Walter H. Kaye. 2008. „Sucrose Activates Human Taste Pathways Differently from Artificial Sweetener“. *NeuroImage* 39 (4): 1559–69. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2007.10.061>.

- Geuns, Jan M. C., Patrick Augustijns, Raf Mols, Johan G. Buyse, und Bert Driessen. 2003. „Metabolism of Stevioside in Pigs and Intestinal Absorption Characteristics of Stevioside, Rebaudioside A and Steviol“. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 41 (11): 1599–1607. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(03\)00191-1](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(03)00191-1).
- Geuns, Jan M. C., Johan Buyse, Annelies Vankeirsbilck, und Elisabeth H. M. Temme. 2007. „Metabolism of Stevioside by Healthy Subjects“. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 232 (1): 164–73.
- Gibson, Sigrid, Pippa Gunn, Anna Wittekind, und Richard Cottrell. 2013. „The Effects of Sucrose on Metabolic Health: A Systematic Review of Human Intervention Studies in Healthy Adults“. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53 (6): 591–614. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.691574>.
- Glendinning, John I., Lindsey Breinager, Emily Kyrillou, Kristine Lacuna, Rotsen Rocha, und Anthony Sclafani. 2010. „Differential effects of sucrose and fructose on dietary obesity in four mouse strains“. *Physiology & behavior* 101 (3): 331–43. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.06.003>.
- Glória, M.B.A. 2003. „Sweeteners: others“. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, herausgegeben von Benjamin Caballero, Paul Finglas, und Luiz Trugo, 5695–5702. San Diego: Academic Press.
- Gonzales, Gerard Bryan, John Van Camp, Hanne Vissenaekens, Katleen Raes, Guy Smagghe, und Charlotte Grootaert. 2015. „Review on the Use of Cell Cultures to Study Metabolism, Transport, and Accumulation of Flavonoids: From Mono-Cultures to Co-Culture Systems“. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14 (6): 741–54. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12158>.
- Grotz, V. Lee, und Ian C. Munro. 2009. „An Overview of the Safety of Sucralose“. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 55 (1): 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2009.05.011>.

Gstraunthaler, Gerhard, und Toni Lindl. 2013. *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. 7. Aufl. Springer Spektrum. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-35997-2>.

Guil-Guerrero, José Luis, Rebeca Ramos-Bueno, Ignacio Rodríguez-García, und Cristóbal López-Sánchez. 2011. „Cytotoxicity Screening of Several Tomato Extracts“. *Journal of Medicinal Food* 14 (1–2): 40–45. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0051>.

Haller, Dirk, Tilman Grune, und Gerald Rimbach, Hrsg. 2013. *Biofunktionalität der Lebensmittelinhaltsstoffe*. Springer-Lehrbuch. Springer Spektrum. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-29374-0>.

Han, Ga Eun, Hee-Taik Kang, Sungkyun Chung, Changjin Lim, John A. Linton, Jin-Hee Lee, Wooki Kim, Seok-Ho Kim, und Jong Hun Lee. 2018. „Novel Neohesperidin Dihydrochalcone Analogue Inhibits Adipogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells through the Nrf2 Pathway“. *International Journal of Molecular Sciences* 19 (8). <https://doi.org/10.3390/ijms19082215>.

Hekmati, M., S. Polak-Charcon, und Y. Ben-Shaul. 1990. „A Morphological Study of a Human Adenocarcinoma Cell Line (HT29) Differentiating in Culture. Similarities to Intestinal Embryonic Development“. *Cell Differentiation and Development: The Official Journal of the International Society of Developmental Biologists* 31 (3): 207–18. [https://doi.org/10.1016/0922-3371\(90\)90133-h](https://doi.org/10.1016/0922-3371(90)90133-h).

Hennebicq-Reig, S., D. Tetaert, B. Soudan, I. Kim, G. Huet, G. Briand, C. Richet, D. Demeyer, und P. Degand. 1997. „O-Glycosylation and Cellular Differentiation in a Subpopulation of Mucin-Secreting HT-29 Cell Line“. *Experimental Cell Research* 235 (1): 100–107. <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3638>.

Hidalgo, I. J. 1996. „Cultured Intestinal Epithelial Cell Models“. *Pharmaceutical Biotechnology* 8: 35–50. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1863-5_3.

- Hidalgo, I. J., T. J. Raub, und R. T. Borchardt. 1989. „Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability“. *Gastroenterology* 96 (3): 736–49.
- Hilgendorf, C., H. Spahn-Langguth, C. G. Regårdh, E. Lipka, G. L. Amidon, und P. Langguth. 2000. „Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX Co-Cultured Cell Lines: Permeabilities via Diffusion, inside- and Outside-Directed Carrier-Mediated Transport“. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 89 (1): 63–75. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6017\(200001\)89:1<63::AID-JPS7>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6017(200001)89:1<63::AID-JPS7>3.0.CO;2-6).
- Hoppe, Edmund, Nicola J. Hewitt, Hans-Peter Buchstaller, Hans-Michael Eggenweiler, Christian Sirrenberg, Astrid Zimmermann, Joachim März, u. a. 2014. „A Novel Strategy for ADME Screening of Prodrugs: Combined Use of Serum and Hepatocytes to Integrate Bioactivation and Clearance, and Predict Exposure to Both Active and Prodrug to the Systemic Circulation“. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 103 (5): 1504–14. <https://doi.org/10.1002/jps.23942>.
- Hossain, Zakir, und Koretaro Takahashi. 2008. „Induction of Permeability and Apoptosis in Colon Cancer Cell Line with Chitosan“. *Journal of Food and Drug Analysis* 16 (5): 1–8.
- Huang, Yi-Jen, Yutaka Maruyama, Gennady Dvoryanchikov, Elizabeth Pereira, Nirupa Chaudhari, und Stephen D. Roper. 2007. „The Role of Pannexin 1 Hemichannels in ATP Release and Cell-Cell Communication in Mouse Taste Buds“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (15): 6436–41. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611280104>.
- Huet, C., C. Sahuquillo-Merino, E. Coudrier, und D. Louvard. 1987. „Absorptive and Mucus-Secreting Subclones Isolated from a Multipotent Intestinal Cell Line (HT-29) Provide New Models for Cell Polarity and Terminal Differentiation“. *The Journal of Cell Biology* 105 (1): 345–57. <https://doi.org/10.1083/jcb.105.1.345>.

Hutapea, AM, C Toskulkao, D Buddhasukh, P Wilairat, und Glinsukon. 1997. „Digestion of stevioside, a natural sweetener, by various digestive enzymes“. *J Clin Biochem Nutr.* 23 (3): 177–86. <https://doi.org/10.3164/jcbn.23.177>.

Imberti, Silvia, Sylvia E. McLain, Natasha H. Rhys, Fabio Bruni, und Maria Antonietta Ricci. 2019. „Role of Water in Sucrose, Lactose, and Sucralose Taste: The Sweeter, The Wetter?“ *ACS Omega* 4 (27): 22392–98. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02794>.

International Diabetes Federation. 2016. „IDF EUROPE POSITION ON ADDED SUGAR“. https://www.eu-patient.eu/globalassets/library/publications/added-sugar-final_idf-europe-position.pdf.

ISO 10993-5. 2009. *2009 Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity. International Organization for Standardization*. Genf, Schweiz.

Jang, Hyeung-Jin, Zaza Kokrashvili, Michael J. Theodorakis, Olga D. Carlson, Byung-Joon Kim, Jie Zhou, Hyeon Ho Kim, u. a. 2007. „Gut-Expressed Gustducin and Taste Receptors Regulate Secretion of Glucagon-like Peptide-1“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (38): 15069–74. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706890104>.

Janssen, Sara, und Inge Depoortere. 2013. „Nutrient Sensing in the Gut: New Roads to Therapeutics?“ *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 24 (2): 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.11.006>.

Jawetz, Ernest, Joseph L. Melnik, und Edward A. Adelberg. 2013. *Medizinische Mikrobiologie*. Springer-Verlag.

Jia, Yibing. 2012. „Chapter 3 - Real-Time PCR“. In *Methods in Cell Biology*, herausgegeben von P. Michael Conn, 112:55–68. Laboratory Methods in Cell Biology. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405914-6.00003-2>.

Johansson, Malin E. V., Mia Phillipson, Joel Petersson, Anna Velcich, Lena Holm, und Gunnar C. Hansson. 2008. „The Inner of the Two Muc2 Mucin-Dependent Mucus Layers in Colon Is Devoid of Bacteria“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (39): 15064–69. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803124105>.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Food and Agriculture Organization of the United Nations, und World Health Organization, Hrsg. 2010. *Compendium of Food Additive Specifications: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 73rd Meeting 2010*. FAO JECFA Monographs 10. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Karcher, SUSAN J. 1995. „6 - POLYMERASE CHAIN REACTION“. In *Molecular Biology*, herausgegeben von SUSAN J. Karcher, 215–27. San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012397720-5.50040-2>.

Karl, Corinna M., Martin Wendelin, Dariah Lutsch, Gerhard Schleining, Klaus Dürrschmid, Jakob P. Ley, Gerhard E. Krammer, und Barbara Lieder. 2020. „Structure-Dependent Effects of Sweet and Sweet Taste Affecting Compounds on Their Sensorial Properties“. *Food Chemistry: X* 7 (September): 100100. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2020.100100>.

Kavanaugh, Devon W., John O’Callaghan, Ludovica F. Buttó, Helen Slattery, Jonathan Lane, Marguerite Clyne, Marian Kane, Lokesh Joshi, und Rita M. Hickey. 2013. „Exposure of Bifidobacterium Longum Subsp. Infantis to Milk Oligosaccharides Increases Adhesion to Epithelial Cells and Induces a Substantial Transcriptional Response“. *PloS One* 8 (6): e67224. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067224>.

Kellett, George L., Edith Brot-Laroche, Oliver J. Mace, und Armelle Leturque. 2008. „Sugar Absorption in the Intestine: The Role of GLUT2“. *Annual Review of Nutrition* 28: 35–54. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.28.061807.155518>.

Khan, Naim Akhtar, und Philippe Besnard. 2009. „Oro-Sensory Perception of Dietary Lipids: New Insights into the Fat Taste Transduction“. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1791 (3): 149–55. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.01.001>.

Kim, Hye-Ryoung, Sung-Won Park, Hee-Jung Cho, Kyung-Ae Chae, Ji-Min Sung, Jin-Suk Kim, Christopher P. Landowski, u. a. 2007. „Comparative Gene Expression Profiles of Intestinal Transporters in Mice, Rats and Humans“. *Pharmacological Research* 56 (3): 224–36. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.06.005>.

Kinnamon, Sue C. 2012. „Taste Receptor Signaling-- From Tongues to Lungs“. *Acta physiologica (Oxford, England)* 204 (2): 158–68. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2011.02308.x>.

Kleiveland, Charlotte R. 2015. „Co-Cultivation of Caco-2 and HT-29MTX“. In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*, herausgegeben von Kitty Verhoeckx, Paul Cotter, Iván López-Expósito, Charlotte Kleiveland, Tor Lea, Alan Mackie, Teresa Requena, Dominika Swiatecka, und Harry Wichers. Cham (CH): Springer. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500138/>.

Knipp, G. T., N. F. Ho, C. L. Barsuhn, und R. T. Borchardt. 1997. „Paracellular Diffusion in Caco-2 Cell Monolayers: Effect of Perturbation on the Transport of Hydrophilic Compounds That Vary in Charge and Size“. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 86 (10): 1105–10. <https://doi.org/10.1021/js9700309>.

Kohno, Daisuke. 2017. „Sweet Taste Receptor in the Hypothalamus: A Potential New Player in Glucose Sensing in the Hypothalamus“. *The Journal of Physiological Sciences: JPS* 67 (4): 459–65. <https://doi.org/10.1007/s12576-017-0535-y>.

Kouhpayeh, Shirin, Zahra Hejazi, Hossein Khanahmad, und Abbas Rezaei. 2017. „Real-Time PCR: an Appropriate Approach to Confirm ssDNA Generation from PCR Product in SELEX Process“. *Iranian Journal of Biotechnology* 15 (2): 143–48. <https://doi.org/10.15171/ijb.1550>.

Koyama, Eriko, Norifumi Sakai, Yuji Ohori, Ken Kitazawa, Osamu Izawa, Kunio Kakegawa, Akiharu Fujino, und Michio Ui. 2003. „Absorption and Metabolism of Glycosidic Sweeteners of Stevia Mixture and Their Aglycone, Steviol, in Rats and Humans“. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 41 (6): 875–83. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(03\)00039-5](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(03)00039-5).

Kuhn, Christina, Bernd Bufe, Marcel Winnig, Thomas Hofmann, Oliver Frank, Maik Behrens, Tatjana Lewtschenko, Jay P. Slack, Cynthia D. Ward, und Wolfgang Meyerhof. 2004. „Bitter Taste Receptors for Saccharin and Acesulfame K“. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (45): 10260–65. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1225-04.2004>.

Langerholc, Tomaz, Petros A. Maragkoudakis, Jan Wollgast, Lidija Gradisnik, und Avreljia Cencic. 2011. „Novel and Established Intestinal Cell Line Models – An Indispensable Tool in Food Science and Nutrition“. *Trends in Food Science & Technology, PathogenCombat – Unique achievements in the fight against pathogens*, 22 (November): S11–20. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.03.010>.

Lea, Tor. 2015a. „Caco-2 Cell Line“. In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*, herausgegeben von Kitty Verhoeckx, Paul Cotter, Iván López-Expósito, Charlotte Kleiveland, Tor Lea, Alan Mackie, Teresa Requena, Dominika Swiatecka, und Harry Wichers, 103–11. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_10.

Lea, Tor. 2015b. „Epithelial Cell Models; General Introduction“. In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*, herausgegeben von Kitty Verhoeckx, Paul Cotter, Iván López-Expósito, Charlotte Kleiveland, Tor Lea, Alan Mackie, Teresa Requena, Dominika Swiatecka, und Harry Wichers. Cham (CH): Springer. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500142/>.

Lee, Allen A., und Chung Owyang. 2017. „Sugars, Sweet Taste Receptors, and Brain Responses“. *Nutrients* 9 (7). <https://doi.org/10.3390/nu9070653>.

Lee, Robert J., und Noam A. Cohen. 2014. „Bitter and Sweet Taste Receptors in the Respiratory Epithelium in Health and Disease“. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 92 (12): 1235–44. <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1222-6>.

Lenaerts, Kaatje, Freek G. Bouwman, Wouter H. Lamers, Johan Renes, und Edwin C. Mariman. 2007. „Comparative Proteomic Analysis of Cell Lines and Scrapings of the Human Intestinal Epithelium“. *BMC Genomics* 8 (April): 91. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-91>.

Leonard, Fransisca, Eva-Maria Collnot, und Claus-Michael Lehr. 2010. „A Three-Dimensional Coculture of Enterocytes, Monocytes and Dendritic Cells to Model Inflamed Intestinal Mucosa in Vitro“. *Molecular Pharmaceutics* 7 (6): 2103–19. <https://doi.org/10.1021/mp1000795>.

Lesuffleur, T., A. Barbat, E. Dussaulx, und A. Zweibaum. 1990. „Growth Adaptation to Methotrexate of HT-29 Human Colon Carcinoma Cells Is Associated with Their Ability to Differentiate into Columnar Absorptive and Mucus-Secreting Cells“. *Cancer Research* 50 (19): 6334–43.

Lesuffleur, T., N. Porchet, J. P. Aubert, D. Swallow, J. R. Gum, Y. S. Kim, F. X. Real, und A. Zweibaum. 1993. „Differential Expression of the Human Mucin Genes MUC1 to MUC5 in Relation to Growth and Differentiation of Different Mucus-Secreting HT-29 Cell Subpopulations“. *Journal of Cell Science* 106 (Pt 3) (November): 771–83.

Lewis, Walter H., A.S. Rawat, A.S. Pharswan, M.C. Nautiyal, und A.J.G.H Kostermans. 1992. „Notes on economic plants“. *Economic Botany* 46 (3): 336–40.

Li, Xiaodong, Lena Staszewski, Hong Xu, Kyle Durick, Mark Zoller, und Elliot Adler. 2002. „Human Receptors for Sweet and Umami Taste“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (7): 4692–96. <https://doi.org/10.1073/pnas.072090199>.

Liévin-Le Moal, Vanessa, und Alain L. Servin. 2006. „The Front Line of Enteric Host Defense against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms: Mucins, Antimicrobial Peptides, and Microbiota“. *Clinical Microbiology Reviews* 19 (2): 315–37. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.315-337.2006>.

Liévin-Le Moal, Vanessa, und Alain L. Servin. 2013. „Pathogenesis of Human Enterovirulent Bacteria: Lessons from Cultured, Fully Differentiated Human Colon Cancer Cell Lines“. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 77 (3): 380–439. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00064-12>.

Lo, C. M., C. R. Keese, und I. Giaever. 1999. „Cell-Substrate Contact: Another Factor May Influence Transepithelial Electrical Resistance of Cell Layers Cultured on Permeable Filters“. *Experimental Cell Research* 250 (2): 576–80. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4538>.

