



MASTERARBEIT | MASTER'S THESIS

Titel | Title

Der Effekt von Fructose auf die altersassoziierten
Veränderungen der intestinalen Permeabilität im Mausmodell

verfasst von | submitted by
Alessio Colucci BSc

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

Wien | Vienna, 2024

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. Dipl. oec. troph. Dr. Ina Bergheim
Privatdoz.

Danksagung

Vorab möchte ich Frau Univ.-Prof. Dipl. oec. troph. Dr. Ina Bergheim meinen herzlichen Dank aussprechen. Vielen Dank, dass Sie mich in Ihre Arbeitsgruppe aufgenommen, mir Vertrauen geschenkt und die Betreuung meiner Masterarbeit übernommen haben. Ich bin Ihnen sehr dankbar für die hilfreichen und lehrreichen Einblicke im Labor, die lösungsorientierten Vorschläge zur Bearbeitung der Ergebnisse, die interessanten und aufschlussreichen Diskussionen sowie die ausgezeichnete und schnelle Kommunikation im schriftlichen Austausch.

Mein Dank gilt auch Dr. Anja Baumann. Vielen Dank für die herausragende Betreuung im Labor, das Beantworten unzähliger Fragen, die Zusammenarbeit und die Energie, die Sie in die Entstehung dieser Arbeit eingebracht haben. Ich habe das sehr geschätzt. Ebenso möchte ich den MitarbeiterInnen der Arbeitsgruppe danken, die durch ihre große Hilfsbereitschaft Unklarheiten beseitigen und Laborabläufe erklären konnten.

Ein besonderer Dank geht an meine Mitstudierenden Sanna, Nicole, Felizitas, Amelie, Elisa und Simon. Danke für die großartige Zeit im Labor, die gegenseitige Unterstützung, die gemeinsamen Kaffeepausen und den starken Zusammenhalt. Ohne euch wäre es nur halb so schön gewesen. Herzlichen Dank!

Mein tiefster Dank gilt meiner Familie, die mich während meines gesamten Studiums und in meinem Leben immer unterstützt, an mich geglaubt, gefördert und mich bei all meinen Entscheidungen motiviert hat. Grazie mille!

Ebenso danke ich allen FreundInnen sowie den Menschen, die ich während des Studiums kennenlernen durfte, für ihre Unterstützung, Motivation und die gemeinsam verbrachte Zeit in Wien. Ein besonderer Dank gilt der „Mausi“-Gruppe, Camille und Li – ihr habt mir das Studium und das Leben in Wien wahrlich versüßt. Villmools Merci!

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1 Altern – Demografische Trends und Altersforschung zur Prävention einer dynamischen Abwärtsspirale	1
1.1.1 Definition des Begriffs „Altern“	1
1.1.2 Die demografische Entwicklung der Bevölkerung in Österreich	1
1.1.3 Die Altersforschung zur Prävention eines zeitbedingten Funktionsverlustes	2
1.2 Fructose – Biochemische Eigenschaften, globale Verbreitung und Risiken des Überkonsums	4
1.2.1 Die biochemischen Eigenschaften	4
1.2.2 Der Stoffwechsel der Fructose	4
1.2.3 Einsatz in der Lebensmittelindustrie	6
1.2.4 Globale Fructoseaufnahme – Ein Überblick	7
1.2.5 Die Problematik des Überkonsums von Fructose	8
1.3 Die Darmbarriere und die altersassoziierten Veränderungen	9
1.3.1 Der Aufbau der Darmbarriere	9
1.3.2 Die altersassoziierte Veränderung der Darmbarriere	11
1.3.3 Der Einfluss der Fructose auf die altersinduzierte Veränderung des Darmes	12
1.4 Fragestellung	12
2. Material- und Reagenzienübersicht	13
2.1 Allgemeine Labormaterialien	13
2.2 Die Versuchstierhaltung	15
2.3 Die histologische Gewebepreparation – Paraffineinbettung und Anfertigung von Dünndarmschnitte	16
2.4 Die Gesamtproteinbestimmung nach Bradford mit BioRad-Farbreagenz	17

