



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Untersuchung des Einflusses von Fructose auf die
LTA-vermittelte Stimulation von humanen Monozyten im
Co-Kulturmodell“

verfasst von / submitted by
Mert Meydanci, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Master of Science (MSc)

Wien, 2022 / Vienna, 2022

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

UA 066 838

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

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Dr. Ina Bergheim

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Ina Bergheim für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Betreuung meiner Masterarbeit bedanken. Vielen Dank für die jahrelange wissenschaftliche Unterstützung, die investierte Zeit und herzliche Hilfestellung bei allen möglichen Schwierigkeiten.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Anja Baumann, die mich bei jeglichen Fragen und Problemen intensiv unterstützt hat. Vielen Dank für die unendliche Hilfsbereitschaft und das Dasein. Außerdem möchte ich mich auch ganz besonders bei Raphaela Staltner für ihre unglaubliche Energie und die großartige Zusammenarbeit im Labor bedanken. Es war mir ein Vergnügen, mit Ihnen beiden zusammengearbeitet zu haben!

Ich bedanke mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die superschöne Zeit und Teamarbeit im Labor! Ein besonders großes Dankeschön geht an Dr. Annette Brandt für die fachliche Unterstützung bei schwierigen Zeiten.

Bei meinen Studienkolleg:innen Verena, Yagmur, Johanna, Annalaura und Akos möchte ich mich für den intensiven Austausch und die gegenseitige Unterstützung bedanken.

Auch bei meiner Familie und meinen Freund:innen bedanke ich mich für die stetige und herzliche Unterstützung. Ein großer Dank gilt Anna und Tugba, die mich immer ermuntert und motiviert haben.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1. Fructose in der Ernährung des Menschen	1
1.2. Bakterielle Infektionen	5
1.2.1. Gram positive Bakterien und ihre immunmodulierende Wirkung: Die LTA und TLR2-Signalkaskade.....	6
1.3. Fructose als Modulator von Infektionskrankheiten	9
1.4. Fragestellung und Zielsetzung	10
2. Materialien.....	11
2.1. Zellkultur	11
2.2. Isolation von Monozyten aus Buffy-Coat	12
2.3. Stimulation und Behandlung von CaCo-2 Zellen und Monozyten	13
2.4. Untersuchungen in Monozyten	13
2.5. Fructose Messung.....	16
2.6. Allgemeine Materialien	17
3. Methoden.....	19
3.1. Kultivierung von CaCo-2 Zellen und Aussaat im Transwell-System	19
3.2. Isolation von Monozyten aus Buffy-Coat	21
3.3. Stimulation und Behandlung von CaCo-2 Zellen und Monozyten im Co-Kulturmodell	22
3.4. Fructose Messung.....	24
3.5. Bestimmung der Expression von Markern des Fructose- bzw. ATP-Metabolismus und der Entzündung in isolierten Monozyten	25
3.6. Bestimmung biochemischer Parameter im Zellkulturüberstand isolierter Monozyten	29
3.7. Statistische Auswertung	30
4. Ergebnisse	31
4.1. Vorversuch zur Untersuchung des Fructosetransports durch ausdifferenzierter CaCo-2 Zellen.....	31
4.2. Einfluss von Fructose auf die mRNA-Expression von Parametern des Fructosemetabolismus in Monozyten in Co-Kulturmodell.....	32

4.3. Einfluss von Fructose auf die ATP-Konzentration im apikalen CaCo-2-Medium und basolateralen Monozyten-Medium.....	33
4.4. Einfluss von Fructose auf die mRNA-Expression von Parametern des ATP-Metabolismus in Monozyten in Co-Kulturmodell	34
4.5. Einfluss von Fructose auf die mRNA-Expression von TLR2 in Monozyten in Co-Kulturmodell	36
4.6. Einfluss von Fructose auf die LTA vermittelte Stimulation von Monozyten in Co-Kulturmodell: mRNA-Expression und Freisetzung von TNF- α , IL-1 β	36
5. Diskussion	39
5.1. Das Co-Kulturmodell: Fructose wird durch die CaCo-2 Monolayer transportiert.	39
5.2. Fructose moduliert die mRNA-Expression von GLUT5 und von Markern des ATP-Metabolismus, sowie der TLR2 Expression in humanen Monozyten in Co-Kulturmodell	40
5.3. Fructose und LTA wirken additiv und führen zu einer erhöhten mRNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen in Monozyten in Co-Kulturmodell	42
Fazit.....	44
Zusammenfassung.....	45
Summary.....	46
Literaturverzeichnis.....	47
Selbstständigkeitserklärung	54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primersequenzen für RT-qPCR.....	15
Tabelle 2: Zusammensetzung des CaCo-2-Mediums	19
Tabelle 3: Zusammensetzung des RPMI-1640 Mediums	22
Tabelle 4: Herstellung der Standardreihe für die Fructose Messung	25
Tabelle 5: Mastermix für die cDNA Synthese	26
Tabelle 6: cDNA-Synthese im Thermocycler	27
Tabelle 7: Mastermix für die RT-qPCR.....	27
Tabelle 8: Das Programm im Thermocycler für RT-qPCR.....	28

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Absorption von Fructose in den Enterozyten	2
Abbildung 2: Metabolismus von Fructose	4
Abbildung 3: Wandaufbau der Gram positiven Bakterien	6
Abbildung 4: Die TLR2-Signalkaskade.....	7
Abbildung 5: (A) Ein Foto der 12-Wellplatte und der Inserts sowie (B) ein schematisches Bild der Kultivierung der CaCo-2 Zellen in Transwell Inserts	20
Abbildung 6: Schematische Zusammenfassung des Ablaufs der Kultivierung der CaCo-2 Zellen nach dem Splitting & der Aussaat	21
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Versuchsbedingungen im Co-Kulturmodell	24
Abbildung 8: Einfluss der apikalen Exposition von ausdifferenzierten CaCo-2 Zellen gegenüber 0-20 mM Fructose für 2h auf die Fructose Konzentration in basolateralen Kompartiment des Transwell-Systems	31
Abbildung 9: Einfluss der apikalen Gabe von 0-10 mM Fructose auf die Expression von GLUT5 in Monozyten in basolateralen Kompartiment in Co-Kulturmodell.....	32
Abbildung 10: Einfluss der apikalen Gabe von 0-10 mM Fructose auf die ATP-Konzentration in apikalen CaCo-2-Medium in Co-Kulturmodell.....	33
Abbildung 11: Einfluss der apikalen Gabe von 0-10 mM Fructose auf die ATP-Konzentration in basolateralen Monozyten-Medium in Co-Kulturmodell.	34
Abbildung 12: Einfluss der apikalen Gabe von 0-10 mM Fructose auf die Expression von P2RX7 in Monozyten in basolateralen Kompartiment in Co-Kulturmodell.....	35
Abbildung 13: Einfluss der apikalen Gabe von 0-10 mM Fructose auf die Expression von CD39 in Monozyten in basolateralen Kompartiment in Co-Kulturmodell.....	35
Abbildung 14: Einfluss der apikalen Gabe von 0-10 mM Fructose auf die Expression von TLR2 in Monozyten in basolateralen Kompartiment in Co-Kulturmodell.....	36
Abbildung 15: Einfluss der apikalen Gabe von 0-10 mM Fructose auf die LTA-vermittelte Stimulation (10 µg/mL) von Monozyten in Co-Kulturmodell auf die Expression von TNF-α in Monozyten.....	37
Abbildung 16: Einfluss der apikalen Gabe von 0-10 mM Fructose auf die LTA-vermittelte Stimulation (10 µg/mL) von Monozyten in Co-Kulturmodell auf die Expression von IL-1β in Monozyten und auf die IL-1β Proteinkonzentration im basolateralen Monozyten-Medium.	38

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
CaCo-2	Cancer coli 2
CD14	Cluster of differentiation 14
CD39	Cluster of differentiation 39
cDNA	Komplementäre DNA
CWGs	Zellwand-Glykopolymere
DCs	Dendritic cells
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
dNTPs	Desoxynukleotiden
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
ENTPDase	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase
FBS	Fetale bovine serum
F1P	Fructose-1-Phosphat
GLUT2	Glucostetransporter 2
GLUT5	Glucosetransporter 5
G3P	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
HFCS	High fructose corn syrup
HRP	Horseradish Peroxidase
IL-1 β	Interleukin 1 β
LBP	LPS-bindende Protein
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Lipoteichonsäure
MEM NEAA	Non-essential amino acid solution
MD2	Myeloid differentiation factor 2
mRNA	Messenger RNA

MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
NTC	Non template control
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
Pen/Strep	Penicilin/streptomycin
PPRs	Pattern-recognition receptors
P2RX7	Purinoreceptor 7
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Real time quantitative polymerase chainreaction
SEM	Standardfehler
SGLTs	Sodium-dependent-glucose-cotransporters
TA	Teichonsäure
TLRs	Toll-like receptors
TLR2	Toll-like receptor 2
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
WHO	World Health Organisation

1. Einleitung

1.1. Fructose in der Ernährung des Menschen

Quellen

Fructose ist ein einfaches Monosaccharid, das in pflanzlichen Quellen, wie Früchten und Gemüse, sowie in Honig vorkommt [1, 2]. Im Handel erhältliche Lebensmittel wie Soft Drinks, Ketchup aber auch Brot, können Fructose auch in Form von „high fructose corn syrup“ (HFCS), bestehend aus 55-95% Fructose und der entsprechender Menge Glucose, enthalten [1]. Außerdem ist Fructose auch in Saccharose enthalten, ein Disaccharid, welches zu gleichen Teilen aus Fructose und Glucose besteht, die über eine α -1,2-glykosidische Bindung verknüpft sind [2,3]. Insbesondere in den USA wird HFCS im großen Umfang verwendet, wohingegen in Europa in verarbeiteten Lebensmitteln überwiegend Saccharose verwendet wird [3].

Konsum

Fructose ist neben Glukose und Saccharose, der am häufigsten konsumierten Zucker [3]. Im Laufe der Zeit hat die Aufnahme von Fructose in den USA immer mehr zugenommen [4, 5]. Allerdings existiert eine limitierte Datenlage für den Konsum von Fructose in Europa [6]. Die World Health Organisation (WHO) empfiehlt sowohl für Kinder als auch für Erwachsene die Aufnahme von freiem Zucker auf ≤ 10 % der täglichen Gesamtenergiezufuhr zu reduzieren („strong recommendation“) [7]. Jedoch bezieht sich die Empfehlung nicht auf den Zucker in frischem Obst und Gemüse und den natürlich vorhandenen Zucker in der Milch, da es derzeit keine evidenzbasierten schädlichen Auswirkungen zu dem Verzehr dieser Zucker gibt [7, 8]. Die weltweite Aufnahme von freien Zuckern variiert je nach Alter, Umgebung und Land. So liegt die Aufnahme bei Erwachsenen in Ungarn und Norwegen bei etwa 7-8 % [9] der Gesamtenergieaufnahme, wohingegen für Ländern wie Spanien und dem Vereinigten Königreich bei ca. 16-17 % [9]. Studien weisen darauf hin, dass die Aufnahme von Zucker bei Kindern wesentlich höher ist. So weisen Untersuchungen darauf, dass in den Ländern Dänemark, Slowenien und Schweden der Zuckerkonsum von Kindern bei etwa 12 % und in Portugal bei fast 25 % liegt [9].

Aufnahme und Stoffwechsel von Fructose

Aufnahme

Durch die Nahrung wird Fructose entweder als freie Fructose, Saccharose oder Fruktan aufgenommen [6]. Die Aufnahme freier Fructose in die Enterozyten erfolgt entlang ihres Konzentrationsgradientens durch carriervermittelte passive Diffusion über den Glucosetransporter 5 (GLUT5), der sich an der apikalen Seite der Enterozyten befindet [6,10]. GLUT5 wird als spezifischer Fructose-Transporter diskutiert [11, 12]. Außerdem wurde auch gezeigt, dass GLUT5 unabhängig von der Natrium Absorption bzw. von sodium-dependent-glucose-cotransporters (SGLTs) ist und im Gegensatz zu SGLT1 keine Adenosintriphosphat-(ATP)-Hydrolyse benötigt [10, 14]. Ähnlich wie die Glucose wird die Fructose durch erleichterte Diffusion über den Glucosetransporter 2 (GLUT2), der sich in der basolateralen Membran der Enterozyten befindet, in die systemische Zirkulation exportiert [13] (siehe Abbildung 1). Die Mechanismen der Aufnahme sowie des Transports von Fructose sind nicht abschließend geklärt.

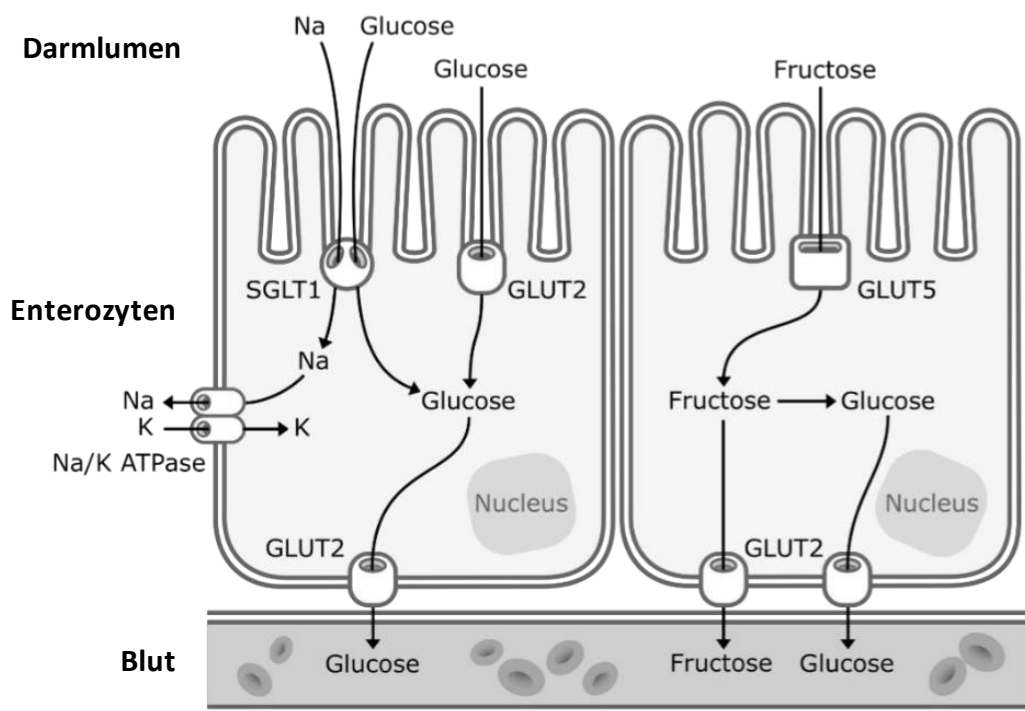


Abbildung 1: Absorption von Fructose in den Enterozyten (modifiziert nach [13]). Fructose wird über GLUT5 in die Enterozyten aufgenommen und über GLUT2 in die systemische Zirkulation exportiert. Die Mechanismen der Aufnahme und des Transports von Fructose sind nicht abschließend geklärt. GLUT2 (Glucosetransporter 2), GLUT5 (Glucosetransporter 5), SGLT1 (sodium dependent glucose transporter 1).

Stoffwechsel

Anhand neuer Studien wurde gezeigt, dass die Fructose nicht nur in der Leber und dem Darm, sondern auch systemisch metabolisiert wird und zu physiologischen Prozessen beitragen kann [15]. Eine Studie von Jang et al zeigte, dass die Enterozyten im Mausmodell niedrigere Dosen von Fructose (0,5 g Fructose/ kg Körpergewicht (KG), entsprechen ~0,5 % der täglichen Kalorienzufuhr oder 3 g Fructose beim Menschen) fast vollständig (~90%) über Fructokinase abbauen und in Glucose und organischen Säuren umwandeln können [16]. Des Weiteren wurde auch gezeigt, dass hohe Fructosedosen (> 1g Fructose/ kg KG) die intestinale Kapazität überfordern und es zu einem „Spillover“ von Fructose in die portale Zirkulation bzw. in die Leber (~30%) kommt [16]. Trotzdem ist die Rolle der Enterozyten bei der Bestimmung der Stoffwechselprozesse von Fructose nicht eindeutig geklärt [13]. Außerdem wurde die Expression von GLUT5 in humanen Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten nachgewiesen, dennoch ist die Funktion der erhöhten GLUT5 Expression in diesen Zellen unklar [17]. Besonders die Rolle von den Blutzellen bzw. den Immunzellen bei dem Fructose Stoffwechsel, sowie die immunologischen und genetischen Einflüsse von Fructose, vor allem auf humane Immunzellen sind jedoch bisher nicht weitgehend erforscht. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist der Stoffwechsel von Fructose nur in der Leber genauer beschrieben, aber die intrazellulären Prozesse von Fructose in den verschiedenen Geweben und die Frage, ob sie regulatorische Signale ausübt, bedarf weiterer Forschung.