Lo Furno, Debora, Adriana Carol Eleonora Graziano, Rosanna Avola, Rosario Giuffrida, Vincenzo Perciavalle, Francesco Bonina, Giuliana Mannino, und Venera Cardile. 2016. „A Citrus bergamia Extract Decreases Adipogenesis and Increases Lipolysis by Modulating PPAR Levels in Mesenchymal Stem Cells from Human Adipose Tissue“. *PPAR Research* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4563815>.

Lord, G. H., und P. M. Newberne. 1990. „Renal Mineralization--a Ubiquitous Lesion in Chronic Rat Studies“. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 28 (6): 449–55. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(90\)90092-2](https://doi.org/10.1016/0278-6915(90)90092-2).

„LunaScript RT SuperMix Kit – mit Designer RTase zu unerreichter 2-Schritt RT-qPCR Performance - New England Biolabs GmbH“. o. J. Zugegriffen 17. Jänner 2020. <https://www.neb-online.de/pcr-dna-amplifikation/qpcr-real-time-pcr-und-rt-qpcr/luna-script-rt-supermix-kit/>.

Ma, Jing, Jessica Chang, Helen L. Checklin, Richard L. Young, Karen L. Jones, Michael Horowitz, und Christopher K. Rayner. 2010. „Effect of the Artificial Sweetener, Sucralose, on Small Intestinal Glucose Absorption in Healthy Human Subjects“. *The British Journal of Nutrition* 104 (6): 803–6. <https://doi.org/10.1017/S0007114510001327>.

Mace, Oliver J, Julie Affleck, Nick Patel, und George L Kellett. 2007. „Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2“. *The Journal of Physiology* 582 (Pt 1): 379–92. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.130906>.

Mace, Oliver J, Norma Lister, Emma Morgan, Emma Shepherd, Julie Affleck, Philip Helliwell, John R Bronk, u. a. 2009. „An energy supply network of nutrient absorption coordinated by calcium and T1R taste receptors in rat small intestine“. *The Journal of Physiology* 587 (Pt 1): 195–210. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.159616>.

Madgula, Vamsi L., Bharathi Avula, Niranjana Reddy V L, Ikhlas A. Khan, und Shabana I. Khan. 2007. „Transport of Decursin and Decursinol Angelate across Caco-2 and MDR-MDCK Cell Monolayers: In Vitro Models for Intestinal and Blood-Brain Barrier Permeability“. *Planta Medica* 73 (4): 330–35. <https://doi.org/10.1055/s-2007-967137>.

Magnuson, Bernadene A., Ashley Roberts, und Earle R. Nestmann. 2017. „Critical Review of the Current Literature on the Safety of Sucralose“. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 106 (Pt A): 324–55. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.047>.

Mahraoui, L., A. Rodolosse, A. Barbat, E. Dussaulx, A. Zweibaum, M. Rousset, und E. Brot-Laroche. 1994. „Presence and Differential Expression of SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT3 and GLUT5 Hexose-Transporter MRNAs in Caco-2 Cell Clones in Relation to Cell Growth and Glucose Consumption“. *The Biochemical Journal* 298 Pt 3 (März): 629–33. <https://doi.org/10.1042/bj2980629>.

„Manual Monarch Total RNA Mini Prep Kit“. o. J. Zugegriffen 15. Jänner 2020. <https://www.neb.com/-/media/nebus/files/manuals/manualt2010.pdf>.

- Maoret, J. J., J. Font, C. Augeron, P. Codogno, C. Bauvy, M. Aubery, und C. L. Labois. 1989. „A Mucus-Secreting Human Colonic Cancer Cell Line. Purification and Partial Characterization of the Secreted Mucins“. *The Biochemical Journal* 258 (3): 793–99. <https://doi.org/10.1042/bj2580793>.
- Margolskee, Robert F., Jane Dyer, Zaza Kokrashvili, Kieron S. H. Salmon, Erwin Ilegems, Kristian Daly, Emeline L. Maillet, Yuzo Ninomiya, Bedrich Mosinger, und Soraya P. Shirazi-Beechey. 2007. „T1R3 and Gustducin in Gut Sense Sugars to Regulate Expression of Na⁺-Glucose Cotransporter 1“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (38): 15075–80. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706678104>.
- Marshall, N. J., C. J. Goodwin, und S. J. Holt. 1995. „A Critical Assessment of the Use of Microculture Tetrazolium Assays to Measure Cell Growth and Function“. *Growth Regulation* 5 (2): 69–84.
- Martin, Céline, Michael Chevrot, Hélène Poirier, Patricia Passilly-Degrace, Isabelle Niot, und Philippe Besnard. 2011. „CD36 as a Lipid Sensor“. *Physiology & Behavior* 105 (1): 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.02.029>.
- Martínez-Maqueda, Daniel, Beatriz Miralles, und Isidra Recio. 2015. „HT29 Cell Line“. In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*, herausgegeben von Kitty Verhoeckx, Paul Cotter, Iván López-Expósito, Charlotte Kleiveland, Tor Lea, Alan Mackie, Teresa Requena, Dominika Swiatecka, und Harry Wichers, 113–24. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_11.
- Maruyama, Yutaka, Reiko Yasuda, Motonaka Kuroda, und Yuzuru Eto. 2012. „Kokumi Substances, Enhancers of Basic Tastes, Induce Responses in Calcium-Sensing Receptor Expressing Taste Cells“. *PloS One* 7 (4): e34489. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034489>.
- McGuckin, Michael A., Sara K. Lindén, Philip Sutton, und Timothy H. Florin. 2011. „Mucin Dynamics and Enteric Pathogens“. *Nature Reviews. Microbiology* 9 (4): 265–78. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2538>.

Merigo, Flavia, Donatella Benati, Maria Paola Cecchini, Mirko Cristofolletti, Francesco Osculati, und Andrea Sbarbati. 2009. „Amylase Expression in Taste Receptor Cells of Rat Circumvallate Papillae“. *Cell and Tissue Research* 336 (3): 411–21. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0789-7>.

Merigo, Flavia, Donatella Benati, Mirko Cristofolletti, Francesco Osculati, und Andrea Sbarbati. 2011. „Glucose Transporters Are Expressed in Taste Receptor Cells“. *Journal of Anatomy* 219 (2): 243–52. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2011.01385.x>.

Meyer, Dorke, Anja Voigt, Patricia Widmayer, Heike Borth, Sandra Huebner, Andreas Breit, Susan Marschall, u. a. 2012. „Expression of Tas1 Taste Receptors in Mammalian Spermatozoa: Functional Role of Tas1r1 in Regulating Basal Ca²⁺ and CAMP Concentrations in Spermatozoa“. *PloS One* 7 (2): e32354. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032354>.

Moran, Andrew W., Miran A. Al-Rammahi, Daleep K. Arora, Daniel J. Batchelor, Erin A. Coulter, Kristian Daly, Catherine Ionescu, David Bravo, und Soraya P. Shirazi-Beechey. 2010. „Expression of Na⁺/Glucose Co-Transporter 1 (SGLT1) Is Enhanced by Supplementation of the Diet of Weaning Piglets with Artificial Sweeteners“. *The British Journal of Nutrition* 104 (5): 637–46. <https://doi.org/10.1017/S0007114510000917>.

Moran, Andrew W., Miran A. Al-Rammahi, Daleep K. Arora, Daniel J. Batchelor, Erin A. Coulter, Catherine Ionescu, David Bravo, und Soraya P. Shirazi-Beechey. 2010. „Expression of Na⁺/Glucose Co-Transporter 1 (SGLT1) in the Intestine of Piglets Weaned to Different Concentrations of Dietary Carbohydrate“. *The British Journal of Nutrition* 104 (5): 647–55. <https://doi.org/10.1017/S0007114510000954>.

Morgan, D. M. 1998. „Tetrazolium (MTT) Assay for Cellular Viability and Activity“. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 79: 179–83. <https://doi.org/10.1385/0-89603-448-8:179>.

- Moriyama, Kosei, Manjiri M. Bakre, Farooq Ahmed, Nancy Spickofsky, Marianna Max, und Robert F. Margolskee. 2002. „Assaying G Protein-Phosphodiesterase Interactions in Sensory Systems“. *Methods in Enzymology* 345: 37–48. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(02\)45005-7](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(02)45005-7).
- Mortarino, M., A. Franceschi, F. Mancianti, C. Bazzocchi, C. Genchi, und C. Bandi. 2004. [Quantitative PCR in the diagnosis of Leishmania]“. *Parassitologia* 46 (1–2): 163–67.
- Narai, A., S. Arai, und M. Shimizu. 1997. „Rapid Decrease in Transepithelial Electrical Resistance of Human Intestinal Caco-2 Cell Monolayers by Cytotoxic Membrane Perturbants“. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 11 (4): 347–54. [https://doi.org/10.1016/s0887-2333\(97\)00026-x](https://doi.org/10.1016/s0887-2333(97)00026-x).
- Nerurkar, M. M., P. S. Burton, und R. T. Borchardt. 1996. „The Use of Surfactants to Enhance the Permeability of Peptides through Caco-2 Cells by Inhibition of an Apically Polarized Efflux System“. *Pharmaceutical Research* 13 (4): 528–34. <https://doi.org/10.1023/a:1016033702220>.
- Nickerson, Kourtney P., und Christine McDonald. 2012. „Crohn’s Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia Coli Adhesion Is Enhanced by Exposure to the Ubiquitous Dietary Polysaccharide Maltodextrin“. *PloS One* 7 (12): e52132. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052132>.
- O’Brien Nabors, Lyn, und G.A. Miller. 1991. *Alternative Sweeteners*. 2.Auflage. New York: Marcel Dekker.
- O’Brien, Patrick, und Christopher Peter Corpe. 2016. „Acute Effects of Sugars and Artificial Sweeteners on Small Intestinal Sugar Transport: A Study Using CaCo-2 Cells As an In Vitro Model of the Human Enterocyte“. *PLoS ONE* 11 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167785>.

Otte, Jan-Michel, und Daniel K. Podolsky. 2004. „Functional Modulation of Enterocytes by Gram-Positive and Gram-Negative Microorganisms“. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 286 (4): G613-626. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00341.2003>.

Pan, Fengguang, Lu Han, Yan Zhang, Yiding Yu, und Jingbo Liu. 2015. „Optimization of Caco-2 and HT29 Co-Culture in Vitro Cell Models for Permeability Studies“. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 66 (6): 680–85. <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1077792>.

Pérez, Cristian A., Liquan Huang, Mingqing Rong, J. Ashot Kozak, Axel K. Preuss, Hailin Zhang, Marianna Max, und Robert F. Margolskee. 2002. „A Transient Receptor Potential Channel Expressed in Taste Receptor Cells“. *Nature Neuroscience* 5 (11): 1169–76. <https://doi.org/10.1038/nn952>.

Pérez-Vega, Juan Antonio, Leticia Olivera-Castillo, José Ángel Gómez-Ruiz, und Blanca Hernández-Ledesma. 2013. „Release of Multifunctional Peptides by Gastrointestinal Digestion of Sea Cucumber (*Isostichopus Badionotus*)“. *Journal of Functional Foods* 5 (2): 869–77. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.01.036>.

Pfeiffer, Andreas F. H., und Farnaz Keyhani-Nejad. 2018. „High Glycemic Index Metabolic Damage - a Pivotal Role of GIP and GLP-1“. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 29 (5): 289–99. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.03.003>.

Pinto, M., M.D. Appay, P. Simon-Assman, G. Chevalier, N. Dracopoli, J. Fogh, und A. Zweibaum. 1982. „Enterocytic differentiation of cultured human colon cancer cells by replacement of glucose by galactose in the medium“. *Biol Cell* 44 (2): 193–96.

Pinto, M., S. Robine-Leon, M.D. Appay, M. Keding, N. Triadou, E. Dussaulx, B. Lacroix, u. a. 1983. „Enterocyte-Like Differentiation and Polarization of the Human-Colon Carcinoma Cell-Line Caco-2 in Culture“. *Biol Cell*, Nr. 47: 323–30.

- Pontier, C., J. Pachot, R. Botham, B. Lenfant, und P. Arnaud. 2001. „HT29-MTX and Caco-2/TC7 Monolayers as Predictive Models for Human Intestinal Absorption: Role of the Mucus Layer“. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 90 (10): 1608–19. <https://doi.org/10.1002/jps.1111>.
- Poulson, Rozanne. 1973. „Isolation, Purification and Fractionation of RNA“. In *The Ribonucleic Acids*, herausgegeben von P. R. Stewart und D. S. Letham, 243–61. Berlin, Heidelberg: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-00499-9_11.
- Powell, D. W. 1981. „Barrier Function of Epithelia“. *The American Journal of Physiology* 241 (4): G275-288. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1981.241.4.G275>.
- Powell, D. W. 1987. „Physiology of the Gastrointestinal Tract“. In , 2. Aufl., 1267–1305. New York: Raven Press.
- Prakash, Indra, Cynthia Bunders, Krishna P. Devkota, Romila D. Charan, Catherine Ramirez, Christopher Priedemann, und Avetik Markosyan. 2014. „Isolation and Characterization of a Novel Rebaudioside M Isomer from a Bioconversion Reaction of Rebaudioside A and NMR Comparison Studies of Rebaudioside M Isolated from *Stevia rebaudiana* Bertoni and *Stevia rebaudiana* Morita“. *Biomolecules* 4 (2): 374–89. <https://doi.org/10.3390/biom4020374>.
- Prakash, Indra, Gil Ma, Cynthia Bunders, Romila D. Charan, Catherine Ramirez, Krishna P. Devkota, und Tara M. Snyder. 2017. „A Novel Diterpene Glycoside with Nine Glucose Units from *Stevia Rebaudiana* Bertoni“. *Biomolecules* 7 (1). <https://doi.org/10.3390/biom7010010>.
- Prakash, Indra, Avetik Markosyan, und Cynthia Bunders. 2014. „Development of Next Generation *Stevia* Sweetener: Rebaudioside M“. *Foods* 3 (1): 162–75. <https://doi.org/10.3390/foods3010162>.
- „Protocol for LunaScript® RT SuperMix Kit (E3010) | NEB“. 2018. 31. Jänner 2018. <https://international.neb.com/protocols/2018/01/31/protocol-for-lunascript-rt-supermix-kit-e3010>.

National Institutes of Health. 2004. „Sucrose“. 16. September 2004. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5988>.

Purkayastha, Sidd, George Pugh, Barry Lynch, Ashley Roberts, David Kwok, und Stanley M. Tarka. 2014. „In Vitro Metabolism of Rebaudioside B, D, and M under Anaerobic Conditions: Comparison with Rebaudioside A“. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP* 68 (2): 259–68. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2013.12.004>.

Queneau, Yves, Slawomir Jarosz, Bartosz Lewandowski, und Juliette Fitremann. 2007. „Sucrose Chemistry and Applications of Sucrochemicals“. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, herausgegeben von Derek Horton, 61:217–92. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(07\)61005-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(07)61005-1).

Renwick, A. G., und S. M. Tarka. 2008. „Microbial Hydrolysis of Steviol Glycosides“. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 46 Suppl 7 (Juli): S70-74. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.05.008>.

Rieder, Anne, Stine Grimmer, Svein O. Kolset, Terje E. Michaelsen, und Svein H. Knutson. 2011. „Cereal β -Glucan Preparations of Different Weight Average Molecular Weights Induce Variable Cytokine Secretion in Human Intestinal Epithelial Cell Lines“. *Food Chemistry* 128 (4): 1037–43. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.010>.

Rippe, James M., und Theodore J. Angelopoulos. 2013. „Sucrose, High-Fructose Corn Syrup, and Fructose, Their Metabolism and Potential Health Effects: What Do We Really Know?12“. *Advances in Nutrition* 4 (2): 236–45. <https://doi.org/10.3945/an.112.002824>.

Riss, Terry L., Richard A. Moravec, Andrew L. Niles, Sarah Duellman, Hélène A. Benink, Tracy J. Worzella, und Lisa Minor. 2004. „Cell Viability Assays“. In *Assay Guidance Manual*, herausgegeben von G. Sitta Sittampalam, Abigail Grossman, Kyle Brimacombe, Michelle Arkin, Douglas Auld, Christopher P. Austin, Jonathan Baell, u. a. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>.