2.5 Der Semi-Dry Western Blot – Die Bestimmung von p16 und Albumin in Plasmaproben von C57BL/6J-Mäusen	17
2.6 Die D-Xylose-Permeationsmessung im ex vivo Everted-Sac-Modell	20
2.7 Die Nitrit-Messung im oberen Dünndarm nach Griess	22
2.8 Die Zonula Occludens-1-Proteinfärbung im oberen Dünndarm	23
2.9 Softwares	25
3. Methodik	26
3.1 Das Versuchsdesign	26
3.2 Die histologische Gewebepreparation – Paraffineinbettung und Anfertigung von Dünndarmschnitte	27
3.3 Die Gesamtproteinbestimmung nach Bradford mit BioRad-Farbreagenz	28
3.4 Der Semi-Dry Western Blot – Die Bestimmung von p16 und Albumin im Plasma	29
3.5 Die Bestimmung der intestinalen Permeabilität mittels D-Xylose-Permeationsmessung im ex vivo Everted-Sac-Modell	34
3.6 Die Nitrit-Messung im oberen Dünndarm nach Griess	35
3.7 Die Zonula Occludens-1-Proteinfärbung im Duodenum	37
3.8 Die statistische Auswertung	40
4. Ergebnisse	41
4.1 Der Einfluss einer Fructoseanreicherung im Trinkwasser auf die Marker der Zellalterung	41
4.2 Der Einfluss einer Fructoseanreicherung im Trinkwasser auf die altersbedingten Veränderungen der Darmbarriere und Marker der NO-Homöostase	42
5. Diskussion	45
5.1 Einfluss von Fructose auf die Zellalterung: Altersabhängige Effekte und potenzielle Mechanismen	45
5.2 Altersbedingte Veränderungen der Dünndarmbarriere: Die Rolle von Tight Junctions und der potenzielle Einfluss von Fructose	46
5.3 Fructose und die altersbedingte Regulierung der NO-Homöostase: Auswirkungen auf die Darmbarrierefunktion	48

6. Fazit	51
7. Zusammenfassung	52
8. Summary	53
9. Literaturverzeichnis	54
10. Anhang	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Überblick über die Fructoseaufnahme älterer StudienteilnehmerInnen in ausgewählten Ländern	7
Tabelle 2	Verfahren zum Einbetten von Gewebe mit Paraffin	27
Tabelle 3	Übersicht der Verdünnungsfaktoren der Proben & Puffer nach Methode und Farbreagenz	28
Tabelle 4	Herstellung der BSA-Standardreihe für die Proteinbestimmung	29
Tabelle 5	Reagenzien-Liste für die Herstellung von 10 %- und 12 %-Trenngel und 5 %-Sammelgel	30
Tabelle 6	Vorbereitung des Blotting-Sandwichs	32
Tabelle 7	Inkubationsschritte	34
Tabelle 8	Herstellung der Nitrit-Standardreihe	37
Tabelle 9	Aufbereitungsschritte für Gewebeschnitte	38
Tabelle 10	Übersicht der Vorbereitung für die Inkubation mit dem Sekundärantikörper	39
Tabelle 11	Gegenfärbung mit Hämatoxylin	40
Tabelle 12	Fixierungsschritte	40
Tabelle 13	Körpercharakteristika der Mäuse nach dem Versuch	41
Anhang		
Tabelle 14	Herstellung der Puffer und Lösungen für den Semi-Dry Western Blot	73
Tabelle 15	Herstellung von 10x PBS und PBS	74

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Bevölkerungspyramiden Österreichs nach Geschlecht für die Jahre 2023 und 2050	2
Abbildung 2	Valenzstrichformel der Monosaccharide Glucose und Fructose	4
Abbildung 3	Aufnahme und der Stoffwechsel von Glucose (G) und Fructose (F) im Enterozyten	5
Abbildung 4	Schematische Darstellung der intestinalen Dünndarmbarriere	10
Abbildung 5	Schematische Darstellung des Aufbaus des Blotting-Sandwichs und der Ablauf des Blottings	32
Abbildung 6	Reaktionsgleichung der D-Xylose-Permeationsmessung	35
Abbildung 7	Diazotierungsreaktion im Griess-Assay	36
Abbildung 8	Vereinfachte Darstellung einer Antigen-Antikörper-Komplex-Detektion	37
Abbildung 9	Der Einfluss einer Fructoseanreicherung im Trinkwasser auf die Parameter der Zellalterung	42
Abbildung 10	Der Einfluss einer Fructoseanreicherung im Trinkwasser auf die Parameter der Dünndarmbarriere	43
Anhang		
Abbildung 11	Die repräsentativen Bilder der Western Blots für die Bestimmung der p16- und Albuminkonzentration im Pfortaderplasma	75