In folgenden wird der Stoffwechsel von Fructose kurz zusammengefasst (siehe Abbildung 2 für Überblick). Fructose wird zuerst durch die Fructokinase, Adenosintriphosphat (ATP)-abhängig, in Fructose-1-Phosphat (F1P) umgewandelt [18]. F1P hat die Eigenschaft, den ersten begrenzenden Schritt der Glykolyse umzugehen [19], ohne durch Insulin reguliert oder durch die ATP-Produktion gehemmt zu werden [13], d.h. die Fructokinase ist unabhängig von Insulin [5] und die Fructose wird im Gegensatz zu Glucose insulinunabhängig verstoffwechselt [20]. Im Weiteren wird die F1P durch die Aldolase B zu Glycerinaldehyd und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) abgebaut. Die Metabolite von F1P können zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat (G3P) oder Glycerin-3-Phosphat umgewandelt werden [5, 20]. Anschließend kann G3P in Pyruvat umgewandelt werden, was zum einen über Acetyl-CoA zu Citrat umgewandelt wird und zum anderem in Laktat umgewandelt und freigesetzt werden

kann [10]. Glycerin-3-Phosphat kann für die Bildung von Acyl-CoA und für die Lipidsynthese genutzt werden [5]. Auch das gebildete Acetyl-CoA über Pyruvat aus G3P kann ohne die Gewährleistung des Insulins zur Lipidsynthese beitragen [20]. Die Umwandlung von Fructose in F1P erfordert ATP als Co-Substrat [21, 22]. Studien weisen darauf hin, dass bei einer erhöhten Fructose Zufuhr die ATP-Depletion zu einer Stimulation der Adenosinmonophosphat (AMP)-Deaminase und folglich zu einer erhöhten Produktion von Harnsäure führen kann [21, 22].

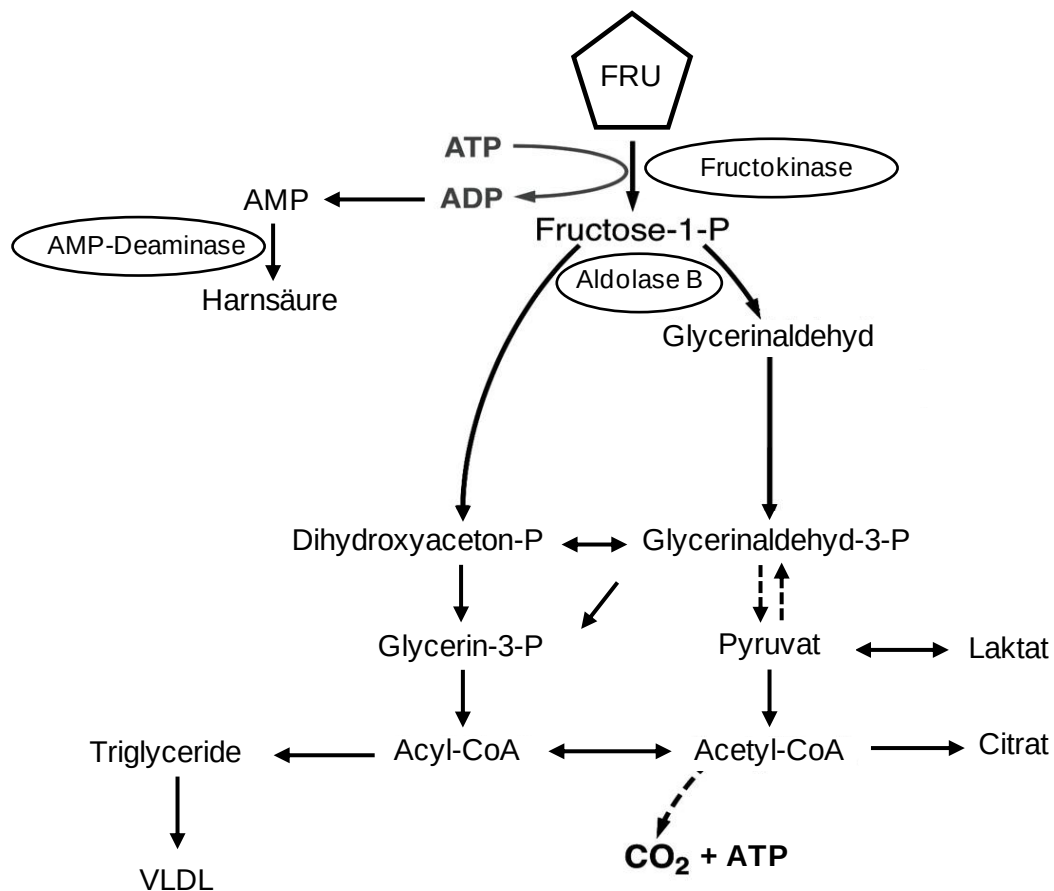


Abbildung 2: Metabolismus von Fructose* (modifiziert nach [10]). Fructose (FRU) wird durch die Fructokinase und Aldolase B verstoffwechselt. Entstehende Metabolite der Fructose wie G3P oder DHAP können über Pyruvat weiter für die Bildung von Citrat, Laktat, ATP und very low density lipoprotein (VLDL) genutzt werden. ADP (Adenosindiphosphat). *Die Abbildung wird auf der S.3-4 erklärt.

1.2. Bakterielle Infektionen

Weltweit sind bakteriellen Infektionen häufig und können zu lebensgefährlichen Erkrankungen führen [23]. Antibiotika sind immer noch die erste Wahl bei der Behandlung der meisten bakteriellen Erkrankungen [23], jedoch haben viele Erreger mit der Zeit Resistenz gegen Antibiotika und verschiedene Therapeutika entwickelt, was eine Herausforderung in der Therapie darstellt [24]. Laut dem Centers for Disease Control and Prevention (CDC) treten in den USA jedes Jahr mehr als 2,8 Millionen antibiotikaresistente Infektionen und 35.000 Todesfälle auf der Folge auf [25]. Laut der Schätzungen von Murray et al. wurden im Jahr 2019 weltweit 4,95 Millionen Todesfälle mit bakteriellen antibiotikaresistenten Infektionen assoziiert [26]. Andere Faktoren wie Übergewicht und metabolische Krankheiten haben auch einen Einfluss auf den Schweregrad des Verlaufs sowie den Outcome der bakteriellen Infektionen [27].

In Entwicklungsländern betreffen die nosokomialen Infektionen bzw. die Krankenhausinfektionen durch Bakterien weltweit eine große Zahl an Patienten, wodurch die Mortalität und die finanziellen Verluste erheblich ansteigen [28]. Laut der WHO schwankt weltweit die Prävalenz von Krankenhausinfektionen zwischen 5,7 % und 19,1 % und die gepoolte Prävalenz liegt bei 10,1 % [29]. Bakterien sind die häufigsten Krankheitserreger, die für nosokomiale Infektionen verantwortlich sind. Einige gehören zur natürlichen Darmflora und verursachen nur dann eine Infektion, wenn das Immunsystem geschwächt und die Infektanfälligkeit des Patienten erhöht wird [28]. Andere gehören zu den antibiotikaresistenten Gram positiven Bakterien wie Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) und *Streptococcus pneumoniae* (Pneumococcus) [28-30]. Diese Mikroorganismen können stunden- bis monatenlang überleben, stellen ein globales Resistenzproblem dar und belasten die globale Gesundheit erheblich [30, 31].

1.2.1. Gram positive Bakterien und ihre immunmodulierende Wirkung: Die LTA und TLR2-Signalkaskade

Aufgrund ihres charakteristischen Zellwandaufbaus kann man die Bakterien in zwei verschiedenen Gruppen unterteilen, nämlich in Gram negative und Gram positive Bakterien [32]. Gram positiven Bakterien haben eine Zytoplasmamembran aus einer zweilagigen Lipidschicht mit eingelagerten Proteinen (siehe Abbildung 3 für den Wandaufbau). Außerdem haben sie eine monoderme Zellwand, die eine dicke Murein- bzw. Peptidoglykanschicht aufweist [33]. Daraus ragen kovalent verankerten Zellwand-Glykopolymere (CWGs), wie z.B. die Teichon- (TA) oder Lipoteichonsäuren (LTA), heraus [34]. Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass LTA von Gram positiven Bakterien Interaktionen mit Wirtsrezeptoren vermitteln und eine wesentliche Rolle bei Infektionen spielen, die durch wichtige menschliche Krankheitserreger wie *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* und *Mycobacterium tuberculosis* verursacht werden [35].

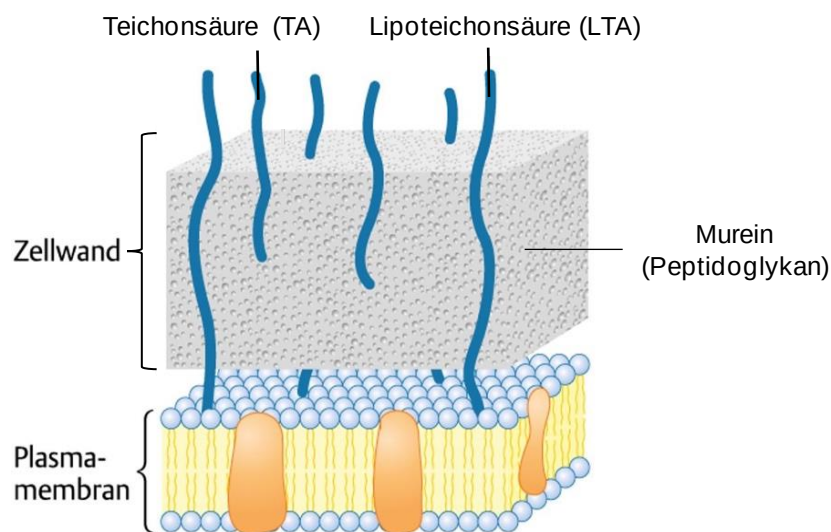


Abbildung 3: Wandaufbau der Gram positiven Bakterien (modifiziert nach [33]). Insgesamt können die Zellwand-Glykopolymere (CWGs) mehr als 60 % der Masse der Gram positiven Zellwand ausmachen [36]. Während die TA an das Peptidoglykan gebunden ist, ist die LTA in den Membranlipiden verankert [37]. Anhand ihrer Oberflächenstrukturen können die Gram positiven Bakterien eine immunmodulierende Wirkung haben [35].

Die immunmodulierende Wirkung der Bakterien wird durch die Erkennung von pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) über die pattern-recognition receptors (PPRs) wie die toll-like receptors (TLRs) und ihren Signalkaskaden vermittelt [35]. Zudem spielt besonders der TLR2 für die Gram positiven Bakterien eine wichtige Rolle [38]. Der TLR2 wird in verschiedenen humanen Immunzellen wie Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen (DC) exprimiert [39].

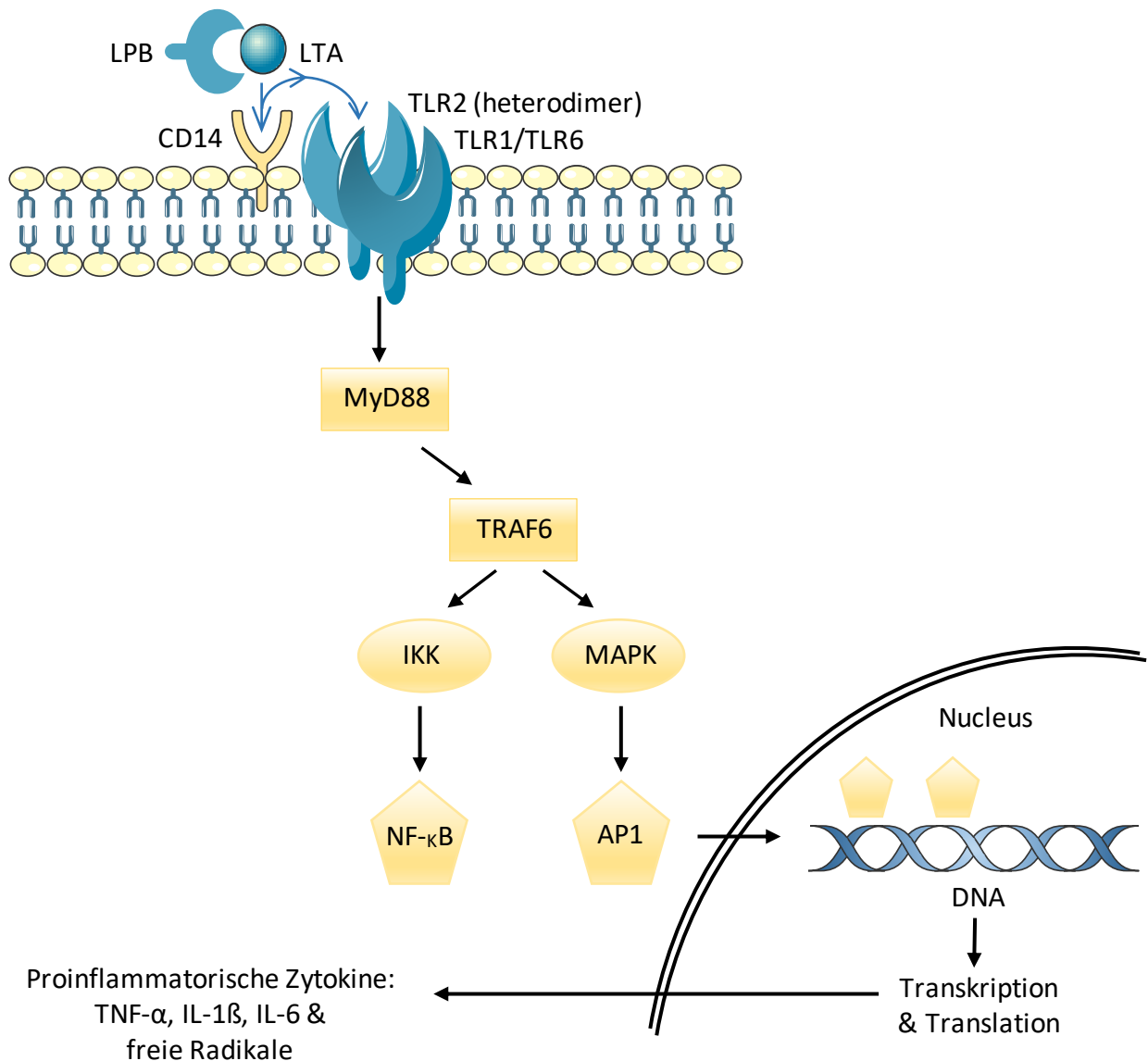


Abbildung 4: Die TLR2-Signalkaskade* (zusammengestellt nach [35, 38-45] mit Microsoft Word & teilweise mit Smart Servier Medical Art (lizenziert unter „Creative Commons Attribution 3.0 unported license“)). LTA aktiviert über TLR2 den myeloid differentiation factor 88 (MyD88) Signalweg, was zu einer erhöhten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen führt. Im folgenden Textabschnitt wird die Abbildung 4 im Detail erklärt. * Die Abkürzungen sind im folgenden Textabschnitt erklärt.

Unter pathogenen Bedingungen interagiert ein lösliches Plasmaprotein, das Lipopolysaccharide (LPS)-bindende Protein (LBP), mit LTA und bindet sich daran. Der gesamte LTA-LBP-Komplex bindet zusammen mit dem Co-Rezeptor cluster of differentiation 14 (CD14) an den TLR2 [40] und aktiviert dadurch den myeloid differentiation factor 88 (MyD88)-Signalweg [38] (siehe Abbildung 4 für Überblick). Im Gegensatz zur LPS-TLR4-Signalkaskade ist myeloid differentiation factor 2 (MD2) für die Aktivierung der LTA-TLR2-Signalkaskade nicht erforderlich [41]. TLR2 bildet ein Heterodimer mit TLR1 oder TLR6 zur Erkennung von LTA [38]. LTA bindet an LBP und wird auf CD14 übertragen, was anschließend zur Aktivierung der TLR2-LTA-Signalkaskade und dadurch die Aktivierung von MyD88 führt [42, 43].

Durch die Signaltransduktion werden bei dem MyD88 Signalweg verschiedene Adapterproteine rekrutiert (In der Abbildung nicht gezeigt). MyD88 aktiviert TNF receptor associated factor (TRAF6) und somit kann sowohl über die I κ B Kinase (IKK) den nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) als auch über die mitogen-activated protein kinase (MAPK) den activator protein-1 (AP1) induzieren [38]. Infolgedessen werden die Transkription bzw. die Translation von proinflammatorischen Mediatoren wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin (IL)-1 β , IL-6 und andere Zytokine in verschiedenen Immunzellen wie Monozyten und Makrophagen reguliert [44, 45].

1.3. Fructose als Modulator von Infektionskrankheiten

Genaue Analyse, in welcher 13 kontrollierten Interventionsstudien untersucht wurden, analysierte den Einfluss von Fructose-, HFCS-, Saccharose- und Glucosekonsum auf verschiedene inflammatorischen Biomarker wie hochsensitives CRP (hsCRP), IL-6, TNF- α usw. [46]. Die Auswirkungen von Nahrungszucker auf hsCRP wurde für zwei Untergruppen je nach Art der Zuckerintervention und Kontrolle, Fructose vs. Glucose und HFCS vs. Saccharose, analysiert. Aufgrund der Heterogenität und geringer Stichprobenanzahl der analysierten Interventionsstudien konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen Gruppen festgestellt werden. Nichtsdestotrotz konnte vor kurzem gezeigt werden, dass Fructose zur erhöhten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-6 in humanen DCs *in vitro* im Vergleich zur Glukose führt [47]. Außerdem wurde auch gezeigt, dass Fructose die Expression von IL-6 und TNF- α in Monozyten *in vitro* induziert [48].

In der Studie von Jones et al. wurde charakterisiert, wie humane Monozyten und Makrophagen aus Mäusen unter LPS-induzierter Entzündung, metabolisch und funktionell auf Fructose reagieren [49]. Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass die Aufnahme von Fructose Stoffwechselwege zellulär zur Glutaminolyse „umprogrammiert“ und mit einem oxidativen Stoffwechselweg einhergeht, ob dass die Fructose direkt oder indirekt macht, ist nicht jetzt klar. Aktivierte Monozyten waren in der Lage, Fructose über GLUT5 in die Zelle zu transportieren und verstoffwechseln [49]. Außerdem produzierten mit Fructose behandelten Monozyten im Vergleich zur Behandlung mit Glukose signifikant erhöhte Mengen an Zytokinen, wie IL-1 β , IL-8, IL-10 und TNF- α [49]. Jedoch sind die Mechanismen noch nicht weitgehend geklärt.