- Roberts, A., A. G. Renwick, J. Sims, und D. J. Snodin. 2000. „Sucralose Metabolism and Pharmacokinetics in Man“. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 38 Suppl 2: S31–41. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(00\)00026-0](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(00)00026-0).
- Rorsman, P. 1997. „The Pancreatic Beta-Cell as a Fuel Sensor: An Electrophysiologist’s Viewpoint“. *Diabetologia* 40 (5): 487–95. <https://doi.org/10.1007/s001250050706>.
- Rössler, P., C. Kroner, J. Freitag, J. Noè, und H. Breer. 1998. „Identification of a Phospholipase C Beta Subtype in Rat Taste Cells“. *European Journal of Cell Biology* 77 (3): 253–61. [https://doi.org/10.1016/s0171-9335\(98\)80114-3](https://doi.org/10.1016/s0171-9335(98)80114-3).
- Roth, Klaus, und Erich Lück. 2012. „Kalorienfreie Süße aus Labor und Natur Süß, Süßer, Süßstoff“. *Chemie in unserer Zeit* 46 (3).
- Rumessen, J. J., und E. Gudmand-Høyer. 1986. „Absorption Capacity of Fructose in Healthy Adults. Comparison with Sucrose and Its Constituent Monosaccharides“. *Gut* 27 (10): 1161–68. <https://doi.org/10.1136/gut.27.10.1161>.
- Sánchez-Lozada, Laura G., Wei Mu, Carlos Roncal, Yuri Y. Sautin, Manal Abdelmalek, Sirirat Reungjui, MyPhuong Le, u. a. 2010. „Comparison of Free Fructose and Glucose to Sucrose in the Ability to Cause Fatty Liver“. *European Journal of Nutrition* 49 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00394-009-0042-x>.
- Sánchez-Tapia, Mónica, Jonathan Martínez-Medina, Armando R Tovar, und Nimbe Torres. 2019. „Natural and Artificial Sweeteners and High Fat Diet Modify Differential Taste Receptors, Insulin, and TLR4-Mediated Inflammatory Pathways in Adipose Tissues of Rats“. *Nutrients* 11 (4). <https://doi.org/10.3390/nu11040880>.
- Sansbury, F. H., S. E. Flanagan, J. a. L. Houghton, F. L. Shuixian Shen, A. M. S. Al-Senani, A. M. Habeb, M. Abdullah, A. Kariminejad, S. Ellard, und A. T. Hattersley. 2012. „SLC2A2 Mutations Can Cause Neonatal Diabetes, Suggesting GLUT2 May Have a Role in Human Insulin Secretion“. *Diabetologia* 55 (9): 2381–85. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2595-0>.

Sasaki, Yu F., Satomi Kawaguchi, Asako Kamaya, Miyuki Ohshita, Kazumi Kabasawa, Kayoko Iwama, Kazuyuki Taniguchi, und Shuji Tsuda. 2002. „The Comet Assay with 8 Mouse Organs: Results with 39 Currently Used Food Additives“. *Mutation Research* 519 (1–2): 103–19. [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(02\)00128-6](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(02)00128-6).

SCF. 2000. „Opinion of the Scientific Committee on Food on sucralose“, September.

Scheepers, Andrea, Hans-Georg Joost, und Annette Schürmann. 2004. „The Glucose Transporter Families SGLT and GLUT: Molecular Basis of Normal and Aberrant Function“. *JPEN. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 28 (5): 364–71. <https://doi.org/10.1177/0148607104028005364>.

Shi, Qing, Lei Cai, Hongzhe Jia, Xuemei Zhu, Lei Chen, und Shaoping Deng. 2019. „Low Intake of Digestible Carbohydrates Ameliorates Duodenal Absorption of Carbohydrates in Mice with Glucose Metabolism Disorders Induced by Artificial Sweeteners“. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99 (11): 4952–62. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9727>.

Shi, Qing, Xuemei Zhu, und Shaoping Deng. 2019. „Sweet Taste Receptor Expression and Its Activation by Sucralose to Regulate Glucose Absorption in Mouse Duodenum“. *Journal of Food Science*, Mai. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14586>.

Shi, Qiong, Xiufang Song, Juanli Fu, Chuanyang Su, Xiaomin Xia, Erqun Song, und Yang Song. 2015. „Artificial Sweetener Neohesperidin Dihydrochalcone Showed Antioxidative, Anti-Inflammatory and Anti-Apoptosis Effects against Paraquat-Induced Liver Injury in Mice“. *International Immunopharmacology* 29 (2): 722–29. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.09.003>.

Shimizu, Makoto. 2010. „Interaction between Food Substances and the Intestinal Epithelium“. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 74 (2): 232–41. <https://doi.org/10.1271/bbb.90730>.

Shirazi-Beechey, Soraya P., Kristian Daly, Miran Al-Rammahi, Andrew W. Moran, und David Bravo. 2014. „Role of Nutrient-Sensing Taste 1 Receptor (T1R) Family Members in Gastrointestinal Chemosensing“. *The British Journal of Nutrition* 111 Suppl 1 (Juni): S8-15. <https://doi.org/10.1017/S0007114513002286>.

Simon, Becky R., Sebastian D. Parlee, Brian S. Learman, Hiroyuki Mori, Erica L. Scheller, William P. Cawthorn, Xiaomin Ning, u. a. 2013. „Artificial Sweeteners Stimulate Adipogenesis and Suppress Lipolysis Independently of Sweet Taste Receptors“. *The Journal of Biological Chemistry* 288 (45): 32475–89. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.514034>.

Singh, Satish K., Aaron C. Bartoo, Selvi Krishnan, Michael O. Boylan, John H. Schwartz, und M. Michael Wolfe. 2008. „Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP) Stimulates Transepithelial Glucose Transport“. *Obesity (Silver Spring, Md.)* 16 (11): 2412–16. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.393>.

Sivakumar, S., O. L. Franco, und B. Thayumanavan. 2007. „Isolation of RNA from Polysaccharide-Rich Seeds“. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 37 (4): 323–32. <https://doi.org/10.1080/10826060701593217>.

Soffritti M., Padovani M., Tibaldi E., Falcioni L., Manservigi F., Lauriola M., Bua L., Manservigi M., und Belpoggi F. 2016. „Sucralose administered in feed, beginning prenatally through lifespan, induces hematopoietic neoplasias in male swiss mice“. *International Journal of Occupational and Environmental Health* 22 (1): 7–17. <https://doi.org/10.1080/10773525.2015.1106075>.

Srinivasan, Balaji, Aditya Reddy Kolli, Mandy Brigitte Esch, Hasan Erbil Abaci, Michael L. Shuler, und James J. Hickman. 2015. „TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems“. 2015. <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2211068214561025>.

Stearns, Adam T., Anita Balakrishnan, David B. Rhoads, und Ali Tavakkolizadeh. 2010. „Rapid Upregulation of Sodium-Glucose Transporter SGLT1 in Response to Intestinal Sweet Taste Stimulation“. *Annals of Surgery* 251 (5): 865–71. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3181d96e1f>.

Stearns, Adam T., Anita Balakrishnan, Jan Rounds, David B. Rhoads, Stanley W. Ashley, und Ali Tavakkolizadeh. 2008. „Capsaicin-Sensitive Vagal Afferents Modulate Posttranscriptional Regulation of the Rat Na⁺/Glucose Cotransporter SGLT1“. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 294 (4): G1078-1083. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00591.2007>.

Stockert, Juan C., Richard W. Horobin, Lucas L. Colombo, und Alfonso Blázquez-Castro. 2018. „Tetrazolium Salts and Formazan Products in Cell Biology: Viability Assessment, Fluorescence Imaging, and Labeling Perspectives“. *Acta Histochemica* 120 (3): 159–67. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005>.

Striem, B. J., U. Pace, U. Zehavi, M. Naim, und D. Lancet. 1989. „Sweet Tastants Stimulate Adenylate Cyclase Coupled to GTP-Binding Protein in Rat Tongue Membranes“. *The Biochemical Journal* 260 (1): 121–26. <https://doi.org/10.1042/bj2600121>.

Strugari, Alina F.G., Miruna S. Stan, Sami Gharbia, Anca Hermenean, und Anca Dinischiotu. 2018. „Characterization of Nanoparticle Intestinal Transport Using an In Vitro Co-Culture Model“. *Nanomaterials* 9 (1). <https://doi.org/10.3390/nano9010005>.

Sukumaran, Sunil K., Karen K. Yee, Shusuke Iwata, Ramana Kotha, Roberto Quezada-Calvillo, Buford L. Nichols, Sankar Mohan, u. a. 2016. „Taste cell-expressed α -glucosidase enzymes contribute to gustatory responses to disaccharides“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (21): 6035–40. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520843113>.

Tang, A. S., P. J. Chikhale, P. K. Shah, und R. T. Borchardt. 1993. „Utilization of a Human Intestinal Epithelial Cell Culture System (Caco-2) for Evaluating Cytoprotective Agents“. *Pharmaceutical Research* 10 (11): 1620–26. <https://doi.org/10.1023/a:1018976804403>.

Tappy, Luc. 2018. „Fructose-Containing Caloric Sweeteners as a Cause of Obesity and Metabolic Disorders“. *The Journal of Experimental Biology* 221 (Pt Suppl 1). <https://doi.org/10.1242/jeb.164202>.

Tappy, Luc, Kim A. Lê, Christel Tran, und Nicolas Paquot. 2010. „Fructose and Metabolic Diseases: New Findings, New Questions“. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 26 (11–12): 1044–49. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.02.014>.

Taruno, Akiyuki, Valérie Vingdeux, Makoto Ohmoto, Zhongming Ma, Gennady Dvoryanchikov, Ang Li, Leslie Adrien, u. a. 2013. „CALHM1 Ion Channel Mediates Purinergic Neurotransmission of Sweet, Bitter and Umami Tastes“. *Nature* 495 (7440): 223–26. <https://doi.org/10.1038/nature11906>.

Thornton, Brenda, und Chhandak Basu. 2011. „Real-Time PCR (QPCR) Primer Design Using Free Online Software“. *Biochemistry and Molecular Biology Education: A Bi-monthly Publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* 39 (2): 145–54. <https://doi.org/10.1002/bmb.20461>.

Tordoff, Michael G., Tiffany R. Aleman, Hillary T. Ellis, Makoto Ohmoto, Ichiro Matsumoto, Val I. Shestopalov, Claire H. Mitchell, J. Kevin Foskett, und Rachel L. Poole. 2015. „Normal Taste Acceptance and Preference of PANX1 Knockout Mice“. *Chemical Senses* 40 (7): 453–59. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjv025>.

Trubey, Kristina R., Schartess Culpepper, Yutaka Maruyama, Sue C. Kinnamon, und Nirupa Chaudhari. 2006. „Tastants Evoke CAMP Signal in Taste Buds That Is Independent of Calcium Signaling“. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 291 (2): C237–244. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00303.2005>.

Turk, E., B. Zabel, S. Mundlos, J. Dyer, und E. M. Wright. 1991. „Glucose/Galactose Malabsorption Caused by a Defect in the Na⁺/Glucose Cotransporter“. *Nature* 350 (6316): 354–56. <https://doi.org/10.1038/350354a0>.

Varga, Aniko, und Delano James. 2006. „Real-Time RT-PCR and SYBR Green I Melting Curve Analysis for the Identification of Plum Pox Virus Strains C, EA, and W: Effect of Amplicon Size, Melt Rate, and Dye Translocation“. *Journal of Virological Methods* 132 (1–2): 146–53. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.10.004>.

Velarde, G., S. Ait-Aissa, C. Gillet, F. Rogerieux, C. Lambre, E. Vindimian, und J. M. Porcher. 1999. „Use of Transepithelial Electrical Resistance in the Study of Pentachlorophenol Toxicity“. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 13 (4–5): 723–27. [https://doi.org/10.1016/s0887-2333\(99\)00048-x](https://doi.org/10.1016/s0887-2333(99)00048-x).

Wagar, L. E., C. P. Champagne, N. D. Buckley, Y. Raymond, und J. M. Green-Johnson. 2009. „Immunomodulatory Properties of Fermented Soy and Dairy Milks Prepared with Lactic Acid Bacteria“. *Journal of Food Science* 74 (8): M423-430. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01308.x>.

Walter, E., S. Janich, B. J. Roessler, J. M. Hilfinger, und G. L. Amidon. 1996. „HT29-MTX/Caco-2 Cocultures as an in Vitro Model for the Intestinal Epithelium: In Vitro-in Vivo Correlation with Permeability Data from Rats and Humans“. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85 (10): 1070–76. <https://doi.org/10.1021/js960110x>.

Welsh, Jean A., Andrea Sharma, Solveig A. Cunningham, und Miriam B. Vos. 2011. „Consumption of Added Sugars and Indicators of Cardiovascular Disease Risk among US Adolescents“. *Circulation* 123 (3): 249–57. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.972166>.

Wiet, Stephan G., und Pamela K. Beyts. 1992. „Sensory Characteristics of Sucralose and other High Intensity Sweeteners - WIET - 1992 - Journal of Food Science - Wiley Online Library“. *Journal of Food Science*, Juli 1992.

Winnig, Marcel, Bernd Bufe, Nicole A Kratochwil, Jay P Slack, und Wolfgang Meyerhof. 2007. „The binding site for neohesperidin dihydrochalcone at the human sweet taste receptor“. *BMC Structural Biology* 7 (Oktober): 66. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-7-66>.

World Health Organization. 2015. „Guideline: Sugars intake for adults and children“. Genf, Schweiz.

World Health Organization. 2018. „Obesity and Overweight“. Genf, Schweiz: World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.

Wright, E. M., B. A. Hirayama, und D. F. Loo. 2007. „Active Sugar Transport in Health and Disease“. *Journal of Internal Medicine* 261 (1): 32–43. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2006.01746.x>.

Yadav, Sudesh Kumar, und Praveen Guleria. 2012. „Steviol Glycosides from Stevia: Biosynthesis Pathway Review and Their Application in Foods and Medicine“. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52 (11): 988–98. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.519447>.

Yan, W., G. Sunavala, S. Rosenzweig, M. Dasso, J. G. Brand, und A. I. Spielman. 2001. „Bitter Taste Transduced by PLC-Beta(2)-Dependent Rise in IP(3) and Alpha-Gustducin-Dependent Fall in Cyclic Nucleotides“. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 280 (4): C742-751. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.4.C742>.

Yarmolinsky, David A., Charles S. Zuker, und Nicholas J. P. Ryba. 2009. „Common Sense about Taste: From Mammals to Insects“. *Cell* 139 (2): 234–44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.001>.

Yee, Karen K., Sunil K. Sukumaran, Ramana Kotha, Timothy A. Gilbertson, und Robert F. Margolskee. 2011. „Glucose transporters and ATP-gated K⁺ (KATP) metabolic sensors are present in type 1 taste receptor 3 (T1r3)-expressing taste cells“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (13): 5431–36. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100495108>.

Young, Richard L. 2011. „Sensing via Intestinal Sweet Taste Pathways“. *Frontiers in Neuroscience* 5 (März). <https://doi.org/10.3389/fnins.2011.00023>.

Yuan, Hong, Chun-Yan Chen, Gui-Hong Chai, Yong-Zhong Du, und Fu-Qiang Hu. 2013. „Improved Transport and Absorption through Gastrointestinal Tract by PEGylated Solid Lipid Nanoparticles“. *Molecular Pharmaceutics* 10 (5): 1865–73. <https://doi.org/10.1021/mp300649z>.

Zegers, MMP, LE O'Brien, W Yu, A Datta, und KE Mostov. 2003. „Epithelial Polarity and Tubulogenesis in Vitro.“ *Trends in Cell Biology* 13 (4): 169–76. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(03\)00036-9](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(03)00036-9).

Zhang, Yifeng, Mark A. Hoon, Jayaram Chandrashekar, Ken L. Mueller, Boaz Cook, Dianqing Wu, Charles S. Zuker, und Nicholas J. P. Ryba. 2003. „Coding of Sweet, Bitter, and Umami Tastes: Different Receptor Cells Sharing Similar Signaling Pathways“. *Cell* 112 (3): 293–301. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00071-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00071-0).

Zhang, Zheng, Zhen Zhao, Robert Margolskee, und Emily Liman. 2007. „The Transduction Channel TRPM5 Is Gated by Intracellular Calcium in Taste Cells“. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (21): 5777–86. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4973-06.2007>.

Zweibaum, A., F. Alvarado, und C.H. van Os. 1986. „Enterocytic differentiation of cultured human colon cancer cell lines: negative modulation by D-glucose“. *Elsevier*, 345–53.

Zweibaum, Alain, Marc Laburthe, Etienne Grasset, und Daniel Louvard. 2011. „Use of Cultured Cell Lines in Studies of Intestinal Cell Differentiation and Function“. In *Comprehensive Physiology*, 223–55. American Cancer Society. <https://doi.org/10.1002/cphy.cp060407>.

11. Anhang

Tabelle 20: Rohdaten der TEER-Werte der CaCo-2 in Ωcm^2 nach Abzug des Blank-Wertes und Einbeziehung der Well-Fläche nach dem ROUT Test sowohl von der TEER-Messung mit der Chopstick Elektrode, als auch von jener mit dem Voltohmmeter.

<u>TEER [Ωcm^2]</u>	CaCo-2		
	Tag 7	Tag 14	Tag 21
	177.75	310.50	328.50
	135.00	423.00	490.50
	149.70	432.00	445.50
	156.60	246.60	472.50
	167.70	279.30	292.20
	136.50	225.80	289.50
	108.50	290.30	318.60
	149.70	252.90	355.50
			288.00
Mittelwert	147.39	307.55	364.53
Stabw.	23.13	78.65	82.38

Tabelle 21: Rohdaten der TEER-Werte der Cokultur in Ωcm^2 nach Abzug des Blank-Wertes und Einbeziehung der Well-Fläche nach dem ROUT Test sowohl von der TEER-Messung mit der Chopstick Elektrode, als auch von jener mit dem Voltohmmeter.