Abkürzungsverzeichnis

3,3'-Diaminobenzidin	DAB
Abbildung	Abb.
Adenosintriphosphat	ATP
Ammoniumperoxodisulfat	APS
Antikörper	AK
atypische Proteinkinase C	aPKC
beziehungsweise	bzw.
Bovines Serumalbumin	BSA
Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft und Forschung	BMBWF
<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>C. elegans</i>
Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	CED
Cyclinabhängige Kinase Inhibitor 2A	p16 (CDKN2A)
Destilliertes Wasser	dH ₂ O
Dietary Approach to Stop Hypertension	DASH
Dihydroxyaceton-Phosphat	DHAP
Disability-adjusted life years	DALY
Dithiothreitol	DTT
Doppelt destilliertes Wasser	ddH ₂ O
Dulbecco's Modified Eagle Medium	DMEM
Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung	DPBS
et cetera	etc.
Ethanol	EtOH
Fructose-1-Phosphat	F-1-P
Gastrointestinaltrakt	GIT
Glucosetransporter 2	GLUT2
Glucosetransporter 5	GLUT5
Glycerin-3-Phosphat	G3P
Glycerinaldehyd	GA
High-Fructose-Corn-Syrup	HFCS
Horseradish peroxidase	HRP
Hypoxieinduzierter Faktor 1 α	HIF1 α
Immunglobulin G	IgG
Induzierte Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase	iNOS

Jahr(e)	J.
Körpergewicht	KG
Magermilchpulver	MMP
Metabolisch-assozierte Fettlebererkrankung	MAFLD
Mittelwert	MW
N-(1-Naphthyl)ethylendiamin	NED
N, N, N', N'-Tetramethyldiamin	TEMED
National Health and Nutrition Examination Survey	NHANES
Natriumdodecylsulfat	SDS
Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	SDS-PAGE
Natriumhydroxid	NaOH
Phosphatgepufferte Salzsäure	PBS
Polyvinylidendifluorid	PVDF
Protein-Phosphatase 2 A	PP2A
Pyruvat-Kinase M 2	PKM2
Salzsäure	HCl
Spezifisch pathogenfrei	SPF
Standardfehler des Mittelwertes	SEM
Stickstoffmonoxid	NO
Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase	NOS
Sugar sweetened beverages (zuckergesüßte Getränke)	SSB
Tabelle	Tab.
Tight Junction	TJ
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Tris
Trisgepufferte Salzlösung mit Tween® 20	TBST
U.S. Department of Agriculture (Landwirtschaftsministerium der Vereinigten Staaten)	USDA
Vereinigte Staaten	USA
United Nations (Vereinte Nationen)	UN
World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)	WHO
Zonula Occludens-1	ZO-1
Zum Beispiel	z. B.

1. Einleitung

1.1 Altern – Demografische Trends und Altersforschung zur Prävention einer dynamischen Abwärtsspirale

1.1.1 Definition des Begriffs „Altern“

Es gibt unterschiedliche Definitionen des Alterns, die nach Fachbereichen unterschieden werden. In Österreich gilt eine Person als alt, wenn sie das Regelpensionsalter (Bundesarbeiterkammer, 2024) erreicht hat (60 Jahre für Frauen und 65 Jahre für Männer). Nach den Vereinten Nationen (UN) gilt eine Person als alt, wenn sie das Alter von über 60 Jahre erreicht hat. (United Nations, 2017) Evolutionsbiologisch ist Altern als „eine unvermeidliche fortschreitende Verschlechterung der physiologischen Funktionen mit zunehmendem Alter, die demografisch durch einen altersabhängigen Anstieg der Sterblichkeit und einen Rückgang der Fruchtbarkeit gekennzeichnet ist“, definiert. (Bronikowski & Flatt, 2010) Diese Definition wurde für den Menschen spezifisch erweitert, sodass Altern als eine „zeitbedingte Funktionsstörung“ bezeichnet werden kann. Konkret bedeutet dies, dass Menschen im Laufe der Zeit und aufgrund verschiedener Faktoren nicht vollständig reparable Schäden erleiden, die zu Degenerationen auf allen physiologischen sowie sozialen Ebenen und damit zu einem Funktionsverlust des Menschen führen. (Kyriazis, M., 2020; Leitão et al., 2022)

1.1.2 Die demografische Entwicklung der Bevölkerung in Österreich

Im Jahr 2023 waren 20 % der österreichischen Bevölkerung ≥ 65 Jahre alt (Abbildung (Abb.) 1). Die durchschnittliche Lebenserwartung betrug 2023 für Frauen geschätzt 83,9 Jahre und für Männer 79,1 Jahre. (STATISTIK AUSTRIA, 2024b) Prognosen zufolge soll der Anteil an über 65-Jährigen in Österreich bis 2050 auf ~ 28 % steigen. (STATISTIK AUSTRIA, 2024a) Doch die geschätzte „gesunde Lebensspanne“ der Österreicher aller Geschlechter liegt bei durchschnittlich 64 Jahren (Stand 2019). Man geht davon aus, dass ältere Menschen rund 15 bis 20 Jahre ihres Lebens in einer subjektiv mittelmäßigen oder schlechten gesundheitlichen Verfassung verbringen. (STATISTIK AUSTRIA, 2020) Diese „verlorenen“ gesunden Jahre werden in der Statistik als DALYs (disability-adjusted life years) bezeichnet, ein Quantifizierungsmaß der Krankheitsbelastung. Diese drücken

die verlorenen Jahre aufgrund vorzeitigen Todes, die gelebten Jahre mit Krankheit oder Behinderung bis hin zur Genesung oder des Todes aus. (Oxford University Press, 1993)