1.4. Fragestellung und Zielsetzung

Studien bei Menschen und in Tiermodell weisen darauf hin, dass der Fructosekonsum im Zusammenhang mit vielen Erkrankungen wie z.B. non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [3], type 2 diabetes (T2DM) [50-52], Adipositas [1, 52] und chronic kidney disease (CKD) [53] von Bedeutung sein kann. Jedoch ist die Rolle der Fructose in der Pathogenese bakterieller Infektionen und Sepsis noch unklar. Nach derzeitigem Kenntnisstand wird davon ausgegangen, dass erhöhter Fructosekonsum die Immunantwort in humanen Immunzellen moduliert [47-49].

Ausgehend von diesem Hintergrund ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluss von Fructose auf die LTA-vermittelte Stimulation von humanen Monozyten, sowie möglich beteiligte Mechanismen *in vitro* zu untersuchen.

Folgende Fragen sollen hierbei beantwortet werden:

1. Wie beeinflusst Fructose die mRNA-Expression von Parametern des Fructose- und des ATP-Metabolismus, sowie die Expression von TLR2 in humanen Monozyten in einem Co-Kulturmodell? (Cancer coli-2 (CaCo-2) Zellen in Co-Kultur mit Monozyten)
2. Beeinflusst Fructose die LTA-vermittelte Stimulation von humanen Monozyten im Co-Kulturmodell? Kommt es durch Fructose zu einer Modulation der mRNA-Expression und Freisetzung von den proinflammatorischen Zytokine TNF- α & IL-1 β ?

2. Materialien

2.1. Zellkultur

Chemikalien

DMEM (w: 4,5 g/L Glucose, L-Glutamine,
Sodium pyruvate, 3.7 g/L NaHCO₃)

DPBS

Ethanol (70%)

FBS Good

Fisherbrand-stabil

(Stabilisierungskonzentrat für

Thermostate und Warmwasserbäder

MEM NEAA Non-Essential Amino Acid

Solution w/o: L-Glutamine

Pen/Strep

Trypan Blau 0,5%

Trypsin/EDTA (10x) (0,5%/0,2% in PBS)

Wasserbadschutz Aqua Care

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

PAN Biotech, Aidenbach Deutschland

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland

Fisher Scientific GmbH, Schwerte,
Deutschland

PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland

PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland

Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA

PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Geräte und Verbrauchsmaterialien

CO₂- Inkubator MCO-170AIC

Handzähler

Hämozytometer (Zählkammer)

Mikroskop

Sicherheitswerkbank (Mars Scanlaf)

TC-Platte (12-Well)

Panasonic Healthcare Co, Ltd., Gunma,
Japan

Tamaco Industrial Co, Ltd., Taichung,
Taiwan

VWR International GmbH, Wien,
Österreich

Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena,
Deutschland

LaboGene Aps, Lillerød, Dänemark

Sarstedt AG & Co, Nümbrecht,
Deutschland

TC-Inserts (Zellkultureinsätze) 12-Well

Sarstedt AG & Co, Nümbrecht,
Deutschland

Vakuumpumpe SafeVac

DLAB Scientific Inc., Beijing, China

Wasserbad

Kötterman GmbH, Uetze, Deutschland

Zellkulturflaschen (75 cm²)

Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Deutschland

2.2. Isolation von Monozyten aus Buffy-Coat

Chemikalien

Buffy-Coat

Rotes Kreuz, Blutspendezentrale, Wien,
Österreich

DPBS

Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA

FBS Good

PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland

Monocyte Spin Medium (pluriSpin)

Pluriselect Life Science UG
(haftungsbeschränkt) & Co. KG, Leipzig,
Deutschland

Pen/Strep

PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland

RPMI-1640 Medium, R8758 500 ml

Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA

Trypan Blau 0,5%

Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA

Geräte und Verbrauchsmaterialien

Handzähler

Tamaco Industrial Co, Ltd., Taichung,
Taiwan

Hämozytometer (Zählkammer)

VWR International GmbH, Wien,
Österreich

Mikroskop

Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena,
Deutschland

pluriMate II-15 ml Falcons

Pluriselect Life Science UG
(haftungsbeschränkt) & Co. KG, Leipzig,

Sicherheitswerkbank Heraeus Typ HS 12/2

Deutschland Heraeus Instruments, Hanau,
Deutschland

2.3. Stimulation und Behandlung von CaCo-2 Zellen und Monozyten

Chemikalien

D(-)-Fructose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DPBS	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA
FBS Good	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Lipoteichonsäure (LTA)	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA
peqGOLD Trifast™ (Trizol)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pen/Strep	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
RPMI-1640 Medium, R8758 500 ml	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA

Geräte und Verbrauchsmaterialien

CO ₂ - Inkubator MCO-170AIC	Panasonic Healthcare Co, Ltd., Gunma, Japan
Einmalspritze Omnix Luer Lock Solo 20 ml	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Präzisionswaage MC 410 S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Sicherheitswerkbank Heraeus Typ HS 12/2	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Sotilabo Spritzenfilter, PVDF, steril	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TC-Platte (12-Well)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
TC-Inserts (Einsätze) 12-Well	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Wasserbad	LAUDA-GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland

2.4. Untersuchungen in Monozyten

RNA-Extraktion

Chemikalien

Chloroform (CHCl ₃) ≥ 99,5%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
---	--

Ethanol (C₂H₆O) ≥ 99,8%

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Isopropanol (C₃H₈O) ≥ 99,5%

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

ROTIPURAN® Wasser

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Geräte und Verbrauchsmaterialien

PocketBloc Thermomixer

Biozym Scientific GmbH, Hessisch
Oldendorf, Deutschland

cDNA-Synthese

Chemikalien

AMV Reverse Transcriptase (15U)

Promega Cooperation, Madison, USA

dNTP Mix (10mM)

Promega Cooperation, Madison, USA

Magnesiumchlorid (MgCl₂) (25 mM)

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Random Primer

Promega Cooperation, Madison, USA

Reverse Transkriptase Puffer

Promega Cooperation, Madison, USA

RNAsin

Promega Cooperation, Madison, USA

ROTIPURAN® Wasser

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

RQ1 DNase Stop Solution

Promega Cooperation, Madison, USA

RQ1 RNase-Free DNase

Promega Cooperation, Madison, USA

RQ1 RNase-Free DNase 10x Reaction
Buffer

Promega Cooperation, Madison, USA

Geräte und Verbrauchsmaterialien

DLAB Mini Zentrifuge Typ D1008

DLAB Scientific Co., Ltd., Beijing, China

LifeECO Thermal cycler

Hangzhou Bioer Technology Co.,
Hangzhou, China

Multiply® µStrip Pro 8-strip, 0,2 µl

Sarstedt AG & Co, Nümbrecht,
Deutschland

Real Time Quantitative Polymerase Chainreaction (RT-qPCR)

Chemikalien

iTaq™ Universal SYBR® Green	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
ROTIPURAN® Wasser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Primer (Tabelle 1)	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland

Tabelle 1: Primersequenzen für RT-qPCR

Gen	Sequenzen
18S	<i>fw.</i> 5' GGG CCC GAA GCG TTT ACT TT 3' <i>rv</i> 5' CGC CGG TCC AAG AAT TTC AC 3'
GLUT-5	<i>fw</i> 5' AAG GGA GGC GCA CGC TTG TG 3' <i>rv</i> 5' TGA GCA GTG CTG GGG AGT TG 3'
P2RX7	<i>fw</i> 5' TGT GTA CAT CGG CTC AAC CC 3' <i>rv</i> 5' CTC CAC AAT GGA CTC GCA CT 5'
CD39	<i>fw</i> 5' GGT GGT TCA GCA TAG TCC CA 5' <i>rv</i> 5' GTC CTT GCC ATA GAG GCG AA 5'
TNF-α	<i>fw</i> 5' GAA GGA GAA GAG GCT GAG GAA CAA G 3' <i>rv</i> 5' AAA ACA ACC CTC AGA CGC CAC AT 3'
IL-1β	<i>fw</i> 5' CAA GGG CTT CAG GCA GGC CG 3' <i>rv</i> 5' TGA GTC CCG GAG CGT GCA GT 3'
TLR2	<i>fw</i> 5' CTG CCC TTG CAG ATA CCA TT 3' <i>rv</i> 5' ATT GTG CCC ATT GCT CTT TC 3'

CD39 (cluster of differentiation 39), fw (forward), GLUT5 (Glucostetransporter 5), IL-1 β (Interleukin 1 β), P2RX7 (purinoceptor 7), RT-qPCR (real time quantitative polymerase chainreaction), rv (reverse), TLR2 (toll-like receptor 2), TNF- α (Tumornekrosefaktor alpha)

Geräte und Verbrauchsmaterialien

CFX Connect™ Real- Time System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
DLAB Mini Zentrifuge Typ D1008	DLAB Scientific Co., Ltd., Beijing, China
Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA

96 Well PCR Platte, farblos

Biozym Scientific GmbH, Hessisch
Oldendorf, Deutschland

Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISAs)

Human IL-1 β /IL-1F2 DuoSet[®] ELISA

R&D Systems Europe Ltd., UK &Europe

Geräte und Verbrauchsmateriale

Mehrkanalpipette

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Rotilabo[®]- Abdeckfolien für

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,

Mikrotestplatten, Polyester, steril

Deutschland

SpectraMax M3 Multi-Mode

Molecular Devices GmbH, Biberach an der
Riß, Deutschland

Thermo-Shaker PST-60 HL

BioSan SIA, Riga, Lettland

96-Well ELISA Platte

R&D Systems Europe Ltd., UK &Europe

ATP-Messung

Chemikalien

CellTiter-Glo[®] 2.0 Assay

Promega Cooperation, Madison, USA

Geräte und Verbrauchsmaterialien

SpectraMax M3 Multi-Mode

Molecular Devices GmbH, Biberach an der
Riß, Deutschland

96-Well Microplates, Clear Bottom

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen,
Deutschland

2.5. Fructose Messung

Chemikalien

Abnova Fructose Assay Kit, KA1668

Abnova GmbH, Heidelberg, Deutschland

Geräte und Verbrauchsmaterialien

SpectraMax M3 Multi-Mode

Molecular Devices GmbH, Biberach an der
Riß, Deutschland

96-Well Microplates, Clear Bottom

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen,
Deutschland

2.6. Allgemeine Materialien

Chemikalien

Destilliertes Wasser

Ethanol ($\geq 99,8\%$)

Laborbestand

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Verbrauchsmaterialien und Geräte

Deckgläser

Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland

Eppendorf Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml,
2 ml) Falcons (Röhre) (15ml & 50 ml)

Sarstedt AG & Co, Nümbrecht,
Deutschland

Laborstifte

Micronova Manufacturing INC.

Mehrkanalpipette

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Pasteurpipetten

VWR International GmbH, Wien,
Österreich

Pipetten Boxen

GLW Storing Systems GmbH, Würzburg,
Deutschland

Pipetten

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Pipettenspitzen/Filterspitzen

Sarstedt AG & Co, Nümbrecht,
Deutschland,
Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland

Pipettierhilfe

DLAB Scientific Inc., Beijing, China

Serologische Pipetten (5ml, 10ml, 25 ml)

Sarstedt AG & Co, Nümbrecht,
Deutschland,

SpectraMax M3 Multi-Mode

Molecular Devices GmbH, Biberach an der
Riß, Deutschland

Stoppuhr

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Vortexer REAX 2000

Heidolph Instruments GmbH & CO. KG,
Schwabach, Deutschland

Zentrifuge Z 216 MK / Zentrifuge Z 446 K

HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen,
Deutschland

Software

CFX Manager™ Software Version 3.1

GraphPad Prism 7.0

Microsoft Office 365

SoftMax Pro7 Software

Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA

GraphPad Software, Inc., San Diego, USA

Microsoft Corporation, Redmon, USA

Molecular Devices GmbH, San Jose, USA

3. Methoden

3.1. Kultivierung von CaCo-2 Zellen und Aussaat im Transwell-System

Hintergrund

In den 1970er Jahren wurden mehrere epitheliale Zelllinien aus gastrointestinalen Tumoren hergestellt. Ziel war es, die Mechanismen der Krebsentwicklung und die Auswirkungen der Zytostatikatherapie zu untersuchen. Die so genannten, „Cancer coli-2“ (Caco-2) Zellen, die von Jorgen Fogh am Sloan-Kettering Cancer Research Institute aus einem humanen kolorektalen Adenokarzinom hergestellt worden, sind in der Lage spontan auszudifferenzieren, sobald die Zellen Konfluenz erreichen [54].

Kultivierung

Für die Zellkulturversuche wurden CaCo-2 Zellen (American Type Culture Collection (ATCC), Cat.Nr: HTB-37TM) (Passage Nr: 60-69) im Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ in einer 75 cm² Zellkulturflasche kultiviert. Wenn die Zellen zu etwa 90%-95% konfluent waren, wurden sie gesplittet. Für das Splitting wurde zuerst das verbrauchte Medium abgesaugt. Dann wurden die Zellen mit 10 ml DPBS gewaschen und für 2 min in den Inkubator gestellt. Das DPBS wurde abgesaugt und 4,5 ml Trypsin/EDTA in die Flasche gegeben. Nach 2 min wurde Trypsin/EDTA entfernt. Die Zellen wurden anschließend noch mal mit 4,5 ml Trypsin/EDTA für 10 min im Inkubator inkubiert, bis sie sich vom Boden gelöst hatten. Anschließend wurde 10 ml frisches Medium (siehe Tabelle 2 für die Zusammensetzung des Mediums) dazugegeben, um so das Trypsin zu deaktivieren. Die abgelösten Zellen wurden in ein 15 ml Falcon transferiert und bei 300 rcf bzw. 1200 rpm für 5 min zentrifugiert.

Tabelle 2: Zusammensetzung des CaCo-2-Mediums

Substanz	Volumen
DMEM (w: 4,5 g/L Glucose, L-Glutamine, Sodium pyruvate, 3,7 g/L NaHCO ₃)	400 ml
FBS (20%)	100 ml
Pen/Strep (1%)	5 ml
MEM NEAA (1%)	5 ml

DMEM (Dulbecco's modified eagle medium), FBS (fetale bovine serum), MEM NEAA (non-essential amino acid solution w/o: L-Glutamine), Pen/Strep (penicilin/streptomycin)

Nach der Zentrifugation wurde den Überstand entfernt und das Zellpellet in 10 ml frisches Medium vollständig resuspendiert. 20 µl Zellsuspension wurden entnommen und mit 20 µl DPBS für die Zellzählung verdünnt. Mithilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt. Die berechnete Menge an Zellsuspension, die für eine Zielkonzentration von $2,43 \cdot 10^5$ an Zellen/ 75 cm² Zellkulturflasche nötig war, wurde in eine neue Zellkulturflasche mit 10 ml frischem Medium pipettiert, um so eine neue „Laufflasche“ für den Erhalt der Zellen zu bekommen (siehe Abbildung 6 für den weiteren Ablauf der Kultivierung).

Aussaat im Transwell-System

Für die Zellversuche wurde ein Transwell-System verwendet. Nach dem Splitting wurde eine Zellkonzentration von $1,35 \cdot 10^5$ Zellen/ 500 µl Medium in die Transwell Inserts (TC-Inserts) bzw. in die 12-Well Zellkultureinsätze in einer 12-Wellplatte (siehe Abbildung 5) ausgesät und kultiviert (siehe Abbildung 6).

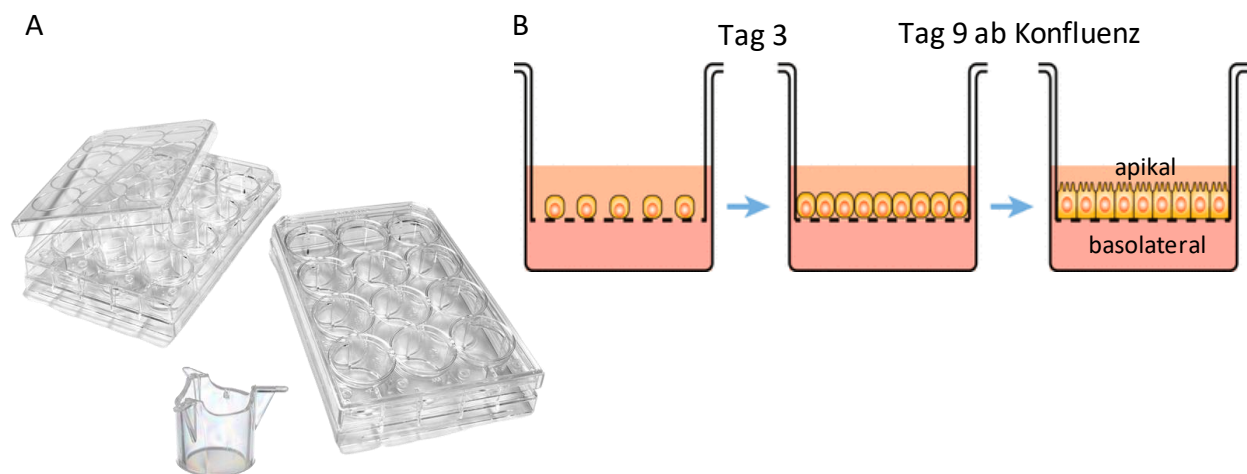


Abbildung 5: (A) Ein Foto der 12-Wellplatte und der Inserts sowie (B) ein schematisches Bild der Kultivierung der CaCo-2 Zellen in Transwell Inserts (modifiziert nach [55-58]). A: Die Inserts haben einen Porendurchmesser von 0,4 µm [58]. Die Arbeitsvolumina betrugen in einem Insert 0,5 ml und in einem Well 1,5ml. B: Nach der Aussaat erreichten die CaCo-2 Zellen die Konfluenz in drei Tagen und es wurde eine Zellmonolayer gebildet. Nach neun Tagen erschienen die CaCo-2 Zellen mit Mikrovilli, die für die Enterozyten des Dünndarms charakteristisch sind, wodurch im Transwell-System eine apikale und eine basolaterale Seite entstand [57].