<u>TEER [Ωcm^2]</u>	Cokultur		
	Tag 7	Tag 14	Tag 21
	126.00	308.25	330.75
	92.25	249.30	274.50
	170.40	303.90	246.00
	144.60	230.00	285.90
	133.20	254.20	282.00
	132.60	250.50	285.90
	116.60		
Mittelwert	130.81	266.03	284.09
Stabw.	24.08	32.17	27.31

Tabelle 22: Rohdaten der TEER-Werte der HT29-MTX-E12 in Ωcm^2 nach Abzug des Blank-Wertes und Einbeziehung der Well-Fläche nach dem ROUT Test von der TEER-Messung mit der Chopstick Elektrode.

<u>TEER [Ωcm^2]</u>	HT29-MTX-E12		
	Tag 7	Tag 14	Tag 21
	11.80	138.90	231.90
	13.50	76.50	117.60
	19.50	119.50	233.70
	13.20	69.90	126.30
	12.30	96.60	181.10
Mittelwert	14.06	100.28	178.12
Stabw.	3.12	29.00	55.54

Tabelle 23: Rohdaten des Permeabilitätskoeffizienten P_{app} in $[10^{-6} \text{ cm/sec}]$ nach der 7-tägigen Inkubation der CaCo-2 Monokultur, der HT29-MTX-E12 Monokultur und der Cokultur mit Lucifer Yellow für 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten, nach dem ROUT Test.

P_{app}	CaCo-2					Cokultur					HT29-MTX-E12				
$[10^{-6} \text{ cm/sec}]$	15	30	60	90	120	15	30	60	90	120	15	30	60	90	120
	4.49	8.60	13.73	17.68	18.50	1.47	6.80	8.65	11.33	13.48	39.48	36.61	22.71	18.20	15.06
	2.25	6.24	12.46	18.57	17.52	-2.59	2.24	10.94	14.18	15.25	31.78	26.52	20.30	17.91	14.77
	4.51	7.96	15.28	19.36	20.20	0.20	4.37	11.72	14.96	16.59	19.89	30.86	35.15	33.10	32.63
	5.89	11.21	15.64	22.16	20.99	6.67	10.90	14.91	18.47	16.02	34.36	33.25	34.36	33.86	33.47
	-0.10	3.59	11.29	7.27	12.13	-0.74	1.87	12.95	11.70	11.59	34.82	32.32	37.09	31.69	27.58
Mittelwert	3.40	7.52	13.68	17.01	17.87	1.00	5.24	11.84	14.13	14.59	32.07	31.91	29.92	26.95	24.70
Standardabweichung	2.36	2.83	1.84	5.70	3.49	3.50	3.73	2.33	2.88	2.04	7.35	3.68	7.79	8.16	9.21

Tabelle 24: Rohdaten des Permeabilitätskoeffizienten P_{app} in $[10^{-6} \text{ cm/sec}]$ nach der 14-tägigen Inkubation der CaCo-2 Monokultur, der HT29-MTX-E12 Monokultur und der Cokultur mit Lucifer Yellow für 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten, nach dem ROUT Test.

P_{app} [10^{-6} cm/s ec]	CaCo-2					Cokultur					HT29-MTX-E12				
	15	30	60	90	120	15	30	60	90	120	15	30	60	90	120
	5.57	10.67	11.71	14.06	14.00	4.32	9.01	13.99	15.85	17.78	3.07	13.05	21.42	23.16	22.76
	5.96	11.16	14.08	15.17	15.21	1.97	9.29	14.34	17.67	13.18	1.65	6.03	16.51	14.39	12.96
	1.79	9.12	15.17	17.97	16.72	2.25	8.87	9.93	13.68	15.56	0.89	2.89	17.05	19.57	18.49
	2.21	9.85	12.70	14.95	17.41	1.95	8.46	15.76	15.63	18.23	1.55	4.98	16.28	19.57	18.75
	-0.23	3.93	8.56	12.92	13.49	1.50		13.92	14.04	15.48		43.43	27.32	21.98	18.75
Mittelwert	3.06	8.95	12.44	15.01	15.37	2.40	8.91	13.59	15.37	16.05	1.79	14.08	19.72	19.73	18.34
Stabw.	2.64	2.91	2.54	1.87	1.69	1.11	0.34	2.18	1.60	2.03	0.92	16.85	4.74	3.37	3.49

Tabelle 25: Rohdaten des Permeabilitätskoeffizienten P_{app} in $[10^{-6} \text{ cm/sec}]$ nach der 21-tägigen Inkubation der CaCo-2 Monokultur, der HT29-MTX-E12 Monokultur und der Cokultur mit Lucifer Yellow für 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten, nach dem ROUT Test.

P_{app} [10^{-6} cm/s ec]	CaCo-2					Cokultur					HT29-MTX-E12				
	15	30	60	90	120	15	30	60	90	120	15	30	60	90	120
	-0. 29	7. 09	12. 04	12. 94	16. 75	-0. 81	7. 62	16. 78	21. 02	21. 26	-2. 25	0. 73	20. 20	24. 99	25. 06
	0. 72	5. 78	14. 10	19. 06	21. 91	-0. 23	4. 95	12. 71	16. 30	16. 21	-0. 39	1. 85	14. 03	17. 29	16. 09
	-1. 11	2. 40	11. 19	13. 28	14. 76	-1. 43	2. 95	13. 45	17. 01	17. 39	-0. 18	2. 28	7.6 5	14. 92	19. 06
	-0. 65	2. 80	11. 02	13. 48	15. 72	-1. 11	3. 02	14. 97	18. 60	18. 67	0. 75	2. 72	10. 14	14. 16	14. 94
	0. 23	5. 74	11. 51	17. 90	19. 39	1. 51	8. 39	15. 51	20. 57	22. 35	0. 08	4. 20	15. 33	21. 54	19. 26
Mit- tel- wert	-0. 22	4. 76	11. 97	15. 33	17. 71	-0. 41	5. 39	14. 68	18. 70	19. 18	-0. 40	2. 35	13. 47	18. 58	18. 88
Stab w.	0. 72	2. 05	1.2 5	2.9 1	2.9 2	1. 16	2. 54	1.6 3	2.0 9	2.5 8	1. 12	1. 27	4.8 5	4.6 0	3.9 3

Tabelle 26: Rohdaten der parazellulären Permeabilität %LY_{basal} nach der 7-tägigen Inkubation der CaCo-2 Monokultur, der HT29-MTX-E12 Monokultur und der Cokultur mit Lucifer Yellow für 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten, nach dem ROUT Test.

<u>%</u> <u>LY</u> <u>basal</u>	CaCo-2					Cokultur					HT29-MTX-E12				
	15	30	60	90	120	15	30	60	90	120	15	30	60	90	120
	0.10	0.34	1.09	1.93	2.52	0.03	0.29	0.66	1.26	1.90	0.89	1.28	1.51	1.83	1.95
	0.05	0.26	1.01	2.08	2.28	-0.06	0.13	0.93	1.53	2.11	0.72	0.90	1.45	1.81	1.90
	0.10	0.32	1.24	2.10	2.76	0.15	0.19	0.97	1.61	2.31	0.45	1.20	2.66	3.36	4.47
	0.13	0.45	1.22	2.48	2.74	-0.02	0.43	1.16	2.01	2.05	0.77	1.17	2.60	3.49	4.57
		0.16	0.95	0.59	1.94		0.09	1.13	1.11	1.62	0.78	1.13	2.87	3.08	3.68
Mittelwert	0.08	0.31	1.10	1.84	2.45	0.02	0.23	0.97	1.50	2.00	0.72	1.14	2.22	2.71	3.32
Stabw.	0.05	0.11	0.13	0.73	0.35	0.08	0.14	0.20	0.35	0.26	0.17	0.14	0.68	0.83	1.31

Tabelle 27: Rohdaten der parazellulären Permeabilität %LY_{basal} nach der 14-tägigen Inkubation der CaCo-2 Monokultur, der HT29-MTX-E12 Monokultur und der Cokultur mit Lucifer Yellow für 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten, nach dem ROUT Test.

%LY _{basal}	CaCo-2					Cokultur					HT29-MTX-E12				
	15	30	60	90	120	15	30	60	90	120	15	30	60	90	120
	0.13	0.43	0.88	1.53	1.88	0.10	0.36	1.11	1.68	2.50	0.07	0.56	1.70	2.42	3.09
	0.13	0.45	1.08	1.60	2.07	0.04	0.40	1.12	1.92	2.37	0.04	0.26	1.38	1.94	2.33
	0.04	0.39	1.20	1.93	2.21	0.05	0.15	0.83	1.50	2.18	0.02	0.12	1.48	2.02	2.49
	0.05	0.42	0.97	1.61	2.46	0.04	0.38	1.26	1.59	2.62	0.03	0.21	1.38	2.07	2.51
	-0.01	0.18	0.70	1.45	1.82	0.03	0.37	1.10	1.44	2.19	1.11	1.49	1.84	2.20	2.46
Mittelwert	0.07	0.37	0.96	1.63	2.09	0.05	0.33	1.08	1.62	2.37	0.25	0.53	1.55	2.13	2.58
Stabw.	0.06	0.11	0.19	0.18	0.26	0.02	0.10	0.16	0.19	0.19	0.48	0.56	0.20	0.19	0.30

Tabelle 28: Rohdaten der parazellulären Permeabilität %LY_{basal} nach der 21-tägigen Inkubation der CaCo-2 Monokultur, der HT29-MTX-E12 Monokultur und der Cokultur mit Lucifer Yellow für 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten, nach dem ROUT Test.

<u>% LY basal</u>	CaCo-2					Cokultur					HT29-MTX-E12				
	15	30	60	90	120	15	30	60	90	120	15	30	60	90	120
	-0.01	0.32	0.95	1.35	2.45	-0.02	0.35	1.36	2.27	2.88	-0.05	0.21	1.73	2.65	3.41
	0.02	0.25	0.96	2.09	3.07	-0.01	0.23	1.05	1.76	2.18	-0.01	0.13	1.21	1.83	2.13
	-0.03	0.12	0.94	1.39	2.08	-0.03	0.15	1.15	1.82	2.37	0.00	0.03	0.67	1.73	2.71
	-0.01	0.13	0.93	1.43	2.23	-0.03	0.15	1.29	1.97	2.54	0.02	0.08	0.88	1.54	2.04
	0.01	0.26		2.03	2.64	0.03	0.36	1.24	2.26	3.08	0.00	0.10	1.34	2.35	2.49
Mittelwert	0.00	0.22	0.94	1.66	2.50	-0.01	0.25	1.22	2.02	2.61	-0.01	0.11	1.17	2.02	2.56
Stabw.	0.02	0.09	0.01	0.37	0.39	0.03	0.11	0.12	0.24	0.37	0.03	0.07	0.41	0.46	0.55

Tabelle 29: Rohdaten des CaCo-2 MTT in [%] Vitalität von Sucrose äs, Sucrose äm, NHDC äs, NHDC äm, Reb M äs, Reb M äm, Sucralose äs, Sucralose äm bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle K = Medium oder K_{DMSO} = K + 0.1% DMSO nach dem ROUT Test.

<u>Vitali- tät [%]</u>	K	K _{DMSO}	Sucrose		NHDC		Reb M		Sucralose	
			äs	äm	äs	äm	äs	äm	äs	äm
	90.60	137.00	111.42	98.66	94.28	99.82	103.48	92.62	87.97	75.11
	98.36	76.43	128.30	81.54	90.91	89.34	76.98	102.46	91.30	77.28
	111.04	86.57	95.90	87.29	84.95	74.94	97.60	110.51	100.67	90.83
	96.11	78.76	101.92	110.72	62.66	83.17	72.34	98.15	74.64	86.31
	100.21	102.83	122.33	111.39	64.06	78.90	75.03	93.22	75.66	73.84
	103.68	118.41	107.25	107.01	77.68	72.20	84.25	96.51	79.60	54.39
	95.01	98.52	75.81	64.98	66.97	79.28	81.03	92.83	79.60	72.45
	121.79	101.62	81.49	115.23	72.13	79.89	80.70	87.19	81.71	90.97
	83.20	99.87	76.87	76.19	76.79	95.26	86.55	86.18	70.00	79.57
	106.71	88.92	92.11	95.23	87.06	110.97	83.35	90.42	69.39	87.62
	102.09	93.81	146.61	103.02	89.01	106.16	74.25	89.49	69.70	118.91
	91.21	117.27	83.38	97.44	105.20	101.58		103.96	89.37	111.87
Mittel- wert	100	100	101.95	95.73	80.97	89.29	83.23	95.29	80.80	84.93
Stabw.	17.49	10.23	22.22	15.5	13.16	13.09	9.72	7.33	9.85	17.47

Tabelle 30: Rohdaten des Cokultur MTT in [%] Vitalität von Sucrose äs, Sucrose äm, NHDC äs, NHDC äm, Reb M äs, Reb M äm, Sucralose äs, Sucralose äm bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle K = Medium oder K_{DMSO} = K + 0.1% DMSO nach dem ROUT Test.

<u>Vitali- tät [%]</u>	K	K _{DMSO}	Sucrose		NHDC		Reb M		Sucralose	
			äs	äm	äs	äm	äs	äm	äs	äm
	99.40	111.68	96.83	115.03	81.21	99.84	125.59	78.63	75.82	90.99
	99.10	112.28	95.49	84.62	79.62	97.15	90.48	80.43	57.25	70.11
	101.50	102.42	88.93	80.49	81.86	98.55	114.68	71.40	74.78	58.54
	113.71	104.08	98.57	106.11	88.26	70.21	93.66	81.91	74.26	86.90
	88.80	93.50	94.63	85.54	93.11	96.07	86.59	93.58	77.53	75.54
	97.49	101.47	93.68	93.33	92.30	89.98	99.37	84.18	82.35	85.51
	102.83	98.14	93.21	90.89	94.11	87.64	100.95	99.84	85.98	91.05
	95.83	100.39	107.47	98.73	129.09	94.66	85.42	96.36	93.65	89.21
	101.34	97.64	98.29	94.14	100.91	98.24	124.09	107.17	90.60	91.92
	103.48	97.99	97.37	105.53	89.96	94.56	87.30	87.38	74.79	93.87
	104.76	104.37	101.04	91.83	81.88	91.97	86.14	100.77	73.30	88.86
	91.75	102.37	86.42	93.92	76.52	87.43	88.75	90.93	66.32	77.92
	108.82	97.85	93.88	87.57	105.67	107.38	100.91	93.84	98.70	115.60
	112.02	99.78	90.45	119.21	98.91	102.64	110.04	103.67	103.99	105.93
	79.16			101.79	105.85	113.47	104.90	94.39	105.95	107.23
Mittel- wert	100	101.71	95.45	96.58	93.28	95.32	99.92	90.97	82.35	88.61
Stabw.	8.90	5.23	5.26	11.14	13.61	9.87	13.58	10.15	13.93	14.57

Tabelle 31: Rohdaten der SLC5A1 qRT-PCR der CaCo-2 Zellen von K = Medium; K_{DMSO} = K + 0.1% DMSO, Sucrose äs, Sucrose äm, NHDC äs, NHDC äm, Reb M äs, Reb M äm, Sucralose äs, Sucralose äm normalisiert und bezogen auf die undifferenzierte Kontrolle nach dem ROUT Test.