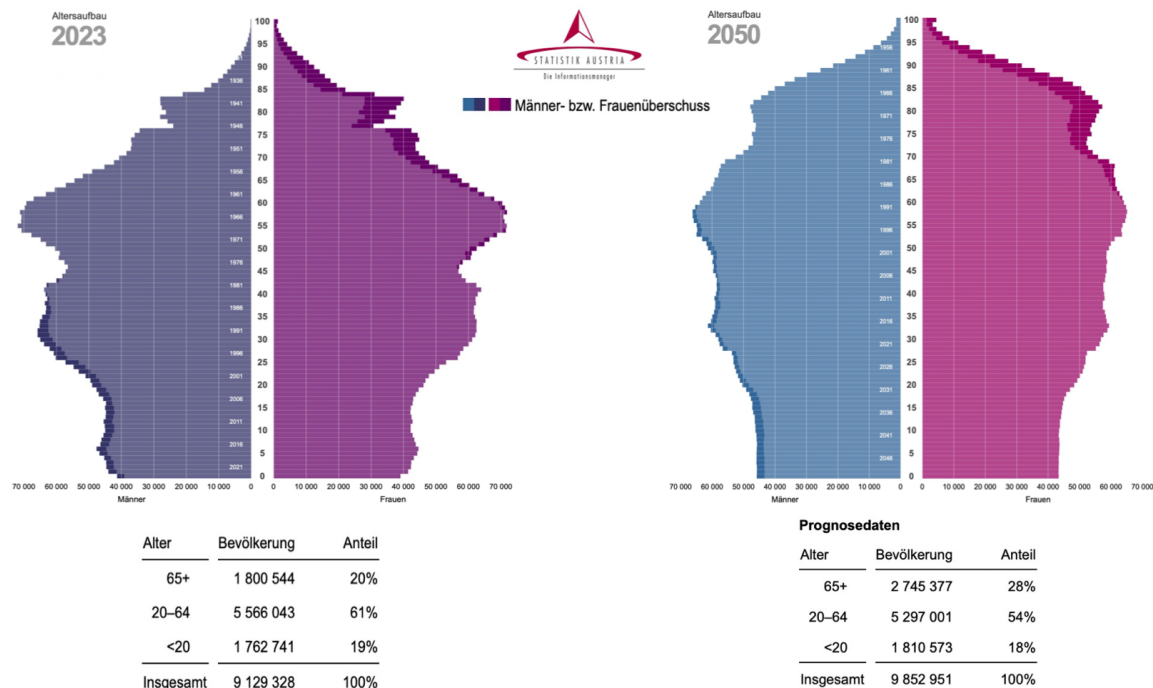


Abbildung 1: Bevölkerungspyramiden Österreichs nach Geschlecht für die Jahre 2023 und 2050. Im Jahr 2023 (links) lag der Anteil der über 65-Jährigen bei 20 % der Gesamtbevölkerung. Die Prognose für 2050 (rechts) zeigt einen Anstieg der österreichischen Bevölkerung, wobei der Anteil der über 65-Jährigen auf 28 % steigen wird. Die Abbildung wurde nach (STATISTIK AUSTRIA, 2023) modifiziert.

1.1.3 Die Altersforschung zur Prävention eines zeitbedingten Funktionsverlustes

Das Wohlbefinden der älteren Bevölkerung ist für Regierungen und deren Gesundheitsförderungen eine große Herausforderung. (Yeung et al., 2021) Ähnlich wie bei der Altersforschung liegt der Fokus hier nicht mehr auf klassischer Altersprävention oder Langlebigkeit, sondern vielmehr auf Strategien zur Verlängerung und Erhaltung der gesunden Lebensjahre. (Stuck et al., 1993; Yeung et al., 2021) Daher sind für ein „gesundes“ Leben der Erhalt der Kognition, Lokomotion, Physiologie und Vitalität oberste Priorität. (Beard et al., 2016) Somit befasst sich dieses Modell eher mit der Optimierung der Fähigkeiten des Einzelnen während des Alterns. (World Health Organization, 2017).