Abbildung 6: Schematische Zusammenfassung des Ablaufs der Kultivierung der CaCo-2 Zellen nach dem Splitting & der Aussaat (zusammengestellt mit Microsoft PowerPoint). Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Je nach der Bedingung kann es sein, dass die Zellen schneller bzw. langsamer wachsen. Deswegen wurde immer überprüft, wie konfluent die Zellen waren. Ab einer Konfluenz von 100% differenzieren die Zellen zu Dünndarmzellen aus [59]. TC-Insert (Transwell Inserts).

3.2. Isolation von Monozyten aus Buffy-Coat

Für die Isolation von den Monozyten wurden Buffy-Coats verwendet, die vom Wiener Roten Kreuz bezogen wurden. Zuerst wurde die Gesamtblutmenge bestimmt, indem der ganze Buffy-Coat in ein 50 ml Falcon transferiert wurde. Die Blutmenge betrug meistens zwischen ca. 30-40 ml. Die PluriMate - Falcons (15ml) wurden jeweils mit 4,5 ml Monozyten Spin Medium versetzt. Entsprechend der Blutmenge wurde der Buffy-Coat auf 5-6 pluriMate - Falcons zu gleichem Teilen aufgeteilt. Anschließend wurden die Falcons für 15 min bei 800 rcf und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Zunächst wurde die obere orange Phase (Plasma) abgenommen bzw. entfernt und die helle untere Phase (Monozyten) wurde in ein neues 10 ml Falcon überführt und auf 10 ml mit DPBS aufgefüllt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 300 rcf und RT. Dann wurde der Überstand bis zur 1 ml Markierung abgenommen und das Falcon noch mal mit DPBS auf 10 ml aufgefüllt. Nach dem zweiten

Zentrifugationsschritt für 10 min bei 300 rcf und RT wurde der ganze Überstand entfernt. Das verbliebene Zellpellet wurde in 1 ml DPBS resuspendiert und das Falcon wurde mit DPBS auf 10 ml aufgefüllt. Infolgedessen wurden die Zellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer durch die Verdünnung (1:3) von der 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau und 10µl DPBS bestimmt. Anschließend wurden die Monozyten zum letzten mal für 10 min bei 200 rcf und RT abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Monozytenpellet dreifach mit 1 ml RPMI-1640 Medium (siehe Tabelle 3 für die Zusammensetzung des RPMI-1640 Mediums) resuspendiert und in ein neues 50 ml Falcon transferiert. Am Ende wurde das Falcon mit der restlichen Menge an nötigen RPMI-1640 Medium abgefüllt.

Tabelle 3: Zusammensetzung des RPMI-1640 Mediums

Substanz	Volumen
RPMI-1640 (with L-glutamine and sodium bicarbonate)	445 ml
Hitzeinaktiviertes FBS (10%) *	50 ml
Pen/Strep (1%)	5 ml

FBS (fetale bovine serum), Pen/Strep (penicilin/streptomycin). *Für die Hitzeinaktivierung wurden 50 ml FBS für 35 min bei 56°C im Wasserbad erhitzt.

3.3. Stimulation und Behandlung von CaCo-2 Zellen und Monozyten im Co-Kulturmodell

Um zu untersuchen, ob Fructose einen Einfluss auf die LTA-vermittelte Stimulation von Monozyten hat, sowie möglich beteiligte Mechanismen zu untersuchen, wurden ausdifferenzierte CaCo-2 Zellen im Co-Kultur mit humanen primären Monozyten mit LTA ± Fructose behandelt. In folgenden ist der Versuchsaufbau im Detail beschrieben.

Vorbereitung der Co-Kultur

Nach der Isolation von den Monozyten aus dem Buffy-Coat wurde die 12-Wellplatte mit ausdifferenzierten CaCo-2 Zellen vorbereitet, wobei das Medium apikal und basolateral abgesaugt wurde. Zunächst wurden je Well basolateral 300.00 Monozyten in 350 µl RPMI-1640 Medium überführt.

Experiment 1

Versuchsdurchführung

Frisches RPMI-1640 Medium wurde entsprechend der Bedingungen in das basolaterale Kompartiment zugegeben (siehe Abbildung 7 für Studiendesign). Es folgte die apikale Gabe von 0-10 mM steril filtrierter Fructoselösung und frischem CaCo-2-Medium entsprechend der Bedingungen. Die Zellen wurden für 14h oder 24h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubationszeit von 14h bzw. 24h wurden zuerst die CaCo-2 Zellen und dann die Monozyten abgenommen.

Versuchsende

Nach 14h bzw. 24h wurde das apikale Medium in 500 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert. Da die TC-Inserts semipermeabel sind, wurden nur die CaCo-2 Zellen in eine neue 12-Wellplatte transferiert, und anschließend mit 500 µl Trizol für 20 min versetzt. Danach wurde der Zelllysate mehrmals (10- bis 12-mal) vorsichtig resuspendiert und in 500 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Reaktionsgefäße wurden zunächst für 10 sek gevortext und für 5 min bei RT inkubiert und anschließend bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Der Inhalt des basolateralen Kompartiments wurde gut gemischt und in 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden sie für 5 min bei 2000 rpm, RT zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C gelagert. Das Zellpellet wurde mit 1 ml DPBS gewaschen und erneut für 5 min bei 2000 rpm, RT zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 500 µl Trizol resuspendiert, für 10 sek gevortext, für 5 min im RT inkubiert und anschließend entweder bei -80 °C gelagert oder direkt weiter für die RNA-Extraktion verwendet.

Experiment 2

Versuchsdurchführung

In das basolaterale Kompartiment wurde frisches RPMI-1640 Medium entsprechend der Bedingungen zugegeben (siehe Abbildung 7 für Studiendesign). In das apikale Kompartiment wurde 0-10 mM steril filtrierte Fructoselösung und frisches CaCo-2-Medium entsprechend der Bedingungen zugegeben. Die Zellen wurden zunächst für 14h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubationszeit von 14h wurden nur die CaCo-2 Zellen abgenommen und anschließend wurden die Monozyten basolateral mit $\pm$ LTA (10 µg/ml) für 2h weiter im

Inkubator stimuliert. Nach dieser Inkubationszeit wurden letztendlich auch die Monozyten entnommen.

Versuchsende

Nach den Inkubationszeiten erfolgte das Vorgehen der Versuchsende analog zu Experiment 1.

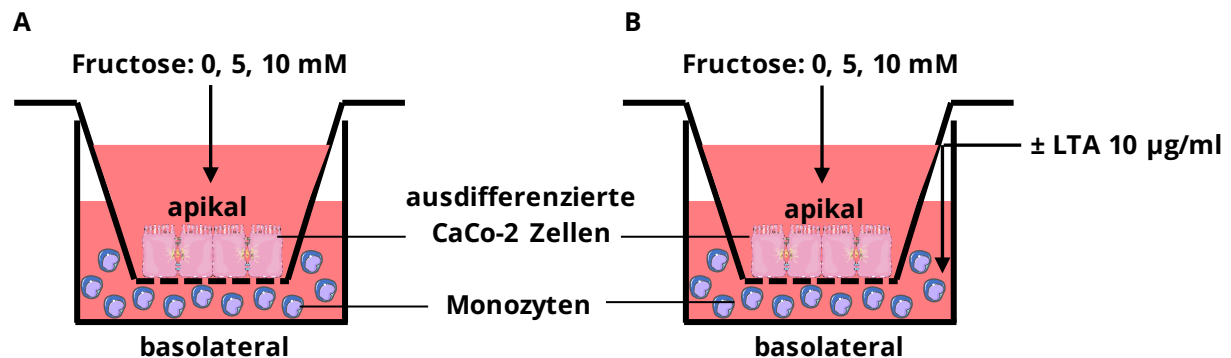


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Versuchsbedingungen im Co-Kulturmodell (zusammengestellt mit Microsoft Word & teilweise mit Smart Servier Medical Art (lizenziert unter „Creative Commons Attribution 3.0 unported license“)). Die Zugabe der Fructose erfolgte apikal über die CaCo-2 Monolayer, während die LTA-Stimulation von Monozyten nur basolateral erfolgte. A: Im Rahmen von Experiment 1 wurden die Monozyten apikal mit 0-10 mM Fructose für 14h und 24h stimuliert. B: Im Rahmen von Experiment 2 wurden die Monozyten apikal mit 0-10 mM Fructose für 14h und anschließend basolateral mit $\pm$ LTA (10µ/mL) für 2h stimuliert. LTA (Lipoteichonsäure).

3.4. Fructose Messung

Für die Messung der Fructose wurde ein kommerziell erhältliches Kit, welches für die direkte Verwendung in Zellkulturmedium geeignet ist, nach Angaben des Herstellers (Abnova Fructose Assay Kit, KA1688) verwendet. Das Fructose Assay Kit reagiert direkt und spezifisch mit der in Medien vorhandenen Fructose. Die Glucose und die Galactose interferieren nicht. Die Farbintensität des gebildeten Komplexes ist direkt proportional zur Fructose Konzentration in der Probe und sie kann photometrisch bei 565nm gemessen werden [60]. In folgenden ist der Ablauf der Messung kurz zusammengefasst.

Die Proben wurden zunächst mit dH₂O in einem Verhältnis von 1:5 verdünnt (20 µl Gesamtvolumen) Dann wurde 12 µl Standard (20mM) mit 228 µl dH₂O gemischt und aus dieser Stocklösung (1000µM Fructose) eine Standardreihe nach dem Pipettierschema, das in **Tabelle 4** dargestellt ist. Zunächst wurden 20 µl der verdünnten Standards und der

verdünnten Proben in eine 96-Wellplatte (clear bottom) pipettiert. Anschließend wurde 80 µl der Farbreagenz (56 µl Assay Buffer, 1 µl Enzyme, 1 µl PMS-Solution und 14 µl MMT-Solution) in jedes Reaktion-Well gegeben. Die 96-Wellplatte wurde im Dunkeln bei RT für 1h inkubiert und letztendlich wurde die Absorption bei 565 nm im Photometer gemessen. Anhand der Standardgerade wurde die Fructose Konzentration berechnet.

Tabelle 4: Herstellung der Standardreihe für die Fructose Messung

No	100 µM STD+H ₂ O	Vol (µl)	Fructose (µM)
1	100 µl + 0µl	100	1000
2	60 µl + 40µl	100	600
3	30 µl + 70µl	100	300
4	0 µl + 100µl	100	0

STD (Standard), Vol (Volumen)

3.5. Bestimmung der Expression von Markern des Fructose- bzw. ATP-Metabolismus und der Entzündung in isolierten Monozyten

RNA Extraktion

Trizol ist eine einphasige Lösung aus Phenol und Guanidiniumisothiocyanat, die gleichzeitig biologisches Material auflöst und Proteine denaturiert, wobei diese auch inhibiert. Mit dieser Methode kann nicht nur Ribonukleinsäure (RNA), sondern auch Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Protein aus einer Probe isoliert werden [61].

Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und anschließend 200 µL Chloroform hinzugefügt. Die Reaktionsgefäße wurden für 10 sek gevortext und für 10 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden sie für 10 min bei 12000 rcf und 4°C zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden mit 500 µL Isopropanol versetzt, für 10 sek gevortext und für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden sie nochmal für 10 min bei 12000 rcf und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das Pellet mit 1 ml Ethanol (75%) gewaschen, kurz gevortext und für 8 min bei 7500 rcf und 4°C zentrifugiert. Nach dem Verwerfen vom Überstand wurde der Waschschritt erneut wiederholt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße für 10 min bei RT getrocknet und es

wurde 9 µL DNase- RNase- freies Wasser zupipettiert. Anhand eines Heizblocks wurde das Pellet für 10 min bei 55 °C und 300 rpm vollständig gelöst. Danach wurden die Reaktionsgefäße sofort auf Eis gesetzt und entweder bei -80°C gelagert, oder direkt weiter verwendet.

cDNA Synthese

Ziel der „komplementäre DNA“ (cDNA) Synthese ist es die RNA in einzelsträngige cDNA umzuschreiben. Als erster Schritt wird hierbei ein DNase Verdau durchgeführt, um die mögliche DNA-Moleküle aus der extrahierten RNA zu entfernen [62].

Für die Synthese wurden cDNA-Reaktionsgefäße verwendet, in die gesamte isolierte RNA zugesetzt wurde. Dann wurden 1 µl RNase-Free DNase 10xReaction Buffer und 1µl RQ1 RNase-Free DNase in Reaktionsgefäße pipettiert, gevortext und kurz zentrifugiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße für 30 min bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Danach wurde 1 µl RQ1 DNase Stop Solution in jedes Reaktionsgefäß pipettiert und die Reaktionsgefäße noch mal gevortext. Es folgte eine Inkubation im Thermocycler für 10 min bei 65°C, um die DNase zu inaktivieren. Wie in Tabelle 5 dargestellt wird, wurde ein Mastermix für die cDNA Synthese hergestellt. Die Reaktionsgefäße wurden jeweils mit 10,1 µl Mastermix versetzt und wurden noch mal gevortext. Danach erfolgte die cDNA-Synthese im Thermocycler (siehe Tabelle 6). Nach der Synthese wurde intron freie, stabile cDNA, welche in der real time qPCR quantifiziert werden kann, 80 µl DNase- RNase- freies Wasser zugegeben und bei -20°C gelagert.

Tabelle 5: Mastermix für die cDNA Synthese

Substanz	Volumen / Probe
MgCl ₂ (25mM)	4 µl
Reverse Transkriptase Puffer	2 µl
dNTP Mix (10 mM)	2 µl
RNasin	0,5 µl
Random Primer	1 µl
AMV Reverse Transkriptase (15U)	0,6 µl

Tabelle 6: cDNA-Synthese im Thermocycler

Zeit (min)	Temperatur (°C)
10	25
15	42
5	95
5	4
∞	4

RT-qPCR

„Real time- quantitative polymerase chain reaction“ (RT-qPCR) ist ein technisches Verfahren zur exponentiellen Amplifikation von der umgeschriebenen cDNA, wobei die Quantifizierung in Echtzeit verfolgt werden kann [63]. Das Prinzip beruht auf einem zyklischen Prozess. Für jede Wiederholung von einem Zyklus erhält man eine Verdopplung der DNA. Die Vervielfältigung erfolgt in 3 Schritten:

1. Denaturierung: Trennung der doppelsträngigen DNA (=Template) in zwei Einzelstränge bei 95 °C
2. Annealing: Anlagerung der Primer an die DNA-Einzelstränge bei 55-65 °C (Primerhybridisierung)
3. Elongation: Verlängerung der Primer in Anwesenheit von Desoxynukleotiden (dNTPs) komplementär zur Ausgangs-DNA durch DNA-Polymerase

Während der Elongation bindet ein Farbstoff bzw. SYBR Green an die doppelsträngige DNA und emittiert ein Fluoreszenzsignal, welches letztendlich quantifiziert wird. Hier korreliert der s.g. „threshold cycle“ bzw. C_t-Wert mit der Menge der cDNA [64].

Zuerst wurde ein Mastermix für die Durchführung der PCR hergestellt. (siehe Tabelle 7)

Tabelle 7: Mastermix für die RT-qPCR

Substanz	Volumen/Probe
iTaq™ Universal SYBR® Green	10 µl
ROTIPURAN® Wasser (nuklease frei)	3 µl
Primer fw *	1 µl
Primer rv *	1 µl

fw (forward), rv (reverse), RT-qPCR (real time quantitative polymerase chain reaction). *Die Konzentration von den Arbeitslösungen betrug je 3pmol/µl, außer bei den Primern von TNF-α (6pmol/µl).

Von diesem Mastermix wurden 15 µl in jedes „Well“ pipettiert und je 5 µL der cDNA Lösung hinzugegeben. Die Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen. Die PCR-Platte wurde kurz zentrifugiert und anschließend in den PCR Thermocycler gestellt (siehe Tabelle 8 für das Programm).

Zur Auswertung wird die delta-delta Ct-Methode verwendet, d.h. die Expression des Zielgens wird mit der Expression des Referenzgens 18S von der gleichen Probe normalisiert. Grund dafür ist, dass die spezifischen Störfaktoren ausgeschlossen werden und dadurch die Fehlinterpretation der ermittelten Expressionsprofile vermieden werden kann [65]. Außerdem wird eine „non template control“ (NTC), die keine cDNA-Probe enthält, zur Kontrolle mitgeführt, um die möglichen falsch-positiven Ergebnisse bestimmen zu können. SYBR Green kann an alle DNA-Bestandteile binden und dadurch kann es zur Bildung von spezifischen und unspezifischen PCR-Fragmenten kommen. Deswegen ist es wichtig eine Schmelzkurvenanalyse durchzuführen, um eine Spezifität sicherzustellen [66].