<u>x-fache</u> <u>Änderung</u> <u>der Genex-</u> <u>pression</u>	K	K _{DMSO}	Sucrose		NHDC		Reb M		Sucralose	
			äs	äm	äs	äm	äs	äm	äs	äm
1 Woche	65.91	73.31	51.43	33.58	25.25	25.46	42.94	36.46	35.05	20.85
	62.85	75.94	54.47	26.60	34.35	27.02	47.08	38.5	36.63	19.15
	63.54	75.06	56.10	48.85	34.54	26.76	48.99	49.83	36.76	19.28
	29.34	59.97	54.16	42.74	53.97	28.74	76.67	42.47	22.58	42.81
	30.61	59.53	56.77	46.44	53.22	29.34	74.81	44.81	21.70	44.15
	29.16	58.32	59.87	61.25	55.94	27.85	75.22	59.80	22.53	43.19
	23.72	30.62	30.30	19.57	30.98	34.46	27.39	18.80	19.96	21.01
	23.62	29.82	30.50	19.98	31.52	36.43	28.07	20.07	20.93	21.10
	24.26	29.96	32.47	28.86	30.66	35.19	28.11	26.99	19.39	20.23
	51.42	33.83	32.04	23.20	33.16		33.98	25.5	33.36	35.48
	51.76	34.10	32.15	22.92	33.30		34.58	26.57	33.16	35.99
	51.41	35.03	33.00	31.45	34.95		34.44	34.02	33.92	32.41
Mittelwert	42.30	49.62	43.60	33.79	37.65	30.14	46.02	35.32	28.00	29.64
2 Wochen	17.01	19.13	12.56	13.23	10.42	4.10	19.17	12.48	7.26	10.36
	86.72	65.28	63.81	60.00	64.91	44.09	59.96	79.13	38.64	32.66
	43.24	64.71	62.93	62.37	64.80	42.98	59.92	58.93	38.16	32.99
	40.76	68.40	65.98	58.27	65.22	51.60	60.39	62.56	36.56	39.41
	53.89	54.80	55.43	51.54	82.42	48.39	47.09	46.99	47.73	38.56
	27.97	53.83	55.45	53.12	82.96	48.54	45.26	50.55	48.26	38.07
	28.80	55.17	54.83	53.50	90.01	55.74	47.03	52.71	49.41	41.71
	38.28	57.22	43.43	70.76	50.30	38.08	34.30	47.75	44.62	38.79
	35.75	54.27	53.30	72.81	43.88	37.35	38.8	44.89	43.63	36.83
	35.24	56.75	54.28	70.26	51.12	45.63	41.17	48.48	45.73	42.46
	44.76				53.97			40.02	48.98	44.35
					53.84				47.28	46.6
					53.91				50.08	50.97

Mittelwert	58.18	58.94	56.61	61.40	63.11	45.82	48.21	53.20	44.92	40.28
Stabw.	35.15	5.59	6.85	8.20	14.87	6.01	9.79	11.22	4.72	5.32
3 Wochen	18.01	36.33	27.27	12.31	25.8	20.48	15.39	13.30	24.15	19.13
	18.98	37.55	27.29	12.55	26.02	20.68	16.05	12.64	23.48	19.49
	17.71	37.89	28.34	12.50	27.09	20.22	16.18	13.49	23.68	20.35
	50.89	60.86	34.72	27.44	68.22	75.83	73.51	77.30	70.50	81.41
	51.70	63.86	34.34	41.60	67.45	82.69	71.83	51.06	68.35	78.58
	51.66	65.79	36.78	42.23	63.36	84.21	76.30	80.36	70.85	102.79
	33.48	97.67	42.81	30.59	30.07	30.34	94.01	91.27	108.42	101.32
	34.37	100.74	47.34	34.59	30.47	34.29	92.68	88.53	103.87	100.85
	30.88	104.03	50.06	36.53	32.5	33.69	97.89	43.73	109.51	103.86
	50.37	51.94		53.06	53.75	45.36	53.04	41.99	54.06	38.00
	50.24	52.29		52.73	54.62	45.24	54.49	43.93	51.35	37.86
	47.99	53.37		53.75	54.18	44.51	54.90		52.48	39.21
Mittelwert	38.02	63.53	36.55	34.16	44.46	44.79	59.69	50.69	63.39	61.90
Stabw.	14.14	24.57	8.56	15.62	17.24	23.69	30.44	30.11	31.60	35.91

Tabelle 32: Rohdaten der SLC5A1 qRT-PCR der CaCo-2 Zellen von Sucrose äs, Sucrose äm, NHDC äs, NHDC äm, Reb M äs, Reb M äm, Sucralose äs, Sucralose äm normalisiert und bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle nach dem ROUT Test.

<u>x-fache</u> <u>Änderung</u> <u>der Genex-</u> <u>pression</u>	Sucrose		NHDC		Reb M		Sucralose	
	äs	äm	äs	äm	äs	äm	äs	äm
1 Woche	0.80	0.52	0.91	0.94	0.57	0.49	0.47	0.28
	0.85	0.41	0.90	0.92	0.63	0.51	0.49	0.26
	0.88	0.76	0.94	0.92	0.66	0.67	0.49	0.26
	1.82	1.44	1.03	0.95	1.29	0.72	0.38	0.72
	1.91	1.56	1.05	0.97	1.26	0.76	0.37	0.74
	2.02	2.06	1.02	0.92	1.27	1.01	0.38	0.73
	1.27	0.82	0.97	1	0.91	0.62	0.66	0.70
	1.28	0.84	0.97	1.06	0.93	0.67	0.69	0.70
	1.36	1.21	1.02	1.03	0.93	0.90	0.64	0.67
	0.62	0.45			0.99	0.74	0.97	1.03
	0.62	0.44			1.01	0.77	0.97	1.05
	0.64	0.61			1	0.99	0.99	0.94
Mittelwert	1.17	0.93	0.98	0.97	0.95	0.74	0.63	0.67
Stabw.	0.52	0.53	0.05	0.05	0.24	0.17	0.24	0.28
2 Wochen	1.23	1.66	0.40	0.75	0.98	0.7	0.72	0.20
	1.23	1.83	0.40	0.83	0.99	0.74	0.73	0.20
	1.27	1.28	0.4	0.98	0.97	0.48	0.75	0.24
	1.39	1.31	1.25	0.67	0.91	0.89	0.82	0.58
	1.37	1.36	1.25	0.65	0.91	0.95	0.80	0.58
	1.44	1.27	1.36	0.78	0.91	0.71	0.84	0.63
	1.75	1.63	0.92	0.89	0.86	0.93	0.87	0.71
	1.75	1.68	0.80	0.89	0.83	0.97	0.84	0.67
	1.73	1.69	0.94	1.02	0.86	0.87	0.89	0.78
	1.13	1.83	0.96	0.68	0.61	0.80		0.79
	1.38	1.89	0.96	0.67	0.69	0.86		0.83
	1.41	1.82	0.96	0.81	0.73	0.71		0.91
Mittelwert	1.42	1.60	0.88	0.8	0.86	0.8	0.81	0.59

Stabw.	0.21	0.24	0.34	0.13	0.12	0.14	0.06	0.25
3 Wochen	1.50	0.68	0.69	0.55	0.41	0.36	1.11	0.51
	1.50	0.69	0.70	0.56	0.43	0.34	1.08	0.52
	1.55	0.69	0.73	0.54	0.43	0.36	1.12	0.55
	1.88	0.53	1.07	1.19	1.16	1.22	1.08	1.28
	1.82	0.81	1.06	1.30	1.13	0.80	1.03	1.24
	1.90	0.82	1	1.33	1.20	1.27	1.09	1.62
	1.06	0.93	0.30	0.30	0.93	0.91	1.03	1.01
	1.04	1.05	0.30	0.34	0.92	0.88	0.98	1
	1.12	1.11	0.32	0.33	0.97	0.83	1	1.03
	0.86	1.07	1.02	0.86	1.01	0.8		0.72
	0.96	1.06	1.04	0.86	1.04	0.84		0.72
	1.01	1.09	1.03	0.85	1.04			0.75
Mittelwert	1.35	0.88	0.77	0.75	0.89	0.78	0.95	1.04
Stabw.	0.38	0.20	0.31	0.37	0.29	0.32	0.19	0.30

Tabelle 33: Rohdaten der SLC5A1 qRT-PCR der Cokultur von K = Medium; K_{DMSO} = K + 0.1% DMSO, Sucrose äs, Sucrose äm, NHDC äs, NHDC äm, Reb M äs, Reb M äm, Sucralose äs, Sucralose äm normalisiert und bezogen auf die undifferenzierte Kontrolle nach dem ROUT Test.

<u>x-fache</u> <u>Änderung</u> <u>der Genex-</u> <u>pression</u>	K	K _{DMSO}	Sucrose		NHDC		Reb M		Sucralose	
			äs	äm	äs	äm	äs	äm	äs	äm
1 Woche	33.22	45.53	28.01	19.42	20.11	24.54	30.85	21.44	19.78	18.60
	37.87	45.00	26.32	25.14	20.31	26.28	30.84	27.78	19.82	18.18
	36.74	46.35	17.05	11.25	18.30	16.93	20.49	13.97	22.37	30.16
	18.79	28.64	17.62	11.21	19.11	16.65	21.28	14.62	23.75	31.05
	18.75	29.46	19.31	16.91	19.08	16.37	21.94	19.95	22.75	30.47
	19.4	29.85	8.40	6.16	8.22	9.02	8.33	6.26	5.64	7.88
	9.22	9.65	8.49	5.99	8.38	9.43	8.72	5.76	5.75	8.32
	9.35	9.81	9.21	9.31	8.51	9.06	8.98	7.55	5.68	8.18
	9.16	9.90	2.48	1.43	2.94	3.05	2.76	1.77	2.01	2.31
	2.25	2.58	2.51	1.38	3.02	3.02	2.80	1.80	2.08	2.34
	2.15	2.59	2.62	2.08	3.10	2.86	2.80	2.45	1.96	2.45
	2.09	2.74	28.01	19.42	20.11	24.54	30.85	21.44	19.78	18.6
Mittelwert	16.58	21.84	14.13	10.78	12.61	13.62	15.80	11.81	12.56	14.74
Stabw.	17.61	13.28	9.81	7.90	7.51	8.88	11.28	8.76	9.29	11.17
2 Wochen	39.68	67.92	39.68	76.79	69.13	94.14	51.15	45.51	57.58	51.66
	49.66	71.73	49.66	76.67	68.2	95.07	61.94	46.1	51.53	53.36
	21.63	31.54	21.63	31.66	34.43	46.89	31.77	29.87	30.75	39.23
	21.31	31.33	21.31	32.58	35.17	45.40	32.51	29.49	31.36	38.49
	28.85	32.58	28.85	33.13	35.01	41.75	39.78	30.93	28.92	40.14
	6.67	12.72	6.67	10.58	10.34	11.63	8.37	9.29	9.83	9.42
	6.61	12.58	6.61	10.59	11.03	11.69	8.81	9.13	10.98	9.56
	8.92	12.86	8.92	9.78	10.55	11.96	10.66	9.71	9.36	9.69
	7.33	10.26	7.33	10.31	9.21	10.24	8.41	7.19	8.22	10.54
	7.24	10.37	7.24	10.67	10.13	10.20	8.53	6.97	8.66	10.51
	9.53	10.95	9.53	10.62	9.47	10.42	10.43	6.97	7.32	11.10
	39.68	67.92	39.68	76.79	69.13	94.14	51.15	45.51	57.58	51.66

Mittelwert	20.60	31.02	32.24	29.38	40.30	27.15	23.02	26.32	27.95	27.53
Stabw.	15.51	24.51	27.82	23.01	35.71	20.50	16.52	20.65	19.22	21.98
3 Wochen	45.04	34.74	56.72	38.79	51.34	45.54	26.71	47.6	51.85	45.35
	46.07	35.84	53.94	37.82	50.05	47.23	26.68	50.46	51.41	44.97
	46.05	39.05	56.91	40.16	51.68	48.75	27.17	52.46	52.86	46.54
	42.51	40.91	36.31	32.26	36.2	30.21	22.23	36.54	39.88	42.8
	42.06	41.32	34.66	32.41	35.95	40.95	21.87	34.73	39.70	43.43
	20.62	23.11	38.96	34.00	36.60	41.17	22.50	36.43	40.15	45.36
	22.58	23.79	24.71	25.40	22.88	24.41	21.62	24.46	18.65	22.22
	23.28	23.72	22.62	26.11	23.82	25.62	21.18	23.93	17.59	20.17
	32.13	20.32	24.53	26.45	23.98	25.15	21.61	26.24	18.84	22.81
	21.22	20.76	22.55	22.17	22.77	23.41		24.82	29.53	27.95
	20.79	21.69	21.92	23.30	23.10	23.40		24.45	29.28	26.29
	45.04	34.74	22.79	24.90	23.52	23.82		26.4	29.74	28.63
Mittelwert	34.13	29.95	34.72	30.31	33.49	33.30	23.51	34.04	34.96	34.71
Stabw.	11.64	8.40	14.05	6.39	11.93	10.46	2.54	10.85	13.03	10.77

Tabelle 34: Rohdaten der SLC5A1 qRT-PCR der Cokultur von Sucrose äs, Sucrose äm, NHDC äs, NHDC äm, Reb M äs, Reb M äm, Sucralose äs, Sucralose äm normalisiert und bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle nach dem ROUT Test.

<u>x-fache</u>	Sucrose		NHDC		Reb M		Sucralose	
<u>Änderung</u>	äs	äm	äs	äm	äs	äm	äs	äm
<u>der Genex- pression</u>								
1 Woche	0.76	0.53	0.44	0.58	0.65	0.40	0.42	0.37
	0.78	0.54	0.44	0.54	0.68	0.47	0.43	0.41
	0.73	0.70	0.45	0.58	0.68	0.61	0.43	0.40
	0.90	0.59	0.62	0.58	0.70	0.48	0.76	1.03
	0.93	0.59	0.65	0.57	0.73	0.50	0.81	1.06
	1.02	0.89	0.65	0.56	0.75	0.68	0.78	1.04
	0.91	0.67	0.84	0.92	0.85	0.64	0.58	0.81
	0.92	0.65	0.86	0.96	0.89	0.59	0.59	0.85
	1	1.01	0.87	0.93	0.92	0.77	0.58	0.84
	1.15	0.66	1.11	1.16	1.05	0.67	0.76	0.88
	1.16	0.64	1.15	1.14	1.06	0.68	0.79	0.89
	1.21	0.96	1.17	1.09	1.06	0.93	0.74	0.93
Mittelwert	0.96	0.70	0.77	0.80	0.83	0.62	0.64	0.79
Stabw.	0.16	0.16	0.27	0.26	0.16	0.15	0.15	0.25
2 Wochen	1.64	1.12	1.37	0.77	0.65	0.89	0.75	0.84
	1.32	1.55	1.36	0.74	0.66	0.83	0.75	0.84
	1.36	1.53	1.38	0.90	0.67	0.75	0.77	0.85
	1.38	1.44	1.47	1	0.73	0.97	1.23	1.06
	1.43	1.47	1.43	1.02	0.72	0.99	1.21	1.09
	1.43	1.46	1.31	1.25	0.76	0.91	1.26	1.24
	1.32	1.40	0.91	0.66	0.68	0.77	0.74	0.61
	1.28	1.49	0.92	0.69	0.66	0.86	0.75	0.63
	1.33	1.43	0.94	0.84	0.66	0.74	0.76	0.69
	1.32	1.15	0.97	0.80		0.78	1	0.70
		1.26	0.97	0.81		0.82	1	0.73
		1.18	0.99	0.99		0.7	1.05	0.82
Mittelwert	1.38	1.37	1.17	0.87	0.69	0.83	0.94	0.84

Stabw.	0.10	0.15	0.23	0.17	0.04	0.09	0.21	0.20
3 Wochen	1.23	0.84	1.47	1.30	1.72	1.36	1.48	1.30
	1.17	0.82	1.43	1.35	1.73	1.45	1.47	1.29
	1.23	0.87	1.48	1.40	1.78	1.50	1.51	1.33
	0.83	0.74	0.90	0.75	0.66	0.90	0.99	1.06
	0.80	0.74	0.89	1.01	0.66	0.86	0.98	1.07
	0.89	0.78	0.91	1.02	0.67	0.90	0.99	1.12
	1.12	1.15	0.97	1.04	0.94	1.04	0.79	0.94
	1.02	1.18	1.01	1.09	0.93	1.02	0.75	0.86
	1.11	1.19	1.02	1.07	0.96	1.11	0.8	0.97
	0.91	0.90	1.09	1.12	1.03	1.19	1.41	1.34
	0.89	0.94	1.10	1.12	1.01	1.17	1.40	1.26
	0.92	1.01	1.12	1.14	1.03	1.26	1.42	1.37
Mittelwert	1.01	0.93	1.12	1.12	1.09	1.15	1.17	1.16
Stabw.	0.16	0.17	0.22	0.17	0.42	0.22	0.31	0.18

Tabelle 35: Rohdaten der SLC2A2 qRT-PCR der CaCo-2 Zellen von K = Medium; K_{DMSO} = K + 0.1% DMSO, Sucrose äs, Sucrose äm, NHDC äs, NHDC äm, Reb M äs, Reb M äm, Sucralose äs, Sucralose äm normalisiert und bezogen auf die undifferenzierte Kontrolle nach dem ROUT Test.