Nichtsdestotrotz ist der Alterungsprozess sehr individuell und lässt sich nicht als einheitliches Muster zusammenfassen. Folgende metabolische Störungen beziehungsweise (bzw.) Krankheiten werden in Studien häufig mit „Altern“ assoziiert:

Hyperglykämie, Hypercholesterinämie, Hypertonie, Diabetes mellitus Typ 2, Sarkopenie, kardiovaskuläre Erkrankungen, Krebs et cetera (etc.). (Freid et al., 2012; Kyriazis, M., 2020; Partridge et al., 2018; Singh et al., 2012)

Es handelt sich dabei meistens um Krankheiten, die mit der Ernährung des Menschen bzw. mit seinem Lebensstil in Verbindung gebracht werden können. Allerdings wird die Ernährung der Menschen meist im hohen Alter beeinflusst, weil Geruchs- und Geschmacksknospen abnehmen und abgebaut werden (Boyce & Shone, 2006), Kau- und Schluckstörungen (Britton & McLaughlin, 2013) zunehmen und die Hunger-Sättigungsregulation beeinträchtigt ist. (Johnson et al., 2020) All diese Faktoren können den Ernährungsstatus beeinflussen und eine Malnutrition begünstigen. (Johnson et al., 2020)

Neben physischer Aktivität gelten die Ernährungsgewohnheiten zu dem wichtigsten modifizierbaren Lebensstilfaktor für die Prävention von altersbedingten und/oder metabolischen Erkrankungen und zum Erhalt eines guten Gesundheitszustandes im Alter. (Kieffe-De Jong et al., 2014) In der Regel werden im Zusammenhang mit der Prävention von degenerativen Veränderungen eher Ernährungsmuster als einzelne Nährstoffe, aber auch Krankheiten im Alter diskutiert. (Jacques & Tucker, 2001) Die mediterrane Diät, die „Dietary Approach to Stop Hypertension (DASH)“-Diät oder die „Okinawan Diet“ haben sich als wirkungsvoll gegen die Verkürzung der Telomere erwiesen (Boccardi et al., 2013), reduzieren das Risiko für kardiometabolische Erkrankungen (Khalatbari-Soltani et al., 2020), verbessern die Blutfettwerte (Neth et al., 2020) oder fördern den Erhalt der Psyche und Kognition (Chou et al., 2019) im Alter. (Leitão et al., 2022) Obwohl das Zusammenspiel der Nährstoffe in der Ernährung größere Bedeutung gewonnen hat, gilt es dennoch zu untersuchen, wie sich einzelne Nährstoffe auf den älteren Menschen auswirken können. (Yeung et al., 2021)

1.2 Fructose – Biochemische Eigenschaften, globale Verbreitung und Risiken des Überkonsums

1.2.1 Die biochemischen Eigenschaften

Fructose wie auch Glucose gehören zu den wichtigsten Vertretern der Monosaccharide. Diese unterscheiden sich nicht anhand der chemischen Summenformel $C_6H_{12}O_6$, sondern anhand der Position der Carbonylgruppe innerhalb bzw. am Ende der Kette (Abb. 2). Fructose wird der Gruppe der Ketohexosen zugeteilt, währenddessen Glucose den Aldohexosen zugeordnet wird. (Febbraio & Karin, 2021)

Die Monosaccharide sind universell in der Nahrung und Natur vertreten, sei es als Disaccharide, wie Lactose, Maltose oder Saccharose oder als Polymer wie Stärke. Zusammen bilden sie die wichtigsten Grundsteine der Kohlenhydrate, die sowohl in der Natur als auch im Stoffwechsel als Energieträger dienen. (Cummings & Stephen, 2007)

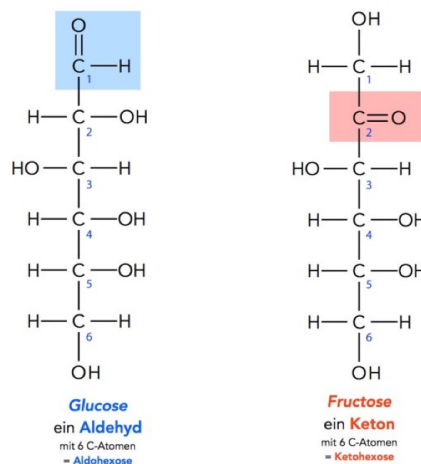


Abbildung 2: Valenzstrichformeln der Monosaccharide Glucose und Fructose. Obwohl die beiden Hexosen Glucose (links) und Fructose (rechts) dieselbe Summenformel besitzen, unterscheiden sich ihre Valenzstrichformeln: Glucose trägt am C₁-Atom der Kette eine Aldehydgruppe und wird daher als Aldohexose bezeichnet, während Fructose am C₂-Atom eine Ketogruppe aufweist und als Ketohexose gilt. Die Abbildung basiert auf (Helmich, U., 2021) und wurde nach (Febbraio & Karin, 2021) modifiziert.