Tabelle 8: Das Programm im Thermocycler für RT-qPCR

Gen	Initiale Denaturierung	Denaturierung	Annealing/Elongation	Schmelzkurve	Zyklen (n)
18S	95 °C, 30 s	95 °C, 5 s	64 °C, 30 s	95 °C, 10 s 65 °C, 5 s 95° C	39
GLUT5				95 °C, 10 s	
IL-1β	95 °C, 30 s	95 °C, 5 s	64 °C, 30 s	65 °C, 5 s 95° C	39
TLR2					
P2RX7, CD39	95 °C, 30 s	95 °C, 5 s	64 °C, 30 s	95 °C, 10 s 65 °C, 5 s 95° C	45
TNF-α	95 °C, 30 s	95 °C, 5 s	60 °C, 30 s	95 °C, 10 s 65 °C, 5 s 95° C	39

CD39 (cluster of differentiation 39), fw (forward), GLUT5 (Glucosetransporter 5), IL-1β (Interleukin 1 β), P2RX7 (purinoceptor 7), RT-qPCR (real time quantitative polymerase chainreaction), rv (reverse), TLR2 (toll-like receptor 2), TNF-α (Tumornekrosefaktor alpha)

3.6. Bestimmung biochemischer Parameter im Zellkulturüberstand isolierter Monozyten

IL-1 β ELISA

„Enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA) ist eine serologische Untersuchungsmethode zum Nachweis von Proteinen bzw. Antikörpern, die im Blut und in Sekreten, wie z.B. Speichel vorkommen [67].

Im Rahmen dieser Masterarbeit wurde neben dem RT-qPCR, ein ELISA für das Zytokin IL-1 β durchgeführt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellüberstand des basolateralen Kompartiments bzw. der Monozyten des Experiments 2 quantifiziert. Für die Quantifizierung wurde ein kommerziell erhältliches Kit (Human IL-1 β /IL-1F2 DuoSet® ELISA, R&D Systems) nach Angaben des Herstellers verwendet. In folgenden ist die Durchführung kurz zusammengefasst.

Am Anfang wurden alle nötigen Reagenzien nach Angaben des Herstellers (Human IL-1 β /IL-1F2 DuoSet® ELISA, R&D Systems) hergestellt bzw. vorbereitet. Zunächst wurde die 96-Wellplatte übernacht mit „Fängerantikörper“ beschichtet. Nach der Erstellung eines Pipettierschemas wurde eine Standardreihe hergestellt und danach wurden je 100 μ l der Proben bzw. der Standards in die Wells pipettiert und für 2h bei RT inkubiert. Alle nicht hochaffin gebundenen Bestandteile wurden durch Waschen entfernt. Danach wurde ein Detektionantikörper je Well dazupipettiert und wieder für 2h bei RT inkubiert. Nach dem anschließenden Waschvorgang wurde der enzymatische Marker Streptavidin-HRP dazugegeben. Letztendlich wurde nach 20 minütiger Inkubation bei RT und einem Waschvorgang, das Substratlösung dazugegeben und es entstand eine blaue Farbreaktion, deren Intensität proportional zur gesuchten Zytokinmenge ist. Die Auswertung erfolgte nach Zugabe der Stopplösung 2 NH₂SO₄ mit Hilfe eines Photometers bei 450 nm und 540 nm. Der tatsächliche IL-1 β -Gehalt der Probe ergab sich direkt aus der Standardgeraden [68, 69].

ATP-Messung

Mithilfe eines kommerziell erhältlichen Kit (CellTiter-Glo® 2.0 Assay, Promega) wurde die ATP-Konzentration nach Angaben des Herstellers bestimmt. Das Prinzip der Messung beruht auf der Mono-Oxygenierung von Luciferin, was durch das Enzym Luciferase katalysiert wird, wobei die Anwesenheit von Cofaktoren wie Mg²⁺, ATP, was von lebensfähigen Zellen gebildet

wird, und molekulare Sauerstoff nötig sind [70]. In folgenden ist die Durchführung kurz beschrieben.

Die Proben bzw. das apikale Medium von CaCo-2 Zellen (siehe Tabelle 2 für die Zusammensetzung) und das basolaterale Medium von Monozyten (siehe Tabelle 3 für die Zusammensetzung) wurden für die Messung unverdünnt verwendet. Um eine ATP-Standardkurve zu erstellen, wurde ausgehend von einem 10 mM ATP-Standard eine serielle Verdünnung vorgenommen. Je nach Probe wurde der ATP-Standard im Verhältnis von 1:10 im CaCo-2-Medium bzw. im RPMI-1640 Medium verdünnt. Insgesamt wurde 8 Standards hergestellt. Nach der Herstellung der Standards wurden je 100 µl der Proben und der Standards mit einem Blank (bzw. nur das Zellkulturmedium) in eine 96-Wellplatte (clear bottom) pipettiert. Zunächst wurden 100 µl Cell-Titer Glo Lumineszenzreagenz in jede Well dazupipettiert. Infolgedessen wurde die 96-Wellplatte mit einer Aluminiumfolie abgedeckt, um sie vor natürlichem Licht zu schützen, und für 5 min auf dem Orbitalschüttler geschüttelt. Anschließend wurde das Lumineszenzsignal (relative fluorescence unit (RFU)) mit einer Integrationszeit von 1000 ms am Photometer gemessen.

3.7. Statistische Auswertung

Im Rahmen dieser Masterarbeit wurden die statische Auswertung und die grafische Darstellung der Daten mit dem Programm GraphPad Prism 7.0 durchgeführt. Anhand des Grubb's Tests wurden die Ausreißer identifiziert und ebenfalls von der Analyse ausgeschlossen. Die Signifikanz der Ergebnisse wurden mittels One-Way-ANOVA untersucht. Die Ergebnisse wurden auf Varianzhomogenität überprüft. Falls keine Varianzhomogenität vorlag, wurden die Werte transformiert. Zum Vergleich von 2 Gruppen wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney U-Test angewendet. Die Daten sind als Mittelwert (MW) ± Standardfehler (SEM) angegeben. Bei jenen die Signifikanz bzw. der p-Wert von $\leq 0,05$ ermittelt wurde, wurde ein Unterschied zwischen den Ergebnissen als signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1. Vorversuch zur Untersuchung des Fructosetransports durch ausdifferenzierter CaCo-2 Zellen

Im Rahmen dieser Masterarbeit wurde zunächst im Vorversuch untersucht, ob Fructose in nachweisbare Menge durch eine ausdifferenzierten CaCo-2 Monolayer gelangt. Zu diesem Zweck wurden CaCo2-Zellen, wie im Punkt 3.1. erklärt, im Transwell-System ausdifferenziert. Anschließend wurden den Transwells apikal Fructose in Konzentration von 5-20 mM für 2h zugesetzt und die Fructose Konzentration in basolateralen Kompartiment gemessen.

Die Fructose Konzentration (μM) im basolateralen Kompartiment des Transwell-Systems nach der apikalen Gabe von unterschiedlichen Fructose Konzentrationen (mM) ist in Abbildung 8 dargestellt. Nach der apikalen Gabe von 20 mM Fructose war die basolateral messbare Fructose Konzentration signifikant höher, im Vergleich zu allen anderen Gruppen ($p < 0,05$). Auch die apikale Gabe von 10 mM Fructose zeigte einen signifikanten Unterschied bei der Fructose Konzentration im basolateralen Kompartiment im Vergleich zur Kontrolle ($p = 0,0223$). Die Exposition der Zellen gegenüber 5 mM führt zwar zu einem Anstieg der im basolateralen Kompartiment nachweisbare Konzentration von Fructose, jedoch streuten die Werte deutlich und der Anstieg war deutlich geringer.

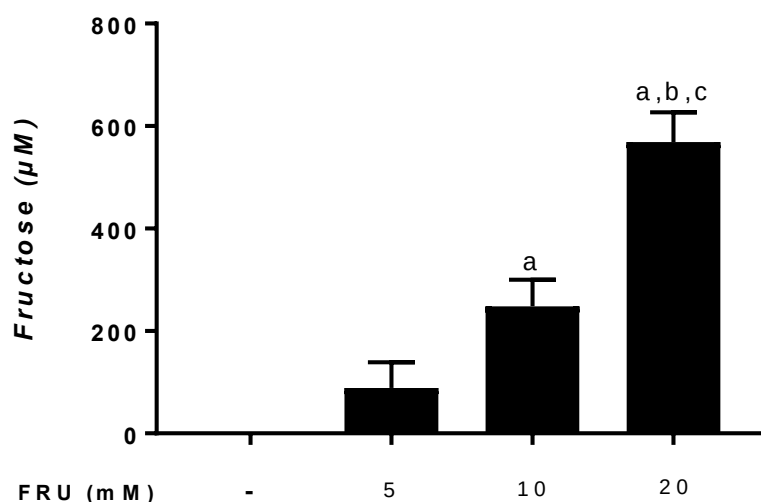


Abbildung 8: Einfluss der apikalen Exposition von ausdifferenzierten CaCo-2 Zellen gegenüber 0-20 mM Fructose für 2h auf die Fructose Konzentration in basolateralen Kompartiment des Transwell-Systems. Fructose Konzentration in μM . Die Daten sind dargestellt als $\text{MW} \pm \text{SEM}$ ($n=3$). ^a $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle. ^b $p < 0,05$ im Vergleich zur Fructose 5mM. ^c $p < 0,05$ im Vergleich zur Fructose 10mM. FRU = Fructose.

4.2. Einfluss von Fructose auf die mRNA-Expression von Parametern des Fructosemetabolismus in Monozyten in Co-Kulturmodell

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Behandlung mit Fructose in Co-Kulturmodell auf die mRNA-Expression von Parametern des Fructosemetabolismus in Monozyten hat, wurde im Rahmen des Experiments 1 (siehe Kapitel 3.3. Abbildung 7 für Studiendesign) die mRNA-Expression von GLUT5 in Monozyten in basolateralen Kompartiment gemessen. Die CaCo-2 Zellen wurden 14 bzw. 24h mit 0-10 mM Fructose inkubiert.

Nach 14h führte die Inkubation der CaCo-2 Zellen mit 10 mM Fructose zu einer leichten, jedoch aufgrund der Streuung nicht signifikanten, Erhöhung der mRNA-Expression von GLUT 5 in den Monozyten, die sich unter der CaCo-2 Zellen befinden ($p = 0,2105$). Im Gegensatz dazu war die GLUT5 mRNA-Expression 24h nach der Exposition signifikant geringer als bei den unstimulierten Zellen (5 mM $p = 0,0023$ bzw. 10 mM $p = 0,0034$ im Vergleich zur Kontrolle).

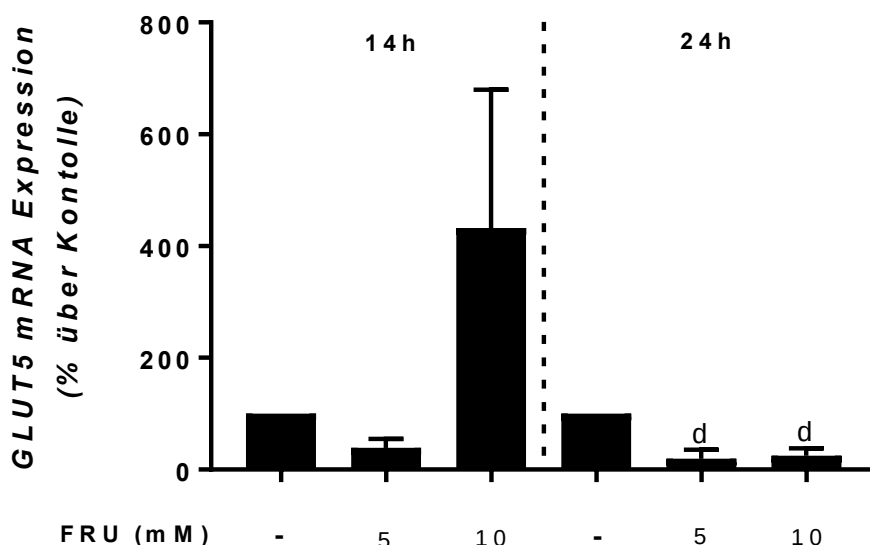


Abbildung 9: Einfluss der apikalen Gabe von 0-10 mM Fructose auf die Expression von GLUT5 in Monozyten in basolateralen Kompartiment in Co-Kulturmodell. mRNA-Expression in % über Kontrolle. Die Daten sind dargestellt als MW $\pm$ SEM (n=3-4). ^dp < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle nach 24h-Inkubation. FRU = Fructose, GLUT5 = Glucosetransporter 5.

4.3. Einfluss von Fructose auf die ATP-Konzentration im apikalen CaCo-2-Medium und basolateralen Monozyten-Medium

Um den Einfluss von Fructose auf die ATP-Konzentration zu untersuchen, wurden im Rahmen des Experiments 1 (siehe Kapitel 3.3. Abbildung 7) sowohl im apikalen CaCo-2-Medium als auch im basolateralen Monozyten-Medium die ATP-Konzentration gemessen.

Bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (0 mM Fructose) kam es zu einer signifikanten Reduktion der ATP-Konzentration im apikalen CaCo-2-Medium bei allen Gruppen nach 14h sowie 24h ($p < 0,05$) (siehe Abbildung 10). Die ATP-Konzentration im basolateralen Monozyten-Medium zeigten nach 14h einen leichten Anstieg der Konzentration durch 5 mM Fructose Behandlung und eine leichte Reduktion der Konzentration durch 10 mM Fructose Behandlung. Dennoch wiesen die Konzentrationen hier keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle auf. Nach 24h fand sich einer Steigerung der ATP-Konzentration bei allen Gruppen, jedoch war die Erhöhung, bezogen auf die jeweilige Kontrolle, lediglich in Zellkulturmedium von Monozyten mit 10 mM Fructose Behandlung signifikant unterschiedlich ($p = 0,0141$) (siehe Abbildung 11).

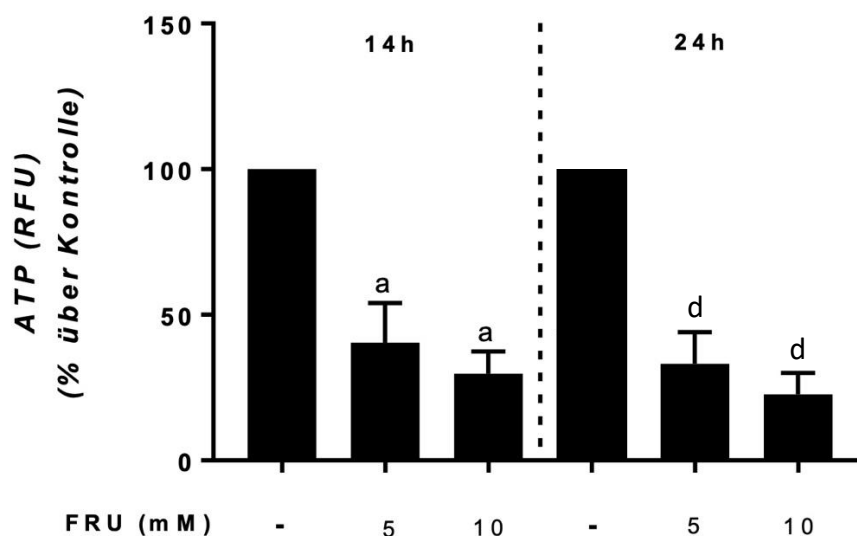


Abbildung 10: Einfluss der apikalen Gabe von 0-10 mM Fructose auf die ATP-Konzentration in apikalen CaCo-2-Medium in Co-Kulturmodell. RFU in % über Kontrolle. Die Daten sind dargestellt als $MW \pm SEM$ ($n=3-5$). ^a $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle nach 14h-Inkubation. ^d $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle nach 24h-Inkubation. ATP = Adenosintriphosphat, FRU = Fructose, RFU = relative fluorescence unit.

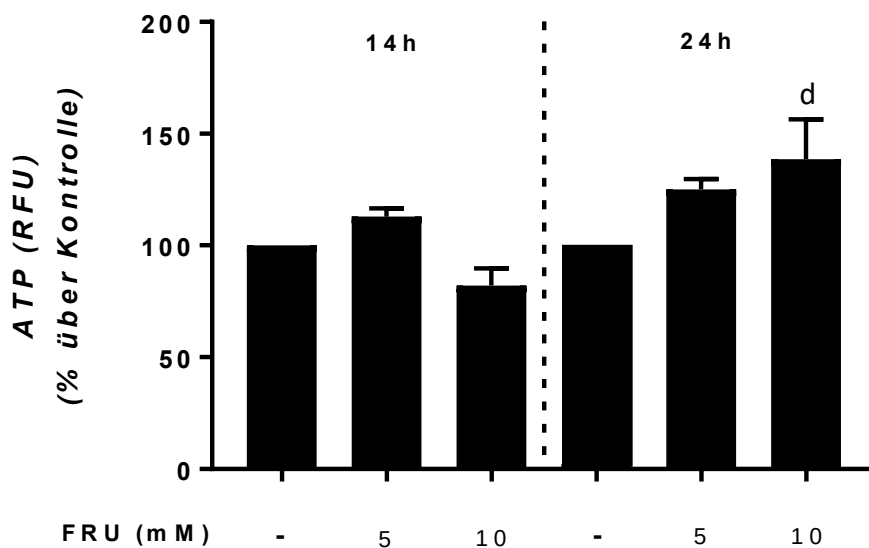


Abbildung 11: Einfluss der apikalen Gabe von 0-10 mM Fructose auf die ATP-Konzentration in basolateralen Monozyten-Medium in Co-Kulturmodell. RFU in % über Kontrolle. Die Daten sind dargestellt als MW $\pm$ SEM (n=4-6). ^dp < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle nach 24h-Inkubation. ATP = Adenosintriphosphat, FRU = Fructose, RFU = relative fluorescence unit.

4.4. Einfluss von Fructose auf die mRNA-Expression von Parametern des ATP-Metabolismus in Monozyten in Co-Kulturmodell

Zur Untersuchung der Auswirkungen der apikalen Fructose Behandlung im Co-Kulturmodell auf den ATP-Metabolismus in Monozyten wurden im Rahmen des Experiments 1 (siehe Kapitel 3.3. Abbildung 7) die mRNA-Expression des ATP-Rezeptors Purinoceptor 7 (P2RX7) und der ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolasen (ENTPDase) cluster of differentiation 39 (CD39) mithilfe der RT-qPCR bestimmt.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war die mRNA-Expression von **P2RX7** in den Monozyten, die sich in basolateralen Kompartiment der mit 5 bzw. 10 mM Fructose stimulierte CaCo-2 Zellen befinden, vermindert (5 mM 56,6 % bzw. 10 mM 40,4% im Vergleich zur Kontrolle). Ähnlich verhielt es sich auch nach 24h. In den Monozyten, die sich unter der CaCo-2 Zellen befinden, kam es mit 5 mM Fructose Behandlung bzw. 10 mM Fructose Behandlung zur verringerten mRNA-Expression von P2RX7 um 31,5% bzw. 47,6% im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (n.s.).