<u>x-fache</u> <u>Änderung</u> <u>der Genex-</u> <u>pression</u>	K	K _{DMSO}	Sucrose		NHDC		Reb M		Sucralose	
			äs	äm	äs	äm	äs	äm	äs	äm
1 Woche	1.96	3.50	1.56	1.61	1.49	1.78	2.39	2.31	1.27	1.37
	1.63	3.28	1.42	2.09	1.57	1.69	1.92	2.43	1.24	1.62
	1.96	2.84	1.16	1.85	1.42	1.60	2.11	2.12	1.17	1.60
	1.40	1.48	2.37	1.93	1.75	1.78	2.40	1.94	0.95	0.86
	1.52	1.48	2.25	1.79	1.65	1.89	2.19	1.77	1.03	0.84
	1.42	1.39	2.20	1.82	1.58	1.75	1.97	1.95	1.19	1.13
	1.12	1.30	1.82	1.42	1.32	1.37	1.27	1.29	0.89	1.22
	1.04	1.31	1.50	1.55	1.49	1.35	1.25	1.33	0.80	1.36
	1.21	1.04	1.46	1.49	1.43	1.34	1.33	1.39	0.91	1.32
	2.37	1.73	1.84	2.02	1.88	1.69	1.81	1.70	1.67	1.49
	2.33	1.88	1.72	1.93	1.80	1.76	1.85	1.74	1.74	1.42
	2.49	1.79	1.65	1.88	1.47	1.81	1.84	1.74	1.70	1.38
Mittelwert	1.70	1.92	1.75	1.78	1.57	1.65	1.86	1.81	1.21	1.30
Stabw.	0.51	0.82	0.37	0.22	0.17	0.19	0.40	0.36	0.33	0.25
2 Wochen	4.06	4.84	7.03	5.80	8.84	20.58	3.26	4.69	2.86	4.61
	4.09	4.71	7.13	5.47	8.66	20.54	3.24	4.90	2.61	4.78
	4.11	4.30	7.53	6.03	8.45	21.19	2.96	4.44	2.76	5.14
	3.45	5.35	4.33	4.22	6.64	0.01	2.90	3.54	2.82	0.34
	3.55	4.84	4.41	4.01	6.10	0.01	3.23	3.24	2.64	0.35
	3.66	4.93	4.32	4.27	5.77	0.01	2.99	3.36	2.75	0.41
	6.35	5.87	5.22	4.88	2.22	3.53		3.19	2.70	3.26
	6.36	5.78	5.19	4.94	2.91	3.60		3.11	2.86	3.23
	6.52	5.75	4.87	5.37	3.02	3.40		3.00	2.55	3.39
					3.86	5.50			3.02	4.08
					3.79	5.88			2.80	4.07
					3.68	5.81			2.95	4.32

Mittelwert	4.68	5.15	5.56	5.00	5.33	7.50	3.10	3.72	2.78	3.17
Stabw.	1.32	0.56	1.30	0.72	2.41	8.28	0.16	0.74	0.14	1.79
3 Wochen	5.56	10.17	7.73	4.98	10.61	5.33	6.98	5.69	5.73	3.52
	5.88	10.82	7.62	4.99	10.75	5.44	7.07	5.86	5.36	3.49
	5.73	10.68	7.73	5.40	10.55	5.58	6.97	6.12	5.59	3.57
	3.44	2.30	9.10	6.03	7.17	6.56	6.37	6.77	8.23	4.12
	3.51	2.34	8.79	6.18	6.54	7.34	5.83	6.92	8.37	3.81
	3.24	2.45	8.75	6.20	6.35	8.05	5.68	7.24	9.02	4.17
	7.46	3.47	5.37	5.61	4.33	4.13	3.36	3.11	3.91	2.82
	7.69	3.35	5.44	5.47	4.13	4.43	3.28	3.06	3.74	2.66
	7.79	3.38	5.49	5.45	4.02	4.83	3.10	3.12	3.85	3.00
	6.62	8.79	9.08	5.22	5.37	5.53	10.66	6.51	7.87	
	6.92	9.01	8.78	5.29	5.25	5.76	9.73	6.32	7.62	
	7.08	9.37	8.99	5.22	5.24	6.28	9.90	6.54	7.76	
Mittelwert	5.91	6.34	7.74	5.50	6.69	5.77	6.58	5.60	6.42	3.46
Stabw.	1.68	3.68	1.49	0.42	2.56	1.14	2.57	1.57	1.94	0.54

Tabelle 36: Rohdaten der SLC2A2 qRT-PCR der CaCo-2 Zellen von Sucrose äs, Sucrose äm, NHDC äs, NHDC äm, Reb M äs, Reb M äm, Sucralose äs, Sucralose äm normalisiert und bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle nach dem ROUT Test.

<u>x-fache</u> <u>Änderung</u> <u>der Genex-</u> <u>pression</u>	Sucrose		NHDC		Reb M		Sucralose	
	äs	äm	äs	äm	äs	äm	äs	äm
1 Woche	0.85	0.87	0.47	0.56	0.74	0.72	0.40	0.43
	0.77	1.13	0.49	0.53	0.60	0.76	0.39	0.50
	0.63	1	0.44	0.50	0.66	0.66	0.36	0.50
	1.63	1.33	1.21	1.23	1.66	1.34	0.65	0.59
	1.55	1.24	1.14	1.30	1.51	1.22	0.71	0.58
	1.52	1.25	1.09	1.21	1.36	1.34	0.82	0.78
	1.62	1.26	1.09	1.13	1.04	1.06	0.73	1
	1.34	1.38	1.22	1.11	1.03	1.09	0.66	1.12
	1.30	1.33	1.18	1.10	1.09	1.15	0.74	1.08
	0.77	0.84	1.04	0.94	1	0.95	0.93	0.83
	0.72	0.80	1	0.98	1.03	0.97	0.97	0.79
	0.69	0.78	0.82	1	1.02	0.97	0.95	0.77
Mittelwert	1.12	1.10	0.93	0.96	1.06	1.02	0.69	0.75
Stabw.	0.41	0.23	0.30	0.28	0.32	0.23	0.22	0.23
2 Wochen	1.24	1.28	0.37	0.87	1.35	0.68	0.61	0.19
	1.26	1.33	0.37	0.87	1.31	0.71	0.57	0.20
	1.32	1.37	0.36	0.90	1.36	0.61	0.60	0.22
	1.72	1.42	1.44	0.70	0.65	1.02	0.54	0.07
	1.75	1.34	1.32	0.71	0.64	1.06	0.57	0.08
	1.84	1.48	1.25	0.67	0.59	0.96	0.51	0.09
	1.22	1.19	0.44	0.95	0.50	0.70	0.52	0.65
	1.24	1.13	0.58	1.01	0.56	0.64	0.48	0.64
	1.22	1.20	0.60	1	0.52	0.67	0.51	0.67
	0.81	0.76	0.66			0.55		0.70
	0.81	0.77	0.65			0.54		0.70
	0.76	0.84	0.63			0.52		0.74
Mittelwert	1.27	1.18	0.72	0.64	0.83	0.72	0.44	0.41

Stabw.	0.36	0.25	0.39	0.40	0.39	0.19	0.20	0.29
3 Wochen	1.35	0.87	1	0.50	0.66	0.54	0.54	0.33
	1.33	0.87	1.02	0.52	0.67	0.55	0.51	0.33
	1.35	0.94	1	0.53	0.66	0.58	0.53	0.34
	2.68	0.73	3.04	2.78	0.99	0.91	1.15	1.75
	2.59	0.72	2.77	3.11	0.96	0.90	1.10	1.61
	2.58	0.71	2.69	3.41	0.91	0.92	1.13	1.77
	0.70	0.76	1.27	1.21	1.18	0.72	0.87	0.83
	0.71	0.77	1.21	1.30	1.07	0.70	0.84	0.78
	0.72	0.76	1.18	1.42	1.09	0.72	0.86	0.88
	1.32		0.59	0.61				0.85
	1.28		0.58	0.64				0.83
	1.31		0.58	0.69				0.86
Mittelwert	1.49	0.79	1.41	1.39	0.91	0.73	0.84	0.93
Stabw.	0.73	0.08	0.89	1.09	0.20	0.15	0.26	0.52

Tabelle 37: Rohdaten der SLC2A2 qRT-PCR der Cokultur von K = Medium; K_{DMSO} = K + 0.1% DMSO, Sucrose äs, Sucrose äm, NHDC äs, NHDC äm, Reb M äs, Reb M äm, Sucralose äs, Sucralose äm normalisiert und bezogen auf die undifferenzierte Kontrolle nach dem ROUT Test.

<u>x-fache</u> <u>Änderung</u> <u>der Genex-</u> <u>pression</u>	K	K _{DMSO}	Sucrose		NHDC		Reb M		Sucralose	
			äs	äm	äs	äm	äs	äm	äs	äm
1 Woche	0.80	0.68	0.55	0.41	0.34	0.47	0.67	0.55	0.38	0.37
	0.85	0.59	0.55	0.41	0.39	0.43	0.67	0.6	0.25	0.41
	0.82	0.66	0.54	0.36	0.36	0.42	0.65	0.69	0.39	0.42
	0.82	0.26	0.69	0.75	0.37	0.55	0.94	1.01	0.79	0.41
	0.81	0.29	0.61	0.74	0.34	0.58	0.98	1.04	0.77	0.42
	0.87	0.20	0.66	0.73	0.37	0.63	0.92	1.07	0.75	0.50
	0.73	0.78	0.94	0.84	0.75	0.95	0.76	0.76	0.69	0.46
	0.76	0.85	0.83	0.96	0.76	0.94	0.83	0.74	0.65	0.45
	0.81	0.71	0.82	0.93	0.66	0.86	0.82	0.79	0.65	0.44
	0.60	0.51	0.55	0.63	0.55	0.62	0.50	0.58	0.40	
		0.56	0.55	0.62	0.56	0.59	0.53	0.62	0.47	
		0.56	0.49	0.59	0.56	0.65	0.45	0.57	0.45	
Mittelwert	0.79	0.55	0.65	0.66	0.50	0.64	0.72	0.75	0.55	0.43
Stabw.	0.08	0.21	0.14	0.20	0.16	0.18	0.18	0.19	0.18	0.04
2 Wochen	2.71	3.24	1.89	3.16	3.96	3.29	2.36	3.33	2.33	2.64
	2.60	3.19	2.05	3.11	3.65	3.31	2.55	3.31	2.29	2.62
	2.74	3.12	1.92	3.21	3.81	3.18	2.56	2.98	2.46	2.56
	3.70	3.05	3.25	3.65	4.73	2.38	1.73	2.05	2.6	1.20
	3.65	2.73	3.27	3.79	4.40	2.44	1.72	2.08	2.54	1.25
	3.56	2.85	3.10	3.73	4.36	2.44	1.59	1.72	2.50	1.17
	3.02	4.23	3.52	3.49	4.12	3.16	3.26	3.33	3.07	2.96
	3.12	3.87	3.52	3.53	3.58	3.24	3.06	3.31	2.96	2.83
	2.99	3.96	3.67	3.53	3.72	3.28	2.93	2.74	3.22	2.80
	1.88	2.02	2.57	2.20	2.31	2.16	2.07	1.98	1.56	1.32
	2.12	1.90	2.48	2.24	2.24	2.31	1.83	1.98	1.61	1.38
	2.08	2.09	2.49	2.39	2.27	2.22	2.16	1.70	1.75	1.41

Mittelwert	2.85	3.02	2.81	3.17	3.60	2.78	2.32	2.54	2.41	2.01
Stabw.	0.61	0.76	0.66	0.58	0.87	0.49	0.56	0.68	0.55	0.77
3 Wochen	3.89	5.45	6.08	4.21	4.17	2.98	5.72	4.73	3.32	4.06
	4.03	5.41	5.83	3.90	4.08	2.93	5.80	4.93	3.13	3.83
	3.92	5.60	6.32	4.50	4.26	3.18	5.57	5.01	3.22	4.18
	5.96	3.21	5.33	4.20	4.18	5.82	3.21	4.79	4.26	5.09
	5.68	3.24	4.99	4.21	4.42	5.97	3.06	4.59	4.11	5.01
	5.83	3.23	5.22	4.17	4.30	6.28	3.18	4.66	4.24	5.13
	3.18	3.39	3.57	3.59	3.69	2.70	3.53	2.37	3.34	3.19
	3.54	3.15	3.64	3.76	3.67	2.60	3.95	3.17	3.38	2.96
	3.44	3.44	3.45	3.81	3.43	2.81	3.59	3.20	3.39	3.17
	9.09	7.00	6.23		5.58	5.75	5.19	6.78	3.79	6.92
	6.39	7.10	6.13		6.17	6.39	5.24	6.08	3.77	6.74
	6.43	7.22	6.04		6.01	6.64	5.29	6.85	3.92	6.72
Mittelwert	5.12	4.79	5.23	4.04	4.50	4.51	4.44	4.76	3.66	4.75
Stabw.	1.75	1.69	1.10	0.29	0.91	1.73	1.11	1.38	0.41	1.43

Tabelle 38: Rohdaten der SLC2A2 qRT-PCR der Cokultur von Sucrose äs, Sucrose äm, NHDC äs, NHDC äm, Reb M äs, Reb M äm, Sucralose äs, Sucralose äm normalisiert und bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle nach dem ROUT Test.

<u>x-fache</u> <u>Änderung</u> <u>der Genex-</u> <u>pression</u>	Sucrose		NHDC		Reb M		Sucralose	
	äs	äm	äs	äm	äs	äm	äs	äm
1 Woche	0.67	0.50	0.53	0.73	1.04	0.85	0.60	0.57
	0.67	0.50	0.61	0.66	1.04	0.93	0.39	0.63
	0.65	0.43	0.55	0.65	1.01	1.08	0.61	0.65
	0.83	0.89	1.46	2.18	0.97	0.97	0.88	1.61
	0.73	0.89	1.36	2.32	1.06	0.94	0.84	1.68
	0.79	0.88	1.47	2.51	1.05	1.01	0.83	1.98
	1.22	1.09	0.95	1.21	0.93	1.07	0.74	0.99
	1.09	1.24	0.97	1.20	0.99	1.16	0.88	1.09
	1.07	1.21	0.85	1.10	0.83	1.06	0.84	1.06
	1.09	1.25	1.01	1.16				0.85
	1.09	1.22	1.04	1.09				0.83
	0.98	1.17	1.03	1.20				0.82
Mittelwert	0.91	0.94	0.99	1.33	0.99	1.01	0.73	1.06
Stabw.	0.2	0.31	0.32	0.64	0.07	0.09	0.17	0.46
2 Wochen	0.70	1.18	1.25	1.04	0.74	1.05	0.73	0.83
	0.76	1.16	1.15	1.04	0.80	1.04	0.72	0.82
	0.72	1.20	1.20	1	0.80	0.94	0.77	0.80
	0.89	1	1.64	0.83	0.60	0.71	0.90	0.42
	0.90	1.04	1.53	0.85	0.60	0.72	0.88	0.43
	0.85	1.03	1.52	0.85	0.55	0.60	0.87	0.41
	1.16	1.15	1.03	0.79	0.81	0.83	0.76	0.74
	1.16	1.16	0.89	0.81	0.76	0.82	0.74	0.70
	1.20	1.16	0.93	0.82	0.73	0.68	0.80	0.70
	1.27	1.09	1.15	1.08	1.03	0.99	0.78	0.66
	1.22	1.10	1.11	1.15	0.91	0.99	0.8	0.69
	1.23	1.18	1.13	1.10	1.07	0.85	0.87	0.71
Mittelwert	1.01	1.12	1.21	0.94	0.79	0.85	0.8	0.66

Stabw.	0.22	0.07	0.24	0.13	0.16	0.15	0.06	0.15
3 Wochen	0.92	1.07	0.76	0.54	1.04	0.86	0.61	0.74
	0.86	0.99	0.74	0.53	1.06	0.90	0.57	0.70
	0.90	1.14	0.78	0.58	1.02	0.91	0.59	0.76
	1.05	0.72	1.30	1.80	0.99	1.48	1.32	1.58
	1.07	0.72	1.37	1.85	0.95	1.42	1.27	1.55
	1.02	0.72	1.33	1.95	0.98	1.44	1.31	1.59
	0.85	1.06	1.11	0.81	1.06	0.71	1.01	0.96
	0.84	1.11	1.10	0.78	1.19	0.95	1.02	0.89
	0.83	1.12	1.03	0.85	1.08	0.96	1.02	0.96
		0.92	0.78	0.81	0.73	0.95	0.53	0.97
		0.95	0.87	0.90	0.74	0.86	0.53	0.95
		0.96	0.85	0.93	0.75	0.96	0.55	0.95
Mittelwert	0.93	0.96	1	1.03	0.97	1.04	0.86	1.05
Stabw.	0.10	0.16	0.24	0.52	0.15	0.26	0.33	0.33

Tabelle 39: Rohdaten der TAS1R3 qRT-PCR der CaCo-2 Zellen von K = Medium; K_{DMSO} = K + 0.1% DMSO, Sucrose äs, Sucrose äm, NHDC äs, NHDC äm, Reb M äs, Reb M äm, Sucralose äs, Sucralose äm normalisiert und bezogen auf die undifferenzierte Kontrolle nach dem ROUT Test.