1.2.2 Der Stoffwechsel der Fructose

Obwohl die Monosaccharide sich in der Struktur nicht deutlich unterscheiden, werden sie vom Menschen unterschiedlich aufgenommen und metabolisiert. Näheres zum Glucosestoffwechsel kann der Abb. 3 entnommen werden. Fructose wird im Dünndarm

an der apikalen Membran energieunabhängig und entlang eines Konzentrationsgradienten über den Glucosetransporter 5 (GLUT5) in die Enterozyten aufgenommen. (Herman & Birnbaum, 2021) Die Kethexokinase (auch Fructokinase) (Geidl-Flueck & Gerber, 2017) phosphoryliert unter Adenosintriphosphat (ATP)-Verbrauch Fructose zu Fructose-1-Phosphat (F-1-P). F-1-P wird über die Aldolase B zu Dihydroxyaceton-Phosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd (GA) metabolisiert.

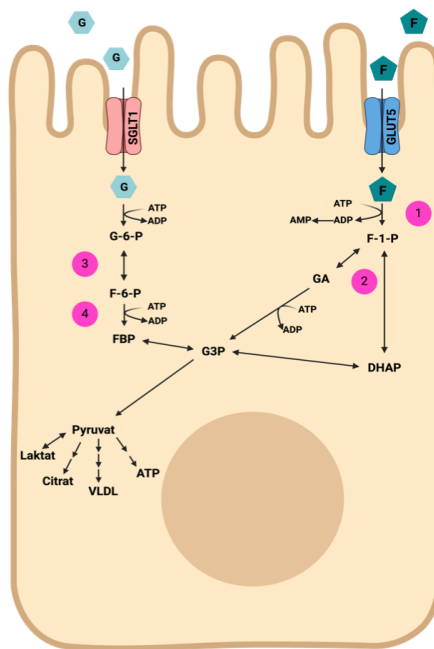


Abbildung 3: Aufnahme und Stoffwechsel von Glucose (G) und Fructose (F) im Enterozyten. An der apikalen Membran des Enterozyten gelangt Fructose über den Glucosetransporter 5 (GLUT5) in die Zelle, während Glucose über den natriumabhängigen Glucosetransporter 1 (SGLT1) aufgenommen wird. Fructose wird anschließend (1) durch die Kethexokinase (KHK) unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) zu Fructose-1-Phosphat (F-1-P) phosphoryliert und dann (2) durch die Aldolase B zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd (GA) metabolisiert. Letzteres wird durch die Triokinase unter ATP-Verbrauch zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat (G3P) phosphoryliert, das als Vorläufer für die Pyruvat-Synthese dient und ein Baustein für die Synthese von Laktat, Citrat, ATP oder "Very Low-Density Lipoprotein" (VLDL) ist. Glucose wird hingegen durch eine Hexokinase unter ATP-Verbrauch zu Glucose-6-Phosphat (G-6-P) phosphoryliert und (3) durch die Glucose-6-Phosphat-Isomerase zu Fructose-6-Phosphat (F-6-P) umgewandelt. F-6-P wird weiter (4) durch die Phosphofructokinase 1 unter ATP-Verbrauch zu Fructose-1,6-Bisphosphat (FBP) phosphoryliert. ADP – Adenosindiphosphat; AMP – Adenosinmonophosphat. Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt, basierend auf (Merino et al., 2020) und modifiziert nach (Staltner et al., 2023).

Letzteres wird von einer Triokinase weiter zu Glycerin-3-Phosphat (G3P) phosphoryliert und wirkt als Vorläufer für die Pyruvat-Bildung, welches weiter Nutzen in der Laktat-, Citrat- oder ATP-Produktion und als Vorläufersubstanz für die Triglycerid-Synthese findet. (Febbraio & Karin, 2021; Herman & Birnbaum, 2021; Zhao et al., 2016) Die nicht metabolisierte Fructose wird über die basolaterale Membran der Enterozyten durch den Glucosetransporter 2 (GLUT2) in die Pfortader transportiert und dann systemisch verteilt. (Ferraris et al., 2018) In einer Mausstudie konnte nachgewiesen werden, dass niedrige Dosen (5 g) an Fructose, wie sie zum Beispiel (z. B.) im Obst zu finden sind, bereits im Dünndarm zu Glucose, Laktat und Glycerat verstoffwechselt werden, bevor sie weiter zur Leber transportiert werden. (Jang et al., 2018)

1.2.3 Einsatz in der Lebensmittelindustrie

Fructose kommt in natürlicher Form in Pflanzen – Gemüse, Obst und Früchte – (Hosseini-Esfahani et al., 2011; Kelishadi et al., 2014) vor, ist Bestandteil des Honigs und wegen der hohen Süßkraft (Aoun et al., 2022; Cummings & Stephen, 2007) ebenfalls als Süßungsmittel in verarbeiteten Speisen sehr beliebt. Sie wird in der Industrie als Monosaccharid oder als Disaccharid – in Form von Saccharose – in zuckergesüßten Getränken, die sogenannten „Sugar sweetened beverages“ (SSB), in Obstsäften, Marmeladen und Backwaren eingesetzt. (Cummings & Stephen, 2007; Hosseini-Esfahani et al., 2011)