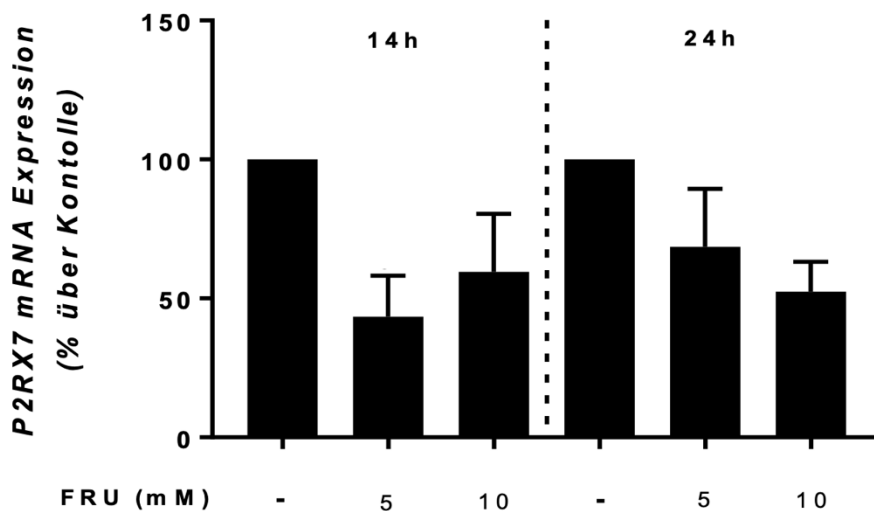


Abbildung 12: Einfluss der apikalen Gabe von 0-10 mM Fructose auf die Expression von P2RX7 in Monozyten in basolateralen Kompartiment in Co-Kulturmodell. mRNA- Expression in % über Kontrolle. Die Daten sind dargestellt als MW $\pm$ SEM (n=5-6). FRU = Fructose, P2RX7 = purinoceptor 7.

Nach 14h führte die Inkubation der CaCo-2 Zellen mit 5 bzw. 10 mM Fructose zu keinen signifikanten Unterschieden der mRNA-Expression von **CD39** in Monozyten. Im Gegensatz führte die Stimulation der CaCo-2 Zellen mit 5 mM und 10 mM Fructose nach 24h, im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle zu einer signifikanten Reduktion der CD39 mRNA-Expression in Monozyten (5 mM p = 0,0116 bzw. 10 mM p = 0,0367 im Vergleich zur Kontrolle).

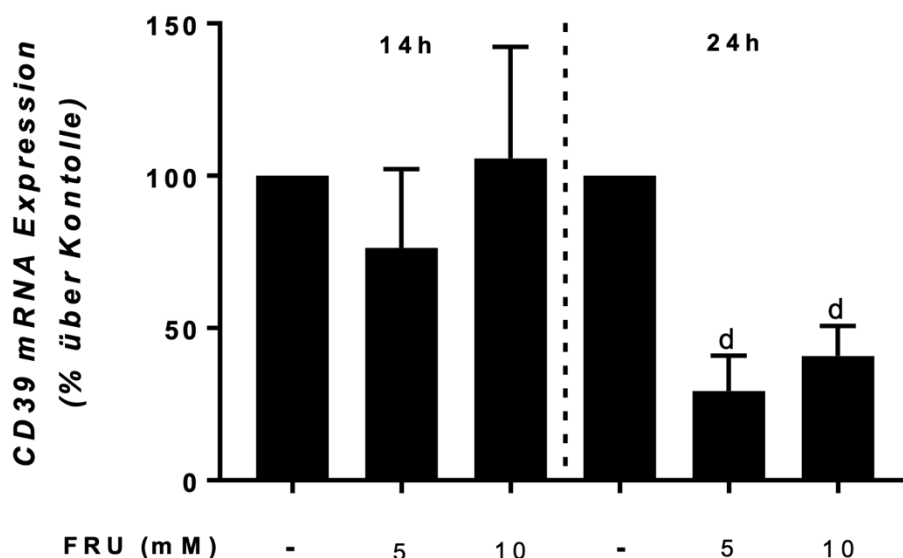


Abbildung 13: Einfluss der apikalen Gabe von 0-10 mM Fructose auf die Expression von CD39 in Monozyten in basolateralen Kompartiment in Co-Kulturmodell. mRNA-Expression in % über Kontrolle. Die Daten sind dargestellt als MW $\pm$ SEM (n=4-6). ^dp < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle nach 24h-Inkubation. CD39 = cluster of differentiation 39, FRU = Fructose.

4.5. Einfluss von Fructose auf die mRNA-Expression von TLR2 in Monozyten in Co-Kulturmodell

Nach 14h der Inkubation mit 0, 5 bzw. 10 mM Fructose ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Außerdem zeigte sich nach 24h eine Induktion der mRNA-Expression in sowohl mit 5 mM als auch mit 10 mM Fructose behandelten Monozyten, jedoch erreichten die Unterschiede das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ nicht (5 mM $p = 0,1950$ bzw. 10 mM $p = 0,4852$ im Vergleich zur Kontrolle).

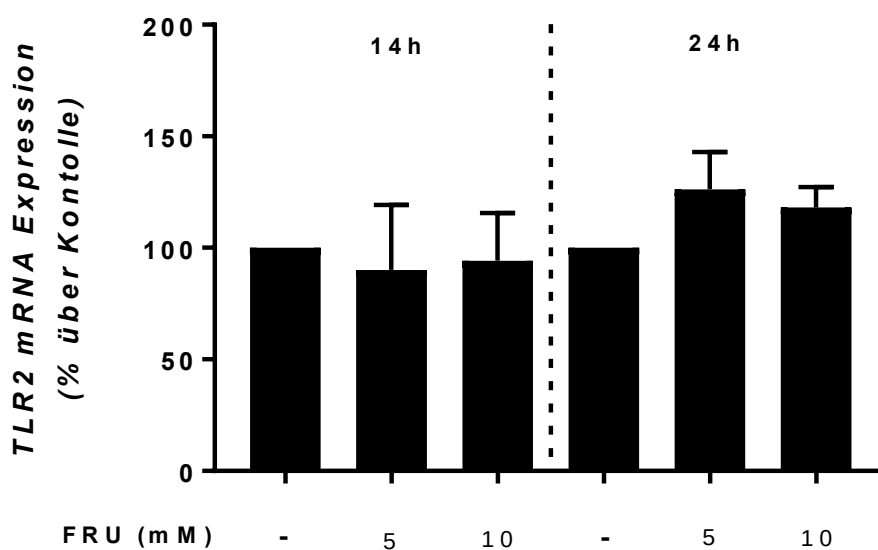


Abbildung 14: Einfluss der apikalen Gabe von 0-10 mM Fructose auf die Expression von TLR2 in Monozyten in basolateralen Kompartiment in Co-Kulturmodell. mRNA-Expression in % über Kontrolle. Die Daten sind dargestellt als $MW \pm SEM$ ($n=3-6$). FRU = Fructose, TLR2 = toll-like receptor 2.

4.6. Einfluss von Fructose auf die LTA vermittelte Stimulation von Monozyten in Co-Kulturmodell: mRNA-Expression und Freisetzung von $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$

Um den Einfluss der Fructose Behandlung in Co-Kulturmodell auf die LTA vermittelte Stimulation von Monozyten zu untersuchen, wurden im Rahmen eines 2. Experiments (siehe Kapitel 3.3. Abbildung 7) die mRNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen von $TNF-\alpha$ und $IL-1\beta$, sowie die Freisetzung des $IL-1\beta$, in Monozyten nach der apikalen Gabe von 0-10

mM Fructose für 14h und anschließender basolateralen LTA-Stimulation (10 µg/mL) für 2h gemessen.

Wie erwartet führte die Stimulation der Monozyten mit LTA zu einer Induktion der **TNF-α** mRNA-Expression in Monozyten ($p < 0,05$ naive vs. LTA, Mann-Whitney U- Test). In den Monozyten, die unter CaCo-2 Zellen mit Fructose Exposition kultiviert wurden, verstärkt sich der Effekt von LTA auf den mRNA-Expression von TNF-α deutlich. (5 mM = 0,0114 bzw. 10 mM $p = 0,0012$)

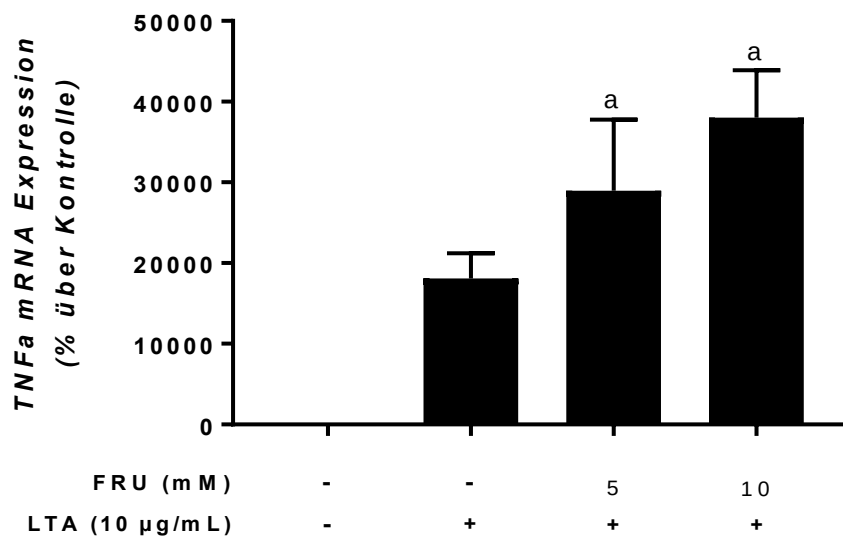


Abbildung 15: Einfluss der apikalen Gabe von 0-10 mM Fructose auf die LTA-vermittelte Stimulation (10 µg/mL) von Monozyten in Co-Kulturmodell auf die Expression von TNF-α in Monozyten. mRNA-Expression in % über Kontrolle. Die Daten sind dargestellt als MW±SEM (n=4-5). ^a $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle. FRU = Fructose, LTA = Lipoteichonsäure, TNF-α = Tumornekrosefaktor-α.

Wie erwartet, war die mRNA-Expression von **IL-1β** in den mit LTA-stimulierten Monozyten höher ($p < 0,05$ naive vs. LTA, Mann-Whitney U- Test) als in den naiven Zellen. Ähnlich verhielt es sich auch für die Zellen, die in den Well mit CaCo-2 Zellen, die mit 5 bzw. 10 mM Fructose behandelt wurden und mit LTA stimuliert wurden. Jedoch erreichte nur der Vergleich „Naive“ vs 10 mM Fructose das Signifikanz Niveau ($p = 0,0293$). Hingegen ergaben sich bei der Proteinkonzentration an IL-1β keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Es kam zu einer Steigerung der Freisetzung von IL-1β, durch die Vorbehandlung mit der Fructose und LTA-Stimulation, allerdings konnten hier aufgrund der hohen Streuung keine signifikanten Unterschiede erreicht werden.

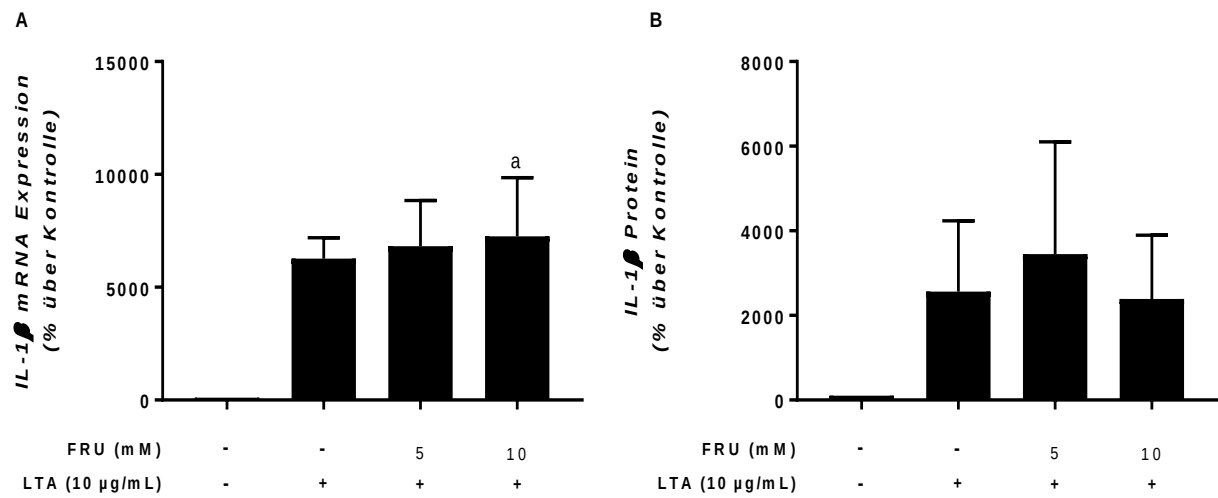


Abbildung 16: Einfluss der apikalen Gabe von 0-10 mM Fructose auf die LTA-vermittelte Stimulation (10 µg/mL) von Monozyten in Co-Kulturmodell auf die Expression von IL-1β in Monozyten und auf die IL-1β Proteinkonzentration im basolateralen Monozyten-Medium. A: IL-1β mRNA-Expression (n=5-6), B: IL-1β Proteinkonzentration (n=5). mRNA-Expression in % über Kontrolle. Die Daten sind dargestellt als MW±SEM. ^ap < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle. FRU = Fructose, IL-1β = Interleukin 1β, LTA = Lipoteichonsäure.

5. Diskussion

In den letzten Jahren ist der Fructosekonsum in den USA gestiegen [4, 5]. Der Verzehr von Zucker und insbesondere Fructose wird immer wieder als einer der Hauptfaktoren für die Entstehung von verschiedenen Krankheiten diskutiert [6]. Bakterielle Infektionen sind häufig und können zu lebensbedrohlichen Erkrankungen führen, die langfristige und kostenintensive Therapien erfordern können [23]. Im Laufe der Zeit haben viele Erreger Resistenz gegen verschiedene Therapeutika und Antibiotika entwickelt, was eine Herausforderung in der Therapie darstellt [24]. Die Rolle der Ernährung und hierbei insbesondere einzelner Nahrungsbestandteile wie Fructose in der Pathogenese von Infektionen und Erkrankungen ist bisher nicht geklärt. Nichtsdestotrotz gibt es Hinweise, dass Fructose ein Modulator der Immunantwort und Entzündung sein könnte [47-49]. In *in vitro* Studien wurden gezeigt, dass Fructose zur Induktion der mRNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-1 β in humanen Immunzellen führt [47-49]. Außerdem wurde auch darauf hingewiesen, dass die Aufnahme von Fructose Stoffwechselwege zellulär zur Glutaminolyse „umprogrammiert“ und mit einem oxidativen Stoffwechselweg einhergeht [49]. Die diesen Effekt der Fructose zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher weitgehend ungeklärt. Vor diesem Hintergrund war das Ziel der vorliegenden Arbeit den Einfluss von Fructose auf die LTA-vermittelte Stimulation von humanen Monozyten, sowie möglich beteiligte Mechanismen *in vitro* zu untersuchen.

5.1. Das Co-Kulturmodell: Fructose wird durch die CaCo-2 Monolayer transportiert

Den Transwells wurden apikal Fructose in Konzentration von 5-20 mM für 2h zugesetzt. Die basolateral messbare Fructose Konzentrationen waren nach der apikalen Gabe von verschiedenen Fructose Konzentrationen signifikant bzw. deutlich unterschiedlich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Fructose gelangt durch das Transwell, aber nur ca. 10%. Diese Konzentration in basolateralen Kompartiment ist ähnlich wie *in vivo*. Andere Metabolite von Fructose hätten hier auch einen Einfluss auf der messbaren Fructose Konzentration haben können. Jedoch sind weitere Studien nötig, um genau zu klären, was mit der restlichen Fructose passiert.

5.2. Fructose moduliert die mRNA-Expression von GLUT5 und von Markern des ATP-Metabolismus, sowie der TLR2 Expression in humanen Monozyten in Co-Kulturmodell

Die Expression von GLUT5 konnte bereits in humanen Monozyten nachgewiesen werden, jedoch ist die physiologische Rolle der erhöhten GLUT5 Expression in diesen Zellen noch unklar [17]. In der Studie von Fu et al. wurde darauf hingewiesen, dass GLUT5 möglicherweise neben Fructose auch andere Substrate transportieren könnte, die für phagozytischen Zellen wie Makrophagen von Bedeutung sein könnten [17]. In der vorliegenden Arbeit konnte in Monozyten in Co-Kulturmodell durch die Inkubation mit 10 mM Fructose nach 14h eine leichte, aber keine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression von GLUT5 gezeigt werden. Jedoch war die GLUT5 mRNA-Expression 24h nach der Exposition mit 5 bzw. 10 mM Fructose signifikant verringert im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Anhand dieser Ergebnisse scheint die Modulation der GLUT5 Expression einen zeit- und dosisabhängigen Verlauf in Monozyten zu haben. Ein wichtiger Unterschied zu anderen Studien ist, dass in der vorliegenden Arbeit die Zellen in einem Co-Kulturmodell stimuliert wurden.