<u>x-fache</u> <u>Änderung</u> <u>der Genex-</u> <u>pression</u>	K	K_{DMSO}	Sucrose		NHDC		Reb M		Sucralose	
			äs	äm	äs	äm	äs	äm	äs	äm
1 Woche	1.37	7.26	5.54	3.56	4.30	0.95	0.23	1.81	1.65	1.54
	0.93	5.61	2.61	3.61	0.24	1.16	0.86	1.40	2.15	2.04
	0.36	5.90	3.31	0.23	0.15	2.13	1.06	1.24	1.69	2.08
	0.41	0.16	0.35	0.64	0.46	0.66	3.33	0.80	0.24	0.36
	0.58	0.11	0.59	0.45	0.75	0.95	3.34	1.12	0.30	0.15
	0.77	0.13	0.49	1.66	0.53	0.78	0.98	0.88	0.28	0.09
	0.97	0.59	1.96	2.13	0.66	0.84	0.66	1.76	1.05	1.03
	0.63	0.89	1.97	1.66	1.90	0.64	0.35	1.06	0.36	1.02
	1.84	0.54	1.46		0.96	0.85	2.50	0.97	0.62	0.84
	1.49	1.83	0.93		1.44	2.07	1.81	1.05	1.06	2.27
	0.82	3.18	2.03			1.30	2.01	1.26	1.53	2.04
		2.04	0.76						1.95	2.40
Mittelwert	0.92	2.35	1.83	1.74	1.14	1.12	1.56	1.21	1.07	1.32
Stabw.	0.47	2.55	1.48	1.32	1.23	0.52	1.12	0.33	0.71	0.85
2 Wochen	1.90	3.37	1.95	2.99	0.75	2.87	2.80	2.21	0.98	0.79
	2.11	5.05	3.70	1.89	0.71	3.47	2.42	2.72	0.34	0.86
	2.70	1.63	1.90	2.13	0.78	3.49	4.92	0.82	0.82	0.33
	0.33	0.26	0.51	0.18	0.36	0.29	0.84	0.36	0.49	0.16
	0.44	0.25	0.45	0.45	0.44	0.25	0.53	0.34	0.38	0.42
	0.40	0.38	0.74	0.23	0.63	0.14	0.33	0.26	0.36	0.43
	1.45	1.57	1.18	1.99	0.67	1.56	0.98	0.70	1.01	1.06
	1.23	1.44	1.18	0.97	0.77	1.96	0.57	0.95	0.95	1.09
	0.84	0.97	1.03	1.62	0.66	1.34	1.04	0.64	1.04	0.99
	4.10	1.39	1.82	4.72	1.20	3.18	1.30	2.33	0.93	2.62
	5.44	4.34	1.06	2.80	0.98	2.77	1.71	1.60	1.98	2.23
	2.15	2.83	2.12	3.43	1.48	1.51	2.39	2.33	1.67	1.65

Mittelwert	1.92	1.96	1.47	1.95	0.79	1.90	1.65	1.27	0.91	1.05
Stabw.	1.56	1.60	0.90	1.39	0.31	1.25	1.31	0.91	0.51	0.76
3 Wochen	0.74	0.66	0.60	0.43	0.79	0.73	1.45	0.72	1.23	1.41
	0.69	0.37	0.56	0.36	0.31	0.71	1.70	0.51	0.67	0.65
	0.15	0.39	0.63	0.41	0.32	0.65	2.12	1.16	0.98	0.93
	0.34	0.47	0.57	0.58	0.23	0.31	0.50	0.53	0.38	0.59
	1.34	0.29	0.35	0.40	0.22	0.68	0.54	0.37	0.37	0.57
	0.92	0.27	0.69	1.66	0.38	0.46	0.56	0.40	0.31	0.87
	1.62	1.65	0.79	1.42	1.04	0.49	0.91	1.32	1.28	1.67
	2.96	1.07	1.19	1.71	1.02	0.86	1.15	1.13	0.94	1.41
	3.16	1.57	0.88	1.98	1.25	1.39	0.98	1.01	1.58	1.38
	1.39	2.59	1.71	2.17	1.58	1.81	2.26	2.67	3.10	2.46
		2.23	1.66	3.00	2.14	1.52	3.27		3.23	2.00
		3.32	2.67		1.63	1.04	1.99		2.53	1.22
Mittelwert	1.33	1.24	1.03	1.18	0.91	0.89	1.45	0.98	1.38	1.26
Stabw.	1.02	1.03	0.68	0.94	0.64	0.46	0.85	0.69	1.04	0.58

Tabelle 40: Rohdaten der TAS1R3 qRT-PCR der CaCo-2 Zellen von Sucrose äs, Sucrose äm, NHDC äs, NHDC äm, Reb M äs, Reb M äm, Sucralose äs, Sucralose äm normalisiert und bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle nach dem ROUT Test.

<u>x-fache</u> <u>Änderung</u> <u>der Genex-</u> <u>pression</u>	K	K _{DMSO}	Sucrose		NHDC		Reb M		Sucralose	
			äs	äm	äs	äm	äs	äm	äs	äm
1 Woche	1.45	1.78	0.84	0.05	0.69	0.24	1.08	1.58	1.30	0.35
	0.81	1.24	1	0.32	0.70	0.78	0.78	0.94	1.13	0.50
	0.92	1.56	1.29	1.50	1.10	0.54	0.66	0.89	0.69	0.41
	0.71	1.17	1.41	1.29	1.75	1.71	0.99	0.81	0.64	1.77
	0.80	1.63	0.88	0.78	1.56	1.86	0.95	1.56	0.69	2.05
	0.63	0.64	1.74	0.82	1.43	2.18	0.93	1.90	0.97	1.70
	0.67	0.39	0.38	0.66	0.99	0.61	0.83	0.65	0.16	0.61
	0.7	0.30	0.46	1.11	0.47	0.36	1.33	0.26	0.32	0.81
	0.92	0.62	0.33	0.40	0.67	1.24	0.80	0.90	0.34	0.70
	1	0.34	0.79		0.39	0.57	0.79	0.42	0.63	0.74
	0.66	0.70	0.41		0.81	0.32	0.64		0.62	0.66
	1.02	0.36	0.19		0.65	0.68	0.29		0.49	1.16
Mittelwert	0.86	0.89	0.81	0.77	0.93	0.92	0.84	0.99	0.66	0.95
Stabw.	0.23	0.55	0.23	0.48	0.47	0.44	0.66	0.26	0.53	0.33
2 Wochen	0.81	0.96	1.33	1.40	1.32	2.89	1.15	0.75	0.61	1.96
	0.44	1.13	1.22	1.62	2.27	1.14	0.61	0.93	0.91	2.07
	2.03	2.03	1.46	1.57	1.33	1	0.90	1.03	0.79	1.10
	0.99	1.76	0.96	1.6	0.90	0.70	1.16	0.97	2.05	2.17
	1.07	1.58	0.67	1.39	1.03	0.77	1.09	0.75	2.43	1.18
	0.93	1.93	0.75	1.97	1.86	1.51	1.27	0.78	1.37	1.33
	0.56	1.05	1.13	1.09	1.27	1.23	0.75	0.69	1.34	0.96
	1.23	0.91	0.88	1.59	1.03	1.16	0.56	0.94	0.45	1.31
	0.64	1.61	1.25	1	0.76	1.34	0.36	0.86	1.40	1.31
	0.44	1.58	1.78	0.68	0.74	1.19	0.62	0.67	0.84	0.94
		2.18	1.85	0.62	1.02		0.68		0.92	0.93
		1.88	1.95	1.23			0.98		1.01	
Mittelwert	0.91	1.55	1.27	1.31	1.23	1.29	0.84	0.84	1.18	1.39

Stabw.	0.48	0.44	0.43	0.40	0.47	0.61	0.29	0.13	0.58	0.46
3 Wochen	0.76	1.56	1.62	0.69	1.55	3.24	1.72	0.85	1.05	0.66
	1.66	2.64	2.0	1.63	1.94	5.09	2.28	0.73	0.87	1.36
	1.79	1.69	1.89	1.95	0.73	3.48	1.76	0.86	1.14	0.98
	1.64	2.16	1.26	1.74	2.07	2.46	1.42	1.82	0.46	0.89
	0.95	1.23	1.02	1.90	1.50	1.08	0.91	2.13	1.05	0.44
	1.21	1.65	1.41	1.87	1.96	1.48	1.87	1.57	0.37	0.82
	0.74	1.29	0.69	0.94	0.89	2.54	1.98	1.65	1.26	1.76
	1.36	1.30	1.10	3.15	0.94	3.14	1.55	0.91	1.22	1.20
	1.21	0.73	2.24	2.48	1.18	1.86	1.69	1.56	1.04	2.29
		3.57	1.90	2.63	1.49	1.75	0.96	3.08	1.84	2.29
		3.52	1.46		2.18	1.86	1.83	1.75	1.81	2.63
		3.61	1.33		1.97			3.61	1.86	3.13
Mittelwert	1.26	2.08	1.49	1.90	1.53	2.54	1.63	1.71	1.16	1.54
Stabw.	0.39	1.01	0.45	0.74	0.50	1.14	0.41	0.89	0.49	0.87

Tabelle 41: Rohdaten der TAS1R3 qRT-PCR der Cokultur von K = Medium; K_{DMSO} = K + 0.1% DMSO, Sucrose äs, Sucrose äm, NHDC äs, NHDC äm, Reb M äs, Reb M äm, Sucralose äs, Sucralose äm normalisiert und bezogen auf die undifferenzierte Kontrolle nach dem ROUT Test.

<u>x-fache</u> <u>Änderung</u> <u>der Genex-</u> <u>pression</u>	K	K _{DMSO}	Sucrose		NHDC		Reb M		Sucralose	
			äs	äm	äs	äm	äs	äm	äs	äm
1 Woche	1.45	1.78	0.84	0.05	0.69	0.24	1.08	1.58	1.30	0.35
	0.81	1.24	1	0.32	0.70	0.78	0.78	0.94	1.13	0.50
	0.92	1.56	1.29	1.50	1.10	0.54	0.66	0.89	0.69	0.41
	0.71	1.17	1.41	1.29	1.75	1.71	0.99	0.81	0.64	1.77
	0.80	1.63	0.88	0.78	1.56	1.86	0.95	1.56	0.69	2.05
	0.63	0.64	1.74	0.82	1.43	2.18	0.93	1.90	0.97	1.70
	0.67	0.39	0.38	0.66	0.99	0.61	0.83	0.65	0.16	0.61
	0.7	0.30	0.46	1.11	0.47	0.36	1.33	0.26	0.32	0.81
	0.92	0.62	0.33	0.40	0.67	1.24	0.80	0.90	0.34	0.70
	1	0.34	0.79		0.39	0.57	0.79	0.42	0.63	0.74
	0.66	0.70	0.41		0.81	0.32	0.64		0.62	0.66
	1.02	0.36	0.19		0.65	0.68	0.29		0.49	1.16
Mittelwert	0.86	0.89	0.81	0.77	0.93	0.92	0.84	0.99	0.66	0.95
Stabw.	0.23	0.55	0.23	0.48	0.47	0.44	0.66	0.26	0.53	0.33
2 Wochen	0.81	0.96	1.33	1.40	1.32	2.89	1.15	0.75	0.61	1.96
	0.44	1.13	1.22	1.62	2.27	1.14	0.61	0.93	0.91	2.07
	2.03	2.03	1.46	1.57	1.33	1	0.90	1.03	0.79	1.10
	0.99	1.76	0.96	1.6	0.90	0.70	1.16	0.97	2.05	2.17
	1.07	1.58	0.67	1.39	1.03	0.77	1.09	0.75	2.43	1.18
	0.93	1.93	0.75	1.97	1.86	1.51	1.27	0.78	1.37	1.33
	0.56	1.05	1.13	1.09	1.27	1.23	0.75	0.69	1.34	0.96
	1.23	0.91	0.88	1.59	1.03	1.16	0.56	0.94	0.45	1.31
	0.64	1.61	1.25	1	0.76	1.34	0.36	0.86	1.40	1.31
	0.44	1.58	1.78	0.68	0.74	1.19	0.62	0.67	0.84	0.94
		2.18	1.85	0.62	1.02		0.68		0.92	0.93
		1.88	1.95	1.23			0.98		1.01	

Mittelwert	0.91	1.55	1.27	1.31	1.23	1.29	0.84	0.84	1.18	1.39
Stabw.	0.48	0.44	0.43	0.40	0.47	0.61	0.29	0.13	0.58	0.46
3 Wochen	0.76	1.56	1.62	0.69	1.55	3.24	1.72	0.85	1.05	0.66
	1.66	2.64	2.0	1.63	1.94	5.09	2.28	0.73	0.87	1.36
	1.79	1.69	1.89	1.95	0.73	3.48	1.76	0.86	1.14	0.98
	1.64	2.16	1.26	1.74	2.07	2.46	1.42	1.82	0.46	0.89
	0.95	1.23	1.02	1.90	1.50	1.08	0.91	2.13	1.05	0.44
	1.21	1.65	1.41	1.87	1.96	1.48	1.87	1.57	0.37	0.82
	0.74	1.29	0.69	0.94	0.89	2.54	1.98	1.65	1.26	1.76
	1.36	1.30	1.10	3.15	0.94	3.14	1.55	0.91	1.22	1.20
	1.21	0.73	2.24	2.48	1.18	1.86	1.69	1.56	1.04	2.29
		3.57	1.90	2.63	1.49	1.75	0.96	3.08	1.84	2.29
		3.52	1.46		2.18	1.86	1.83	1.75	1.81	2.63
		3.61	1.33		1.97			3.61	1.86	3.13
Mittelwert	1.26	2.08	1.49	1.90	1.53	2.54	1.63	1.71	1.16	1.54
Stabw.	0.39	1.01	0.45	0.74	0.50	1.14	0.41	0.89	0.49	0.87

Tabelle 42: Rohdaten der TAS1R3 qRT-PCR der Cokultur von Sucrose äs, Sucrose äm, NHDC äs, NHDC äm, Reb M äs, Reb M äm, Sucralose äs, Sucralose äm normalisiert und bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle nach dem ROUT Test.

<u>x-fache</u>	Sucrose		NHDC		Reb M		Sucralose	
<u>Änderung</u>	äs	äm	äs	äm	äs	äm	äs	äm
<u>der Genex- pression</u>								
1 Woche	0.79	0.04	0.45	0.16	0.71	1.04	0.85	0.23
	0.94	0.30	0.46	0.51	0.51	0.82	0.74	0.33
	1.22	2.12	0.72	0.35	0.43	0.78	0.45	0.27
	1.98	1.81	1.53	1.49	0.86	0.70	0.56	1.54
	1.24	1.10	1.36	1.62	0.83	3.58	0.60	1.78
	2.45	1.07	1.25	1.91	0.82	1.50	0.85	1.49
	0.50	0.74	2.28	1.39	1.90	0.56	0.36	1.39
	0.61	1.24	1.07	0.82	3.05	1.93	0.74	1.86
	0.44	0.45	1.54	2.84	1.84	0.90	0.79	1.60
	0.88		0.83	1.21	1.69		1.34	1.59
	0.46		1.73	0.69	1.37		1.32	1.41
	0.22		1.38	1.45	0.62		1.05	2.47
Mittelwert	0.98	0.99	1.22	1.20	1.22	1.31	0.80	1.33
Stabw.	0.66	0.69	0.54	0.75	0.78	0.95	0.31	0.70
2 Wochen	2.12	2.22	2.27	2.10	0.84	0.54	0.45	1.43
	1.94	2.58	0.96	0.83	0.45	0.67	0.66	1.51
	2.33	2.50	1.65	0.57	0.65	0.59	0.58	1.23
	0.70	1.17	0.76	0.40	0.66	0.55	1.17	0.67
	0.49	1.02	0.51	0.44	0.62	0.63	1.38	1.11
	0.55	1.44	0.59	1.26	0.72	0.66	0.78	0.81
	1.51	1.46	1.56	1.03	0.63	0.58	1.13	1.10
	1.18	2.13	1.07	0.62	0.47	0.50	0.38	0.69
	1.67	1.34	0.87	0.72	0.30	0.46	1.17	0.50
	2.14	0.82	0.40	0.63	0.33	0.36	0.45	0.50
	2.22	0.75	0.40		0.36		0.49	
	2.34	1.48	0.54		0.52		0.54	
Mittelwert	1.60	1.57	0.96	0.86	0.55	0.55	0.76	0.95

Stabw.	0.70	0.63	0.59	0.51	0.17	0.10	0.35	0.37
3 Wochen	1.15	0.49	0.79	1.65	0.88	0.43	0.53	0.34
	1.43	1.29	0.99	2.59	1.16	0.37	0.44	0.69
	1.35	1.55	0.37	1.77	1.05	0.44	0.58	0.50
	1	1.38	1.23	1.46	0.84	1.08	0.27	0.53
	0.81	1.72	0.89	0.64	0.54	1.27	0.62	0.26
	1.11	1.70	1.17	0.88	1.69	0.94	0.22	0.49
	0.63	0.85	0.80	2.29	1.79	1.49	1.13	1.59
	1	0.60	0.85	2.83	1.40	0.82	1.10	1.08
	2.02	0.47	1.06	0.52	0.47	1.41	0.94	2.06
	0.36	0.50	0.42	0.49	0.27	0.86	0.52	0.64
	0.28		0.61	0.52	0.51	0.49	0.51	0.74
	0.25		0.55			1.01	0.52	0.88
Mittelwert	0.95	1.05	0.81	1.42	0.96	0.88	0.62	0.82
Stabw.	0.52	0.52	0.28	0.88	0.51	0.39	0.29	0.53

Tabelle 43: Rohdaten der KCNJ8 qRT-PCR der CaCo-2 Zellen von K = Medium; K_{DMSO} = K + 0.1% DMSO, Sucrose äs, Sucrose äm, NHDC äs, NHDC äm, Reb M äs, Reb M äm, Sucralose äs, Sucralose äm normalisiert und bezogen auf die undifferenzierte Kontrolle nach dem ROUT Test.