Somit wird Fructose nicht unbedingt nur über Obst oder Fruchtsäfte aufgenommen, sondern auch als zugesetzter Zucker bzw. „freier Zucker“. (Park & Yetley, 1993; Rana et al., 2021) Freie Zucker sind laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) Zucker, die natürlicherweise in Honig, Sirups, Obstsäften und -konzentraten vorkommen, aber auch die von den Herstellern bzw. Konsumenten hinzugefügten Zucker. (World Health Organization, 2015) Die WHO spricht für diese Art von Zucker und für natürlich vorkommenden Zucker eine maximale Empfehlung aus. So sollte bei einer durchschnittlichen, täglichen Energieaufnahme von 2.000 kcal die Aufnahme von freiem Zucker 10 Energieprozent (En%) des täglichen Bedarfs, was ungefähr 50 g täglich entspricht, nicht überschreiten, um als sicher vor metabolischen Problemen eingestuft werden zu können. (World Health Organization, 2015)

1.2.4 Globale Fructoseaufnahme – Ein Überblick

Tabelle 1: Überblick über die Fructoseaufnahme älterer StudienteilnehmerInnen in ausgewählten Ländern

ErstautorIn, Jahr, Land	Zeitraum	Zielpopulation	Durchschnittliche Fructoseaufnahme [g/d]	Hauptquellen von Fructose
Park & Yetley, (1993) USA	1977-1978	USDA Nationwide Food Consumption Survey (n = 30.667)	> 50 J.: 37 ± 0,4	Mehlspeisen, Obst und Obsterzeugnisse
Vos et al., (2008), USA	1988-1994	NHANES 1988-1994 Kohorte 51-70 J.: 3.478 > 70 J.: 2.370	51-70 J.: 44,1 ± 1,0 > 70 J.: 38,4 ± 0,8	Obst/Säfte, Mehlspeisen, gesüßte Getränke, Süßigkeiten
Marriott et al., (2009), USA	1994-2004	NHANES 1994-2004 Kohorte (n = 25.165)	≥ 51 J.: Männer: 41 ± 1,5 Frauen: 32 ± 0,8	Obst, gesüßte Getränke, Mehlspeisen
Sun et al., (2011), USA	1999-2006	NHANES 1999-2006 Kohorte (n = 25.506)	19-80 J.: 48,07	Nicht angegeben
Van Rossum et al., (2011), NL	2007-2010	Allgemeine Bevölkerung (n = 3.817)	50-69 J.: Männer: 43 ± 21 Frauen: 39 ± 17	Softdrinks, Säfte, Obst, Kuchen/Kekse
Debras et al., (2020), FR	2009-2019	NutriNet-Santé Kohorte (n = 101.279)	18,37 ± 9,56	Süßigkeiten, Obst, SSB
Pang et al., (2021), CN	2010-2012	Stadt vs. Landbevölkerung ≥ 45 J. (n = 25.528)	Stadt: 11,6 Land: 7,6	Stadt: Obst/Gemüse (69,02 %) Land: Obst, Gemüse, Weizen (73,45 %)

Werte sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes. CN – China; FR – Frankreich; J. – Jahre; NL – Niederlande; SSB – zuckergesüßte Getränke; USA – Vereinigte Staaten

In den letzten fünf Jahrzehnten wurde der Zuckerkonsum bzw. der Fructosekonsum der Bevölkerung im Rahmen nationaler Ernährungserhebungen in verschiedenen Ländern erhoben (zusammengefasst in Tabelle (Tab.) 1 sind die Daten für die ältere

Zielpopulation). Nach näherer Betrachtung der Studienergebnisse kristallisieren sich bei der älteren Bevölkerung Obst und dessen Erzeugnisse, Feingebäck und Knabbereien als Hauptquellen der Fructose heraus. (Debras et al., 2020; Marriott et al., 2009; Pang et al., 2021; Park & Yetley, 1993; Sun et al., 2011; van Rossum et al., 2020; Vos et al., 2008) Im Ländervergleich wiesen die Vereinigten Staaten (USA) einen etwas höheren Fructosekonsum auf als die Niederlande, Frankreich oder China. Jedoch blieb jede Nation unter der 50g-Empfehlung der WHO. (World Health Organization, 2015)

Die Methodik der nationalen Ernährungserhebungen steht in der Kritik, da Nährstoffe wie Fructose oft nicht als eigenständige Variable erfasst werden. In vielen Studien wird die Fructoseaufnahme stattdessen aus der Gesamtzuckeraufnahme oder aus dem Verzehr bestimmter Lebensmittelgruppen wie Obst oder SSBs extrapoliert. Dieser Ansatz liefert zwar eine grobe Schätzung, bietet jedoch keine präzise Übersicht der tatsächlichen Fructoseaufnahme. (Vos et al., 2008)