Die Enterozyten können, die für den Fructose Stoffwechsel benötigte Enzyme exprimieren [71]. Studie von Jang et al. zeigte, dass im Mausmodell niedrigere Dosen von Fructose (0,5 g Fructose/ kg Körpergewicht (KG), entsprechen ~0,5 % der täglichen Kalorienzufuhr oder 3 g Fructose beim Menschen) fast vollständig (~90%) von den Enterozyten über Fructokinase abgebaut und in Glucose und organischen Säuren umgewandelt werden [16]. Darüber hinaus wurde auch gezeigt, dass hohe Fructosedosen (> 1g Fructose/ kg KG) die intestinale Kapazität überfordern und es zu einem „Spillover“ von Fructose in die portale Zirkulation bzw. in die Leber (~30%) kommt [16]. Da die Caco-2 Zellen Eigenschaften von Enterozyten zeigen [9], könnte anhand dieser Daten abgeleitet werden, dass möglicherweise CaCo-2 Zellen auch die Fructose verstoffwechseln könnten. In der vorliegenden Arbeit zeigten die Ergebnisse der ATP-Messung, dass es nach 14 und 24h zu einer signifikanten Reduktion der ATP-Konzentration im apikalen CaCo-2-Medium bei allen Gruppen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle kam. Die signifikant verminderte ATP-Konzentration im apikalen Medium könnte ein Hinweis auf Veränderungen des Fructose Stoffwechsels in den CaCo-2 Zellen sein, da die Umwandlung von Fructose in Fructose-1-Phosphat ATP als Co-Substrat erfordert [21, 22]. Dies könnte zu der Fructosemenge im basolateralen Kompartiment beitragen und dadurch einen

Effekt auf GLUT5 Expression haben, was die signifikant verminderte Expression nach 24h erklären könnte. Im Vorversuch wurde gezeigt, dass Fructose in nachweisbaren Mengen durch die ausdifferenzierten CaCo-2 Monolayer gelangt. Jedoch betrug die Exposition nur 2h. Es ist unklar, welche Rolle die CaCo-2 Zellen bei dem Fructose Stoffwechsel sowie Transport bei einer längeren Exposition für 14 bzw. 24h mit der Fructose spielt. Im Gegensatz zu der apikalen ATP-Konzentration fand sich nach 24h einer Erhöhung der ATP-Konzentration in basolateralen Monozyten-Medium bei allen Gruppen, jedoch war sie nur bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, in Zellkulturmedium von Monozyten mit 10 mM Fructose Behandlung signifikant unterschiedlich. Die Ergebnisse der Studie von Jones et al. zeigte, dass Fructose-Kohlenstoff in humanen Monozyten sowohl in der Glykolyse als auch im Citrat-Zyklus verwertet werden kann [49]. Die mRNA-Expression von GLUT5 war nach 24h signifikant niedriger, was mit der signifikanten Erhöhung der ATP-Konzentration nach 24h im basolateralen Monozyten-Medium einhergeht. Diese Ergebnisse könnte darauf hinweisen, dass nach 24h die Monozyten Fructose schon aufgenommen bzw. schon verstoffwechselt hätten und daher kein ATP mehr benötigen, um Fructose zu verstoffwechseln, was letztendlich zur Akkumulation von ATP in extrazellulären Raum führen könnte. Jedoch sind weitere Untersuchungen auf Proteinebene nötig, um das klären zu können.

Purinergic Rezeptoren (P2XRs) sind beteiligt an dem ATP-Transport in den extrazellulären Raum und alle Immunzellen können diese Plasmamembranrezeptoren exprimieren [72-75]. In der vorliegenden Arbeit war die mRNA-Expression von P2RX7 14h bzw. 24h nach der Exposition mit 5 bzw. 10 mM Fructose im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle vermindert. Dieser Effekt von Fructose auf die P2RX7 mRNA-Expression in Monozyten war jedoch nicht signifikant. Im extrazellulären Milieu aktiviert ATP die P2X Rezeptoren und wird von ENTPDasen wie CD39 zu Adenosindiphosphat (ADP) hydrolysiert [72]. In der vorliegenden Arbeit führte nach 14h die Inkubation der CaCo-2 Zellen mit 5 bzw. 10 mM Fructose zu keinen signifikanten Unterschieden der mRNA-Expression von CD39 in Monozyten. Im Gegensatz führte die Stimulation der CaCo-2 Zellen mit 5 bzw. 10 mM Fructose nach 24h, im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle zu einer signifikanten Reduktion der CD39 mRNA-Expression in Monozyten, was mit der signifikanten Erhöhung der ATP-Konzentration nach 24h im basolateralen Monozyten-Medium einhergeht. Normalerweise erhöht eine CD39-Hemmung die lokale ATP/ADP Konzentration, und löst damit die Aktivierung der P2RX7 aus

[72]. Die Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass nach 24h in Monozyten eine reduzierte ATP-Hydrolyse durch CD39 stattfindet. Dies sollte eigentlich zur Aktivierung der P2RX7 führen, jedoch war die P2RX7 Expression auf der Monozyten Membran reduziert, was darauf hindeuten könnte, dass die nach 24h erhöhte extrazelluläre ATP-Konzentration in Monozyten-Medium, vielleicht nicht aus den Monozyten stammt, sondern aus dem freigesetzten Fructose-Metaboliten von den CaCo-2 Zellen stammen könnten. Weiterführende Untersuchungen sind nötig, um diese Kenntnisse zu gewinnen.

In der vorliegenden Arbeit ergaben sich nach 14h der Inkubation mit 0,5 bzw. 10 mM Fructose keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression von TLR2 zwischen den Gruppen. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach 24h nur eine leichte Induktion der mRNA-Expression in sowohl mit 5 mM als auch mit 10 mM Fructose behandelten Monozyten. Die Unterschiede erreichten allerdings das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ nicht. Insgesamt kam es durch die Exposition von Zellen mit Fructose zwar zu einer leichten, aber keiner stabilen, Induktion von TLR2. Ob Fructose das direkt oder indirekt durch Metaboliten macht, ist jedoch nicht ganz klar. Um diesen Mechanismen und andere möglich beteiligten Signalwege besser verstehen zu können, sind weitere Studien, in welcher vielleicht andere Methoden verwendet werden, nötig.

5.3. Fructose und LTA wirken additiv und führen zu einer erhöhten mRNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen in Monozyten in Co-Kulturmodell

Eine Studie von Jones et al. hat bereits Hinweise geliefert, wie die Aufnahme von Fructose in humanen Monozyten unter LPS-induzierter Stimulation, metabolisch und funktionell wirken kann [49]. Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass die Monozyten, die mit Fructose behandelt wurden, unter LPS-induzierter Stimulation im Vergleich zur Behandlung mit Glukose signifikant erhöhte Mengen an Zytokinen, wie TNF- α und IL-1 β produziert haben [49]. Durch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde wie erwartet sowohl eine Induktion der TNF- α als auch der IL-1 β mRNA-Expression beobachtet, wenn die Monozyten mit LTA stimuliert wurden. Im Einklang mit den Ergebnissen von Jones et al. wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass in den Monozyten, die unter CaCo-2 Zellen mit Fructose Exposition kultiviert wurden, sich der Effekt von LTA auf die mRNA-Expression von TNF- α deutlich

verstärkt. Des Weiteren wurde ein ähnlicher Effekt für die mRNA-Expression von IL-1 β nachgewiesen, obwohl aufgrund der hohen Streuung hier nur der Vergleich „Naive“ vs. 10 mM Fructose das Signifikanz Niveau erreicht hatte. Die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wurden auch auf der Proteinebene beobachtet. Einhergehend mit der erhöhten mRNA-Expression von IL-1 β wurde durch die Vorbehandlung mit der Fructose und LTA-Stimulation eine erhöhte Freisetzung von IL-1 β beobachtet. Jedoch konnten hier aufgrund der hohen Streuung keine signifikanten Unterschiede erreicht werden. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte in der Arbeit von Lin et al. gezeigt werden, dass 2 mM Fructose Stimulation von humanen Monozyten *in vitro* für 4h zur Induktion von TNF- α und IL-1 β , sowie von oxidativem Stress geführt hat [48]. Allerdings wurde in der Studie von Lin et al. eine unterschiedliche Fructose Konzentration und Inkubationszeit eingesetzt. Auch in der Studie von Jones et al. wurde eine Fructose Konzentration von 11,1 mM für 24h eingesetzt. Ein anderer wesentlicher Punkt, welcher zu beachten ist, dass diese Arbeiten die Monozyten direkt und nicht im Co-Kulturmodell mit Fructose stimuliert haben. Trotzdem wurde ähnliche Ergebnisse erbracht.

Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Fructose und LTA additiv wirken und zu einer erhöhten mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β in Monozyten in Co-Kulturmodell führen. Ob Fructose ihre modulierende Wirkung in die Monozyten direkt oder indirekt über Metaboliten ausübt, ist derzeit noch unklar. In einer Studie von Paustian et al. wurde gezeigt, dass ATP und LTA synergistisch auf Monozyten wirken und somit spezielle proinflammatorische Zytokine induzieren können [76]. Während einer Entzündung können mehrere „Danger Signale“ in den extrazellulären Raum freigesetzt werden [74], darunter nicht nur ATP, sondern auch Ca²⁺, beide können die Reaktion verschiedener Zellen des Immunsystems regulieren [77, 78]. Es wurde auch beschrieben, dass mehrere zweiwertige Kationen, insbesondere Ca²⁺, die Bindung von ATP an den P2X7-Rezeptor allosterisch inhibieren können [79, 81]. Wie oben schon ausgeführt (siehe Punkt 5.2.) könnte der ausbleibende Effekt von P2RX7 auch möglicherweise dadurch oder durch andere Mechanismen bedingt sein. Außerdem könnte die Dosis-Effekt Beziehungen auch eine Rolle spielen. jedoch wurde dies in Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht vollständig geklärt.

Fazit

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weist darauf hin, dass Fructose auf die LTA-vermittelte Stimulation von humanen Monozyten *in vitro* modulierend wirkt. Fructose wird durch die CaCo-2 Monolayer transportiert, jedoch nur ca. 10%. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Fructose oder auch Metabolite, die durch transportiert sind, die mRNA-Expression von GLUT5 verändern. Die genauen Mechanismen der Modulation von GLUT5 konnten allerdings nicht vollständig geklärt werden. Weiterführende Untersuchungen auf der Proteinebene sind nötig, um diesen Effekt besser verstehen zu können. Die Ergebnisse zeigen, dass Fructose oder auch Metabolite die Immunantwort auf die LTA-Stimulation verstärken. Welche molekularen Mechanismen diesen Effekt zugrunde liegen, konnten jedoch durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden. Die Frage, ob eine Übertragbarkeit auf Menschen möglich ist, bleibt noch offen. Zudem bedarf auch die Anpassung der Fructose Dosis *in vivo* weiterer Forschung. Insgesamt sind weitere Studien mit unterschiedlicher Dosis, sowie mit anderen Methoden und Untersuchungen auf der Proteinebene notwendig, um den Einfluss der Fructose auf die LTA-vermittelte Stimulation und die möglich beteiligten molekularen Mechanismen besser verstehen und erklären zu können.

Zusammenfassung

Weltweit sind die bakteriellen Infektionen eines der wichtigsten Probleme in der globalen Gesundheit. In Entwicklungsländern betreffen die bakteriellen Infektionen eine große Zahl an Patienten, wodurch die Mortalität und die finanziellen Probleme erheblich ansteigen. Aufgrund der stetig steigenden Zahl von Antibiotikaresistenz ist ein besseres Verständnis der Mechanismen, die einem schweren negativen Verlauf unterliegen, wichtig. Die Rolle der einzelnen Nahrungsbestandteile wie Fructose in bakteriellen Infektionen ist weitgehend ungeklärt. Es gibt Hinweise aus humanen zell- bzw. tierexperimentellen Studien, dass Fructose ein möglicher Modulator der Immunantwort und Entzündung darstellt. Vor diesem Hintergrund war das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluss von Fructose auf die LTA-vermittelte Stimulation von humanen Monozyten sowie möglich beteiligte Mechanismen *in vitro* zu untersuchen. Dazu wurden ausdifferenzierte CaCo-2 Zellen im Co-Kultur mit humanen primären Monozyten mit LTA (10 µg/ml) ± 0-10 mM Fructose für 14 bzw. 24h behandelt. Im Rahmen von Zellkulturexperimente wurden die mRNA-Expression von Parametern des Fructose- und des ATP-Metabolismus wie GLUT5, P2RX7, CD39, sowie die Expression von TLR2 in humanen Monozyten in Co-Kultur mittels RT-qPCR gemessen. Außerdem wurde die mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokinen TNF-α & IL-1β, sowie die Freisetzung von IL-1β mittels ELISA gemessen. Die Exposition der Monozyten mit Fructose führte zu einer Veränderung der GLUT5 mRNA Expression. Die Ergebnisse der ATP-Konzentration in apikalen und basolateralen Kompartiment des Co-Kulturmodells, sowie der mRNA-Expression von P2RX7 und CD39, weisen darauf hin, dass möglicherweise auch die Metabolite der Fructose an der Modulation von GLUT5 mRNA Expression in Monozyten eine Rolle spielen können. Jedoch konnte dies in Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht vollständig geklärt werden. Wie erwartet führte die Exposition der Zellen gegenüber LTA zu einer Induktion der Expression von TNF-α und IL-1β in Monozyten. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass Fructose oder auch Metabolite das Immunantwort auf die LTA-Stimulation verstärken. Weiterführende Studien sind nötig, um den Einfluss der Fructose auf die LTA-vermittelte Stimulation sowie die möglich beteiligten molekularen Mechanismen besser verstehen und erklären zu können.

Summary

Worldwide, bacterial infections are one of the most important problems in global health. In developing countries, bacterial infections affect many patients, significantly increasing mortality and financial problems. Due to the ever-increasing incidence of antibiotic resistance, a better understanding of the mechanisms underlying severe adverse progression is important. The role of individual dietary components such as fructose in bacterial infections is largely unclear. There is evidence from human cell or animal studies that fructose is a potential modulator of immune response and inflammation. Based on this background, the present work aimed to investigate the influence of fructose on LTA-mediated stimulation of human monocytes, as well as possible mechanisms involved *in vitro*. For this purpose, differentiated CaCo-2 cells in co-culture with human primary monocytes were treated with LTA (10 µg/ml) ± 0-10 mM fructose for 14 or 24h. In cell culture experiments, the mRNA expression of fructose and ATP metabolism parameters such as GLUT5, P2RX7, and CD39, as well as the expression of TLR2 in human monocytes in co-culture were measured by RT-qPCR. In addition, the mRNA expression of proinflammatory cytokines TNF-α & IL-1β, as well as the release of IL-1β was measured by ELISA. Exposure of monocytes to fructose resulted in a change in GLUT5 mRNA expression. The results of ATP concentration in apical and basolateral compartments of the co-culture model and the mRNA expression of P2RX7 and CD39 indicated that metabolites of fructose may also play a role in modulating GLUT5 mRNA expression in monocytes. However, this could not be fully elucidated in the present work. As expected, exposure of cells to LTA resulted in the induction of TNF-α and IL-1β expression in monocytes. Moreover, the results show that fructose or even metabolites enhance the immune response to LTA stimulation. Further studies are needed to better understand and explain the effect of fructose on LTA-mediated stimulation and the possible molecular mechanisms involved.