<u>x-fache</u> <u>Änderung</u> <u>der Genex-</u> <u>pression</u>	K	K _{DMSO}	Sucrose		NHDC		Reb M		Sucralose	
			äs	äm	äs	äm	äs	äm	äs	äm
1 Woche	0.44	0.59	0.46	0.55	0.6	0.52	0.53	0.55	0.55	0.78
	0.44	0.50	0.45	0.62	0.65	0.55	0.53	0.54	0.57	0.88
	0.49	0.58	0.47	0.59	0.57	0.57	0.56	0.55	0.53	0.83
	0.11	0.13	0.08	0.09	0.12	0.12	0.12	0.10	0.50	0.09
	0.11	0.14	0.09	0.10	0.11	0.12	0.12	0.10	0.53	0.09
	0.13	0.12	0.09	0.07	0.11	0.12	0.11	0.11	0.53	0.09
	0.55	0.59	0.63	0.60	0.68	0.58	0.55	0.61	0.42	0.69
	0.55	0.62	0.58	0.56	0.66	0.64	0.58	0.67	0.41	0.69
	0.55	0.59	0.60	0.67	0.65	0.65	0.59	0.76	0.41	0.71
	0.36	0.39	0.54	0.45	0.45	0.49	0.38	0.39		0.42
	0.38	0.43	0.54	0.47	0.41	0.44	0.37	0.40		0.42
	0.31	0.42	0.51	0.50	0.44	0.51	0.34	0.39		0.41
Mittelwert	0.37	0.42	0.42	0.44	0.45	0.44	0.40	0.43	0.50	0.51
Stabw.	0.17	0.19	0.21	0.22	0.23	0.20	0.19	0.23	0.06	0.30
2 Wochen	0.52	0.64	0.67	0.69	0.61	0.73	0.62	0.72	0.47	0.55
	0.62	0.75	0.61	0.73	0.59	0.72	0.61	0.79	0.46	0.54
	0.53	0.55	0.63	0.62	0.56	0.79	0.53	0.60	0.44	0.61
	0.10	0.10	0.15	0.10	0.12	0.13	0.18	0.14	0.15	0.14
	0.10	0.09	0.14	0.12	0.13	0.12	0.18	0.17	0.15	0.14
	0.11	0.08	0.14	0.13	0.13	0.14	0.15	0.14	0.15	0.15
	0.45	0.63	0.63	0.53	0.54	0.48	0.46	0.59	0.67	0.53
	0.53	0.57	0.60	0.57	0.49	0.48	0.49	0.58	0.58	0.54
	0.56	0.61	0.58	0.56	0.46	0.53	0.49	0.58	0.63	0.54
	0.45	0.55	0.39	0.40	0.39	0.35	0.37	0.39	0.43	0.44
	0.43	0.48	0.39	0.44	0.38	0.37	0.39	0.38	0.42	0.46
	0.44	0.53	0.39	0.45	0.37	0.39	0.40	0.39	0.41	0.47

Mittelwert	0.40	0.46	0.44	0.44	0.40	0.44	0.41	0.46	0.41	0.43
Stabw.	0.19	0.24	0.21	0.22	0.18	0.23	0.16	0.22	0.18	0.18
3 Wochen	0.59	0.62	0.64	0.43	0.52	0.48	0.76	0.72	0.77	0.50
	0.56	0.71	0.61	0.44	0.58	0.44	0.8	0.67	0.73	0.53
	0.58	0.66	0.63	0.45	0.58	0.56	0.71	0.64	0.70	0.53
	0.09	0.09	0.19	0.07	0.08	0.12	0.10	0.09	0.11	0.08
	0.10	0.10	0.16	0.08	0.09	0.10	0.10	0.05	0.10	0.09
	0.09	0.09	0.17	0.08	0.08	0.12	0.10	0.10	0.12	0.09
	0.69	0.53	0.56	0.39	0.43	0.39	0.53	0.52	0.51	0.55
	0.71	0.53	0.53	0.48	0.43	0.46	0.50	0.49	0.50	0.44
	0.70	0.62	0.51	0.46	0.32	0.42	0.49	0.54	0.56	0.49
	0.32	0.28	0.41	0.32	0.25	0.22	0.35	0.26	0.38	0.31
	0.32	0.25	0.37	0.33	0.25	0.25	0.35	0.29	0.39	0.30
	0.34	0.28	0.38	0.33	0.23	0.26	0.38	0.29	0.39	0.31
Mittelwert	0.42	0.40	0.43	0.32	0.32	0.32	0.43	0.39	0.44	0.35
Stabw.	0.24	0.24	0.18	0.16	0.19	0.16	0.25	0.24	0.24	0.18

Tabelle 44: Rohdaten der KCNJ8 qRT-PCR der CaCo-2 Zellen von Sucrose äs, Sucrose äm, NHDC äs, NHDC äm, Reb M äs, Reb M äm, Sucralose äs, Sucralose äm normalisiert und bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle nach dem ROUT Test.

<u>x-fache</u> <u>Änderung</u> <u>der Genex-</u> <u>pression</u>	Sucrose		NHDC		Reb M		Sucralose	
	äs	äm	äs	äm	äs	äm	äs	äm
1 Woche	1.01	1.22	1.08	0.95	0.96	0.99	0.99	1.4
	0.99	1.38	1.17	1	0.95	0.97	1.02	1.6
	1.04	1.30	1.04	1.02	1.01	1	0.95	1.49
	0.73	0.79	0.90	0.94	0.94	0.78	0.83	0.66
	0.75	0.85	0.82	0.89	0.92	0.75	0.94	0.70
	0.74	0.62	0.84	0.96	0.85	0.86	0.94	0.66
	1.14	1.09	1.14	0.97	0.93	1.02	0.84	1.15
	1.04	1.01	1.11	1.07	0.97	1.12	0.89	1.16
	1.09	1.21	1.09	1.09	0.99	1.28	0.89	1.19
	1.55	1.30	1.09	1.20	0.92	0.94	1.02	1.01
	1.54	1.35	1	1.07	0.90	0.97	1	1.02
	1.46	1.43	1.06	1.23	0.83	0.95	1	0.98
Mittelwert	1.09	1.13	1.03	1.03	0.93	0.97	0.94	1.09
Stabw.	0.29	0.26	0.11	0.10	0.05	0.14	0.07	0.31
2 Wochen	1.20	1.23	0.95	1.12	0.95	1.12	0.72	0.85
	1.10	1.31	0.90	1.12	0.95	1.22	0.72	0.83
	1.14	1.12	0.87	1.22	0.82	0.92	0.67	0.94
	1.47	1.05	0.89	1.45	0.77	1.58	1.74	0.88
	1.40	1.23	0.81	1.42	0.81	1.99	1.67	0.89
	1.39	1.32	0.76	1.59	0.82	1.58	1.72	0.91
	1.23	1.03	0.75	0.80	0.72	0.98	1.11	0.85
	1.16	1.10	0.73	0.81	0.75	0.97	0.96	0.89
	1.13	1.08	0.72	0.89	0.78	0.97	1.06	0.90
	0.88	0.91		0.68		0.76	0.82	
	0.88	1		0.71		0.72	0.81	
	0.89	1.02		0.76		0.74	0.79	
Mittelwert	1.15	1.12	0.82	1.05	0.82	1.13	1.07	0.88

Stabw.	0.20	0.13	0.08	0.32	0.08	0.32	0.08	0.40
3 Wochen	1.10	0.74	0.79	0.72	1.15	1.09	1.16	0.76
	1.05	0.76	0.87	0.66	1.20	1.01	1.11	0.79
	1.10	0.78	0.87	0.85	1.07	0.97	1.06	0.80
	1.99	0.72	0.89	1.23	1.05	0.96	1.15	0.87
	1.67	0.80	0.94	1.03	1.06	0.57	1.04	0.95
	1.83	0.81	0.85	1.26	1.04	1.05	1.24	1
	0.80	0.56	0.77	0.70	0.94	0.93	0.91	0.98
	0.76	0.68	0.77	0.82	0.90	0.88	0.88	0.79
	0.73	0.66	0.57	0.75	0.88	0.96	1	0.87
	1.27	1	0.91	0.82	1.31	0.95	1.39	1.13
	1.13	1.03	0.91	0.91	1.29	1.09	1.44	1.11
	1.17	1.01	0.84	0.97	1.40	1.07	1.46	1.17
Mittelwert	1.21	0.8	0.83	0.89	1.11	0.96	1.15	0.94
Stabw.	0.41	0.15	0.1	0.2	0.17	0.14	0.2	0.14

Tabelle 45: Rohdaten der KCNJ8 qRT-PCR der Cokultur von K = Medium; K_{DMSO} = K + 0.1% DMSO, Sucrose äs, Sucrose äm, NHDC äs, NHDC äm, Reb M äs, Reb M äm, Sucralose äs, Sucralose äm normalisiert und bezogen auf die undifferenzierte Kontrolle nach dem ROUT Test.

<u>x-fache</u> <u>Änderung</u> <u>der Genex-</u> <u>pression</u>	K	K _{DMSO}	Sucrose		NHDC		Reb M		Sucralose	
			äs	äm	äs	äm	äs	äm	äs	äm
1 Woche	0.16	0.16	0.19	0.17	0.18	0.21	0.22	0.16	0.19	0.22
	0.21	0.17	0.19	0.19	0.17	0.2	0.21	0.18	0.20	0.24
	0.20	0.16	0.22	0.21	0.17	0.24	0.22	0.19	0.19	0.27
	0.35	0.33	0.34	0.26	0.39	0.33	0.30	0.34	0.28	0.39
	0.40	0.34	0.33	0.27	0.42	0.33	0.32	0.35	0.28	0.39
	0.36	0.33	0.35	0.30	0.39	0.35	0.33	0.37	0.31	0.40
	0.26	0.28	0.29	0.18	0.25	0.27	0.27	0.18	0.27	0.32
	0.25	0.33	0.26	0.19	0.26	0.26	0.27	0.26	0.27	0.29
	0.26	0.30	0.26	0.23	0.28	0.28	0.26	0.28	0.30	0.30
	0.23	0.18	0.19	0.20	0.22	0.19	0.22	0.19	0.24	0.22
	0.22	0.21	0.18	0.19	0.21	0.23	0.20	0.21	0.26	0.22
	0.24	0.19	0.19	0.19	0.23	0.23	0.21	0.23	0.25	0.25
Mittelwert	0.26	0.25	0.25	0.21	0.26	0.26	0.25	0.24	0.25	0.29
Stabw.	0.07	0.08	0.06	0.04	0.09	0.05	0.05	0.07	0.04	0.07
2 Wochen	0.28	0.29	0.28	0.29	0.32	0.28	0.29	0.27	0.29	0.36
	0.27	0.26	0.27	0.30	0.30	0.33	0.30	0.26	0.30	0.33
	0.29	0.27	0.29	0.31	0.33	0.30	0.33	0.27	0.29	0.34
	0.31	0.27	0.31	0.21	0.35	0.36	0.17	0.31	0.30	0.46
	0.29	0.27	0.29	0.23	0.35	0.34	0.17	0.31	0.32	0.4
	0.32	0.23	0.32	0.23	0.36	0.34	0.15	0.33	0.28	0.43
	0.37	0.24	0.37	0.37	0.35	0.39	0.36	0.42	0.42	0.42
	0.32	0.23	0.32	0.43	0.30	0.47	0.36	0.4	0.43	0.45
	0.36	0.25	0.36	0.39	0.33	0.38	0.37	0.45	0.36	0.46
	0.19		0.19	0.28	0.25	0.27	0.18	0.25	0.25	0.33
	0.21		0.21	0.29	0.27	0.26	0.18	0.25	0.25	0.31
	0.22		0.22	0.32	0.29	0.25	0.19	0.24	0.24	0.29

Mittelwert	0.29	0.26	0.30	0.32	0.33	0.25	0.32	0.31	0.38	0.33
Stabw.	0.06	0.02	0.07	0.04	0.06	0.09	0.07	0.06	0.06	0.07
3 Wochen	0.38	0.30	0.32	0.30	0.32	0.47	0.32	0.29	0.33	0.31
	0.37	0.29	0.28	0.29	0.34	0.45	0.29	0.27	0.33	0.33
	0.35	0.29	0.33	0.34	0.31	0.48	0.29	0.30	0.33	0.36
	0.46	0.40	0.39	0.29	0.27	0.35	0.34	0.33	0.46	0.36
	0.45	0.43	0.40	0.28	0.29	0.36	0.31	0.33	0.41	0.39
	0.46	0.42	0.38	0.29	0.28	0.40	0.34	0.34	0.43	0.41
	0.45	0.45	0.54	0.50	0.43	0.45	0.52	0.42	0.57	0.42
	0.50	0.48	0.54	0.43	0.44	0.41	0.51	0.40	0.56	0.46
	0.49	0.45	0.57	0.44	0.48	0.42	0.51	0.44	0.61	0.46
			0.39	0.39	0.44	0.45	0.42	0.40	0.43	0.45
			0.37	0.40	0.42	0.39	0.38	0.41	0.41	0.42
			0.36	0.39	0.48	0.43	0.4	0.39	0.41	0.44
Mittelwert	0.44	0.39	0.41	0.36	0.37	0.42	0.39	0.36	0.44	0.40
Stabw.	0.05	0.08	0.09	0.07	0.08	0.04	0.09	0.06	0.10	0.05

Tabelle 46: Rohdaten der KCNJ8 qRT-PCR der Cokultur von Sucrose äs, Sucrose äm, NHDC äs, NHDC äm, Reb M äs, Reb M äm, Sucralose äs, Sucralose äm normalisiert und bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle nach dem ROUT Test.

<u>x-fache</u>	Sucrose		NHDC		Reb M		Sucralose	
<u>Änderung</u>	äs	äm	äs	äm	äs	äm	äs	äm
<u>der Genex- pression</u>								
1 Woche	0.98	0.89	1.08	1.30	1.33	1	1.17	1.35
	0.98	0.99	1.07	1.24	1.31	1.12	1.20	1.49
	1.18	1.09	1.05	1.46	1.38	1.17	1.17	1.63
	0.92	0.70	1.17	0.98	0.89	1.02	0.84	1.17
	0.88	0.73	1.27	0.98	0.96	1.04	0.84	1.16
	0.93	0.80	1.16	1.04	0.99	1.10	0.92	1.20
	1.14	0.72	0.81	0.87	0.88	0.58	0.89	1.05
	1.01	0.75	0.85	0.85	0.89	0.85	0.88	0.96
	1.01	0.88	0.91	0.91	0.86	0.93	0.99	1
	0.83	0.87	1.15	0.97	1.13	0.98	1.25	1.14
	0.76	0.80	1.08	1.19	1.03	1.07	1.36	1.17
	0.82	0.82	1.20	1.20	1.08	1.19	1.31	1.30
Mittelwert	0.95	0.84	1.07	1.08	1.06	1	1.07	1.22
Stabw.	0.12	0.12	0.14	0.19	0.19	0.17	0.19	0.20
2 Wochen	1.04	1.13	1.04	1.06	1.01	1.06	1.33	0.98
	1.07	1.06	1.21	1.09	0.97	1.11	1.22	1.11
	1.11	1.18	1.11	1.19	1.0	1.05	1.26	1.18
	0.67	1.13	1.40	0.64	1.19	1.14	1.80	1.42
	0.74	1.12	1.30	0.66	1.19	1.24	1.56	1.42
	0.74	1.17	1.32	0.58	1.29	1.07	1.66	1.55
	1.06	0.98	0.88	0.81	0.95	0.94	0.95	0.88
	1.22	0.86	1.05	0.81	0.9	0.97	1.01	0.9
	1.11	0.94	0.87	0.84	1.02	0.81	1.04	0.97
	1.39	1.20	1.12	0.77	1.07	1.06	1.37	1
	1.43	1.33	1.11	0.77	1.04	1.06	1.29	1.06
	1.54	1.41	1.07	0.82	1.02	0.99	1.24	1.03
Mittelwert	1.09	1.13	1.12	0.84	1.05	1.04	1.31	1.12

Stabw.	0.28	0.16	0.16	0.19	0.11	0.11	0.26	0.22
3 Wochen	0.88	0.80	1.11	1.63	1.09	1	1.12	1.05
	0.77	0.80	1.16	1.56	1.01	0.92	1.12	1.14
	0.89	0.93	1.05	1.63	1	1.03	1.13	1.22
	0.86	0.63	0.64	0.83	0.81	0.78	1.12	0.88
	0.87	0.61	0.69	0.86	0.74	0.79	0.99	0.95
	0.83	0.63	0.67	0.96	0.82	0.82	1.04	1
	1.13	1.04	0.94	0.97	1.12	0.91	1.23	0.92
	1.13	0.9	0.94	0.89	1.10	0.85	1.21	1
	1.20	0.92	1.04	0.90	1.10	0.95	1.31	0.99
	0.33	0.34	0.42	0.43	0.40	0.39		0.43
	0.32	0.34	0.40	0.38	0.37	0.39		0.40
	0.31	0.34	0.46	0.41	0.39	0.38		0.43
Mittelwert	0.79	0.69	0.79	0.95	0.83	0.77	0.96	0.87
Stabw.	0.31	0.25	0.28	0.45	0.30	0.24	0.35	0.29