Literaturverzeichnis

1. Abdelmalek, M. F., Lazo, M., Horska, A., Bonekamp, S., Lipkin, E. W., Balasubramanyam, A., Bantle, J. P., Johnson, R. J., Diehl, A. M., & Clark, J. M. (2012). Higher dietary fructose is associated with impaired hepatic adenosine triphosphate homeostasis in obese individuals with type 2 diabetes. *Hepatology*, 56(3), 952-960. <https://doi.org/10.1002/hep.25741>
2. Hahn, A., Ströhle, A., Wolters, M. (2015). Ernährung: Physiologische Grundlagen, Prävention, Therapie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart. 29-52.
3. Spruss, A., & Bergheim, I. (2009). Dietary fructose and intestinal barrier: potential risk factor in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem*, 20(9), 657-662. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.05.006>
4. Bray, G. A., Nielsen, S. J., & Popkin, B. M. (2004). Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr*, 79(4), 537-543. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.4.537>
5. Charrez, B., Qiao, L., & Hebbard, L. (2015). The role of fructose in metabolism and cancer. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 22(2), 79-89. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2015-0009>
6. Baumann, A., Brandt, A., & Bergheim, I. (2022). Fructose, a trigger of metabolic diseases?—a narrative review. *Exploration of Digestive Diseases*, 1(1), 51-71. <https://doi.org/10.37349/edd.2022.00005>
7. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. (2015). In *Guideline: Sugars Intake for Adults and Children*. World Health Organization
8. Trumbo, P., Schlicker, S., Yates, A. A., & Poos, M. (2002). Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. *J Am Diet Assoc*, 102(11), 1621-1630.
9. WHO. (2015) News Release. WHO calls on countries to reduce sugars intake among adults and children. World Health Organization. Internet: <https://www.who.int/news/item/04-03-2015-who-calls-on-countries-to-reduce-sugars-intake-among-adults-and-children#:~:text=A%20new%20WHO%20guideline%20recommends,would%20provide%20additional%20health%20benefits>. (Stand: 16.09.22)
10. Tappy, L., & Lê, K.-A. (2010). Metabolic Effects of Fructose and the Worldwide Increase in Obesity. *Physiological Reviews*, 90(1), 23-46. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2009>
11. Drozdowski, L. A., & Thomson, A. B. (2006). Intestinal sugar transport. *World J Gastroenterol*, 12(11), 1657-1670. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i11.1657>
12. Kellett, G. L., & Brot-Laroche, E. (2005). Apical GLUT2: a major pathway of intestinal sugar absorption. *Diabetes*, 54(10), 3056-3062. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.10.3056>
13. Pepin, A., Stanhope, K. L., & Imbeault, P. (2019). Are Fruit Juices Healthier Than Sugar-Sweetened Beverages? A Review. *Nutrients*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/nu11051006>

14. Douard, V., & Ferraris, R. P. (2008). Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295(2), E227-237.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.90245.2008>
15. Francey, C., Cros, J., Rosset, R., Cr   , C., Rey, V., Stefanoni, N., Schneider, P., Tappy, L., & Seyssel, K. (2019). The extra-splanchnic fructose escape after ingestion of a fructose-glucose drink: An exploratory study in healthy humans using a dual fructose isotope method. *Clin Nutr ESPEN*, 29, 125-132.
<https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2018.11.008>
16. Jang, C., Hui, S., Lu, W., Cowan, A. J., Morscher, R. J., Lee, G., Liu, W., Tesz, G. J., Birnbaum, M. J., & Rabinowitz, J. D. (2018). The Small Intestine Converts Dietary Fructose into Glucose and Organic Acids. *Cell Metab*, 27(2), 351-361.e353.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.016>
17. Fu, Y., Maianu, L., Melbert, B. R., & Garvey, W. T. (2004). Facilitative glucose transporter gene expression in human lymphocytes, monocytes, and macrophages: a role for GLUT isoforms 1, 3, and 5 in the immune response and foam cell formation. *Blood Cells Mol Dis*, 32(1), 182-190.
<https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2003.09.002>
18. Bieselski, H., Bischoff, S., Pirlich, M., Weimann, A. (2015). Ern  hrungsmedizin. Kapitel 5: Kohlenhydrate. Ed. 5., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 96-113
doi:10.1055/b-004-132260
19. Heinz, F., Lamprecht, W., & Kirsch, J. (1968). Enzymes of fructose metabolism in human liver. *The Journal of Clinical Investigation*, 47(8), 1826-1832.
<https://doi.org/10.1172/JCI105872>
20. Bieselski, H., Grimm, P., Nowitzki-Grimm, S. (2015) Taschenatlas Ernährung. Ed.6., überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 78-79
21. Johnson, R. J., Perez-Pozo, S. E., Sautin, Y. Y., Manitius, J., Sanchez-Lozada, L. G., Feig, D. I., Shafiu, M., Segal, M., Glassock, R. J., Shimada, M., Roncal, C., & Nakagawa, T. (2009). Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? *Endocr Rev*, 30(1), 96-116.
<https://doi.org/10.1210/er.2008-0033>
22. Jensen, T., Abdelmalek, M. F., Sullivan, S., Nadeau, K. J., Green, M., Roncal, C., Nakagawa, T., Kuwabara, M., Sato, Y., Kang, D. H., Tolan, D. R., Sanchez-Lozada, L. G., Rosen, H. R., Lanaspa, M. A., Diehl, A. M., & Johnson, R. J. (2018). Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*, 68(5), 1063-1075.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.01.019>
23. Jung, F., Staltner, R., Tahir, A., Baumann, A., Burger, K., Halilbasic, E., Hellerbrand, C., & Bergheim, I. (2022). Oral intake of xanthohumol attenuates lipoteichoic acid-induced inflammatory response in human PBMCs. *Eur J Nutr*.
<https://doi.org/10.1007/s00394-022-02964-2>
24. Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P t*, 40(4), 277-283.
25. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.); National Center for Emerging Zoonotic and Infectious Diseases (U.S.). Division of Healthcare Quality Promotion. Antibiotic Resistance Coordination and Strategy Unit. (2019). Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. [Report].
<https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82532>

26. Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., . . . Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
27. Frydrych, L. M., Bian, G., O'Lone, D. E., Ward, P. A., & Delano, M. J. (2018). Obesity and type 2 diabetes mellitus drive immune dysfunction, infection development, and sepsis mortality. *J Leukoc Biol*, 104(3), 525-534.
<https://doi.org/10.1002/jlb.5vmr0118-021rr>
28. Khan, H. A., Baig, F. K., & Mehboob, R. (2017). Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(5), 478-482.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.019>
29. WHO. (2011). Report on the Burden of Endemic Health Care-Associated Infection Worldwide. World Health Organization. Internet:
<https://www.who.int/publications/i/item/report-on-the-burden-of-endemic-health-care-associated-infection-worldwide> (Stand: 22.09.2022)
30. Facciola, A., Pellicanò, G. F., Visalli, G., Paolucci, I. A., Venanzi Rullo, E., Ceccarelli, M., D'Aleo, F., Di Pietro, A., Squeri, R., Nunnari, G., & La Fauci, V. (2019). The role of the hospital environment in the healthcare-associated infections: a general review of the literature. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 23(3), 1266-1278.
https://doi.org/10.26355/eurev_201902_17020
31. Woodford, N., & Livermore, D. M. (2009). Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. *J Infect*, 59 Suppl 1, S4-16.
[https://doi.org/10.1016/s0163-4453\(09\)60003-7](https://doi.org/10.1016/s0163-4453(09)60003-7)
32. Kayser, F.H., Böttger, E.C., Haller, O., Deplazes, P., Roers, A. (2014) Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie. Kapitel 4: Allgemeine Bakteriologie. Ed. 13., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 190-264.
doi:10.1055/b-002-98020
33. Poeggel, G. (2013). Kurzlehrbuch Biologie. Kapitel 4.3. Bakterien. Ed. 3., überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 138-142.
doi:10.1055/b-002-37735
34. Megrian, D., Taib, N., Witwinowski, J., Beloin, C., & Gribaldo, S. (2020). One or two membranes? Diderm Firmicutes challenge the Gram-positive/Gram-negative divide. *Mol Microbiol*, 113(3), 659-671.
<https://doi.org/10.1111/mmi.14469>
35. Weidenmaier, C., & Peschel, A. (2008). Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nat Rev Microbiol*, 6(4), 276-287.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1861>
36. Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(5), a000414.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
37. Neuhaus, F. C., & Baddiley, J. (2003). A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67(4), 686-723 <https://doi.org/10.1128/mmbr.67.4.686-723.2003>

38. Mukherjee, S., Karmakar, S., & Babu, S. P. S. (2016). TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 20(2), 193-204.
<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.10.011>
39. O'Mahony, D. S., Pham, U., Iyer, R., Hawn, T. R., & Liles, W. C. (2008). Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human Toll-like receptors in primary neutrophils, monocytes, and macrophages. *Int J Med Sci*, 5(1), 1-8.
<https://doi.org/10.7150/ijms.5.1>
40. Park, B. S., & Lee, J. O. (2013). Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med*, 45(12), e66.
<https://doi.org/10.1038/emm.2013.97>
41. Schröder, N. W., Morath, S., Alexander, C., Hamann, L., Hartung, T., Zähringer, U., Göbel, U. B., Weber, J. R., & Schumann, R. R. (2003). Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem*, 278(18), 15587-15594.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M212829200>
42. Kwak, M. S., Lim, M., Lee, Y. J., Lee, H. S., Kim, Y. H., Youn, J. H., Choi, J. E., & Shin, J. S. (2015). HMGB1 Binds to Lipoteichoic Acid and Enhances TNF- α and IL-6 Production through HMGB1-Mediated Transfer of Lipoteichoic Acid to CD14 and TLR2. *J Innate Immun*, 7(4), 405-416.
<https://doi.org/10.1159/000369972>
43. Zivkovic, A., Sharif, O., Stich, K., Doninger, B., Biaggio, M., Colinge, J., Bilban, M., Mesteri, I., Hazemi, P., Lemmens-Gruber, R., & Knapp, S. (2011). TLR 2 and CD14 mediate innate immunity and lung inflammation to staphylococcal Panton-Valentine leukocidin in vivo. *J Immunol*, 186(3), 1608-1617.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001665>
44. Ellingsen, E., Morath, S., Flo, T., Schromm, A., Hartung, T., Thiernemann, C., Espevik, T., Golenbock, D., Foster, D., Solberg, R., Aasen, A., & Wang, J. (2002). Induction of cytokine production in human T cells and monocytes by highly purified lipoteichoic acid: involvement of Toll-like receptors and CD14. *Med Sci Monit*, 8(5), Br149-156.
45. Øverland, G., Morath, S., Yndestad, A., Hartung, T., Thiernemann, C., Foster, S. J., Smedsrød, B., Mathisen, Ø., Aukrust, P., Aasen, A. O., & Wang, J. E. (2003). Lipoteichoic acid is a potent inducer of cytokine production in rat and human Kupffer cells in vitro. *Surg Infect (Larchmt)*, 4(2), 181-191.
<https://doi.org/10.1089/109629603766956979>
46. Della Corte, K. W., Perrar, I., Penczynski, K. J., Schwingshackl, L., Herder, C., & Buyken, A. E. (2018). Effect of Dietary Sugar Intake on Biomarkers of Subclinical Inflammation: A Systematic Review and Meta-Analysis of Intervention Studies. *Nutrients*, 10(5).
<https://doi.org/10.3390/nu10050606>
47. Jaiswal, N., Agrawal, S., & Agrawal, A. (2019). High fructose-induced metabolic changes enhance inflammation in human dendritic cells. *Clin Exp Immunol*, 197(2), 237-249.
<https://doi.org/10.1111/cei.13299>
48. Lin, P., Ren, Q., Wang, Q., & Wu, J. (2020). Carotenoids Inhibit Fructose-Induced Inflammatory Response in Human Endothelial Cells and Monocytes. *Mediators Inflamm*, 2020, 5373562.
<https://doi.org/10.1155/2020/5373562>

49. Jones, N., Blagih, J., Zani, F., Rees, A., Hill, D. G., Jenkins, B. J., Bull, C. J., Moreira, D., Bantan, A. I. M., Cronin, J. G., Avancini, D., Jones, G. W., Finlay, D. K., Vousden, K. H., Vincent, E. E., & Thornton, C. A. (2021). Fructose reprogrammes glutamine-dependent oxidative metabolism to support LPS-induced inflammation. *Nat Commun*, 12(1), 1209. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21461-4>
50. Gross, L. S., Li, L., Ford, E. S., & Liu, S. (2004). Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment. *Am J Clin Nutr*, 79(5), 774-779. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.774>
51. Olofsson, C., Eriksson, M., Bragfors Helin, A. C., Anderstam, B., Orsini, N., Stenvinkel, P., & Rajamand Ekberg, N. (2021). Effects of Acute Fructose Loading on Markers of Inflammation-A Pilot Study. *Nutrients*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/nu13093110>
52. Imamura, F., O'Connor, L., Ye, Z., Mursu, J., Hayashino, Y., Bhupathiraju, S. N., & Forouhi, N. G. (2015). Consumption of sugar sweetened beverages, artificially sweetened beverages, and fruit juice and incidence of type 2 diabetes: systematic review, meta-analysis, and estimation of population attributable fraction. *Bmj*, 351, h3576. <https://doi.org/10.1136/bmj.h3576>
53. Gersch, M. S., Mu, W., Cirillo, P., Reungjui, S., Zhang, L., Roncal, C., Sautin, Y. Y., Johnson, R. J., & Nakagawa, T. (2007). Fructose, but not dextrose, accelerates the progression of chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, 293(4), F1256-1261. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00181.2007>
54. Fogh, J., Wright, W. C., & Loveless, J. D. (1977). Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst*, 58(2), 209-214. <https://doi.org/10.1093/jnci/58.2.209>
55. Caplugs® Medical. Evergreen Labware Products. Internet: <https://www.evergreensci.com/tc-12-well-plates> (Stand: 09.09.22)
56. © 2022 Thermo Fisher Scientific Inc. Internet: <https://www.fishersci.pt/shop/products/thincert-tissue-culture-inserts-5/10358623> (Stand: 09.09.22)
57. In K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, & H. Wichers (Eds.). (2015). *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Springer. 103-111. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4>
58. Sarstedt. TC-Inserts. Broschüre. Internet: https://www.sarstedt.com/fileadmin/user_upload/99_Broschueren/Broschueren_neu_03.2016/745_TC-Inserts_D_0416.pdf (Stand: 09.09.22)
59. Engle, M. J., Goetz, G. S., & Alpers, D. H. (1998). Caco-2 cells express a combination of colonocyte and enterocyte phenotypes. *J Cell Physiol*, 174(3), 362-369.
60. Abnova. Fructose Assay Kit Protocol. KA1688. Version 04. Internet: http://www.abnova.com/products/products_detail.asp?catalog_id=KA1668 (Stand: 09.09.22)
61. Rio, D. C., Ares, M., Jr., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. (2010). Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc*, 2010(6). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5439>

62. Adams, G. (2020). A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*, 42(3), 48-53.
<https://doi.org/10.1042/BIO20200034>
63. Gadkar, V., & Filion, M. (2013). Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction for Tracking Microbial Gene Expression in Complex Environmental Matrices. *Current issues in molecular biology*, 15, 45-58.
64. Josefsen, K., & Lee, Y. C. (2011). Validation of RNAi by real time PCR. *Methods Mol Biol*, 703, 205-217.
https://doi.org/10.1007/978-1-59745-248-9_14
65. Goidin, D., Mamessier, A., Staquet, M. J., Schmitt, D., & Berthier-Vergnes, O. (2001). Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal Biochem*, 295(1), 17-21.
<https://doi.org/10.1006/abio.2001.5171>
66. Lekan Deprez, R. H., Fijnvandraat, A. C., Ruijter, J. M., & Moorman, A. F. (2002). Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Anal Biochem*, 307(1), 63-69.
[https://doi.org/10.1016/s0003-2697\(02\)00021-0](https://doi.org/10.1016/s0003-2697(02)00021-0)
67. Wine, Y., Horton, A. P., Ippolito, G. C., & Georgiou, G. (2015). Serology in the 21st century: the molecular-level analysis of the serum antibody repertoire. *Curr Opin Immunol*, 35, 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.06.009>
68. Human IL-1 β /IL-1F2 DuoSet[®] ELISA, R&D Systems, Product Datasheet. Internet:
<https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/dy201.pdf?v=20220918& ga=2.131448271.1374852088.1663527485-998981364.1662473189& gac=1.118824059.1663527486.Cj0KCQjw39uYBhCLARIsAD SzMS5RJucqY9Y xa8g-39zZuwZOwKyfMEGWuJxKU5L4CVqv0zJD8mo7oaAue0EALw wcB>
Stand: (10.09.22)
69. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). (1976). *Bull World Health Organ*, 54(2), 129-139.
70. Promega.CellTiter-Glo[®] 2.0 Assay Technical Manual. Internet:
https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter_glo-2_0-assay/?catNum=G9241#protocols (Stand: 10.09.22)
71. Tappy, L. (2018). Fructose metabolism and noncommunicable diseases: recent findings and new research perspectives. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 21(3), 214-222.
<https://doi.org/10.1097/mco.0000000000000460>
72. Di Virgilio, F., & Adinolfi, E. (2017). Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene*, 36(3), 293-303.
<https://doi.org/10.1038/onc.2016.206>
73. Surprenant, A., & North, R. A. (2009). Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu Rev Physiol*, 71, 333-359.
<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100630>
74. Rivas-Yáñez, E., Barrera-Avalos, C., Parra-Tello, B., Briceño, P., Roseblatt, M. V., Saavedra-Almarza, J., Roseblatt, M., Acuña-Castillo, C., Bono, M. R., & Sauma, D. (2020). P2X7 Receptor at the Crossroads of T Cell Fate. *Int J Mol Sci*, 21(14).
<https://doi.org/10.3390/ijms21144937>

75. Di Virgilio, F. (2012). Purines, purinergic receptors, and cancer. *Cancer Res*, 72(21), 5441-5447.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-12-1600>
76. Paustian, C., Taylor, P., Johnson, T., Xu, M., Ramirez, N., Rosenthal, K. S., Shu, S., Cohen, P. A., Czerniecki, B. J., & Koski, G. K. (2013). Extracellular ATP and Toll-like receptor 2 agonists trigger in human monocytes an activation program that favors T helper 17. *PLoS One*, 8(1), e54804.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054804>
77. Gudipaty, L., Munetz, J., Verhoef, P. A., & Dubyak, G. R. (2003). Essential role for Ca²⁺ in regulation of IL-1 β secretion by P2X₇ nucleotide receptor in monocytes, macrophages, and HEK-293 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285(2), C286-299.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00070.2003>
78. Rossol, M., Pierer, M., Raulien, N., Quandt, D., Meusch, U., Rothe, K., Schubert, K., Schöneberg, T., Schaefer, M., Krügel, U., Smajilovic, S., Bräuner-Osborne, H., Baerwald, C., & Wagner, U. (2012). Extracellular Ca²⁺ is a danger signal activating the NLRP3 inflammasome through G protein-coupled calcium sensing receptors. *Nat Commun*, 3, 1329.
<https://doi.org/10.1038/ncomms2339>
79. Jiang, L. H. (2009). Inhibition of P2X₇ receptors by divalent cations: old action and new insight. *Eur Biophys J*, 38(3), 339-346.
<https://doi.org/10.1007/s00249-008-0315-y>
80. Michel, A. D., Chessell, I. P., & Humphrey, P. P. (1999). Ionic effects on human recombinant P2X₇ receptor function. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 359(2), 102-109.
<https://doi.org/10.1007/pl00005328>
81. Virginio, C., Church, D., North, R. A., & Surprenant, A. (1997). Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X₇ receptor. *Neuropharmacology*, 36(9), 1285-1294. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(97\)00141-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0028-3908(97)00141-X)

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Ausführungen, die fremden Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, sind kenntlich gemacht.

Ich erkläre weiterhin, dass die vorliegende Arbeit nur bei der Universität Wien als Prüfarbeit eingereicht wurde.