1.2.5 Die Problematik des Überkonsums von Fructose

Wie bereits oben erläutert, wird Fructose häufig als Zusatzstoff in die Ernährung der westlichen Welt eingeführt. Die Quellen sind hochverarbeitete Lebensmittel, Backwaren und zuckergesüßte Getränke, Lebensmittel, die in der Regel sehr kalorienreich und wenig nutritiv sind. (Febbraio & Karin, 2021) Die Hauptquelle in der westlichen Welt, insbesondere in den Vereinigten Staaten (White, J. S., 2008), bildet das „High-Fructose-Corn-Syrup“ (HFCS) mit einem durchschnittlichen Anteil von 25 bis 50 % mehr Fructose als Glucose. (White, 2008)

Der übermäßige Konsum von energiedichten Lebensmitteln sowie ein hoher Konsum von HFCS stehen im Zusammenhang mit Adipositas, Diabetes Mellitus Typ 2, kardiovaskulären Erkrankungen und mit einer metabolisch-assoziierten Fettlebererkrankung (MAFLD). (Sellmann et al., 2015) Letztere wird im Rahmen eines erhöhten Fructosekonsums besonders diskutiert, denn Mäuse, die chronisch mit einer fructosereichen Diät gefüttert wurden, wiesen eine erhöhte Endotoxinkonzentration in der Pfortader und in der Leber auf. Dies kann die Aktivierung der „toll-like receptor“-

abhängigen Signalkaskade fördern. (Spruss et al., 2009; Wagnerberger et al., 2012) Ähnliche Resultate ergab eine Studie, bei der es um die Auswirkungen einer chronisch erhöhten Fettaufnahme ging. Die erhöhten Endotoxinlevel im Blut deuteten darauf hin, dass solche Diäten die Darmbarriere stören. Dies wurde ebenfalls mit einer reduzierten Tight Junction (TJ)-Konzentration im Dünndarm bestätigt. (Gäbele et al., 2011; Sellmann et al., 2015; Suzuki & Hara, 2010a; Volynets et al., 2010a; Ye et al., 2012)

1.3 Die Darmbarriere und die altersassoziierten Veränderungen

1.3.1 Der Aufbau der Darmbarriere

Der Gastrointestinaltrakt (GIT) gehört zu den wichtigsten Organen, die für die Versorgung des Menschen mit Nährstoffen verantwortlich sind, und bildet noch vor der Haut die größte Oberfläche, die von äußeren Faktoren beeinflusst werden kann. Deswegen braucht es ein wichtiges Schutzsystem, welches von der Darmbarriere erfüllt wird. (Untersmayr et al., 2022) Die Dünndarmbarriere besteht aus unterschiedlichen Schichten. Diese werden nach Mikrobiota-, Mukus-, Epithelzell- und Immunzellschichten unterschieden (Abb. 4).

Die Mikrobiota- und die Schleimschicht, bestehend aus der intestinalen Bakterienflora, Mucinen, antimikrobiellen Peptiden und Antikörper der Immunzellen, bilden gemeinsam eine biochemische und immunologische Barriere. (Untersmayr et al., 2022) Gemeinsam wirken sie als erste Schutzbarriere gegen pathogene Keime und schützen die Epithelzellschicht vor äußeren Einflüssen, die zu Schäden oder Infektionen führen würden. (Turner, J. R., 2009; Vancamelbeke & Vermeire, 2017)

Die nächste Schicht wird von den Epithelzellen im Dünndarm, bestehend aus Enterozyten, Becherzellen, M-Zellen oder enteroendokrinen Zellen, gebildet. Im Dünndarm sind diese Zellen in Krypten angeordnet und tragen zur Nährstoffabsorption und im Zusammenspiel mit der Mikrobiota- und der Mukusschicht zum Schutz der Barriere bei. (Umar, S., 2010; Untersmayr et al., 2022) Diese Zellen werden jeweils an den apikalen und basolateralen Membranen der Zellen von Junction-Proteinen zusammengehalten. Die TJ, wie z. B. Zonula Occludens-1 (ZO-1), Occludin oder Claudin

regulieren den parazellulären Transport der Nährstoffe und sorgen für die Permeabilität der Darmwand. (Moonwiryakit et al., 2023; Untersmayr et al., 2022) An den basolateralen Membranen sind die Desmosomen und Adherens Junctions lokalisiert, die wie die TJ für Stabilität und den Schutz der Zellen und des Menschen sorgen. (Meng & Takeichi, 2009)

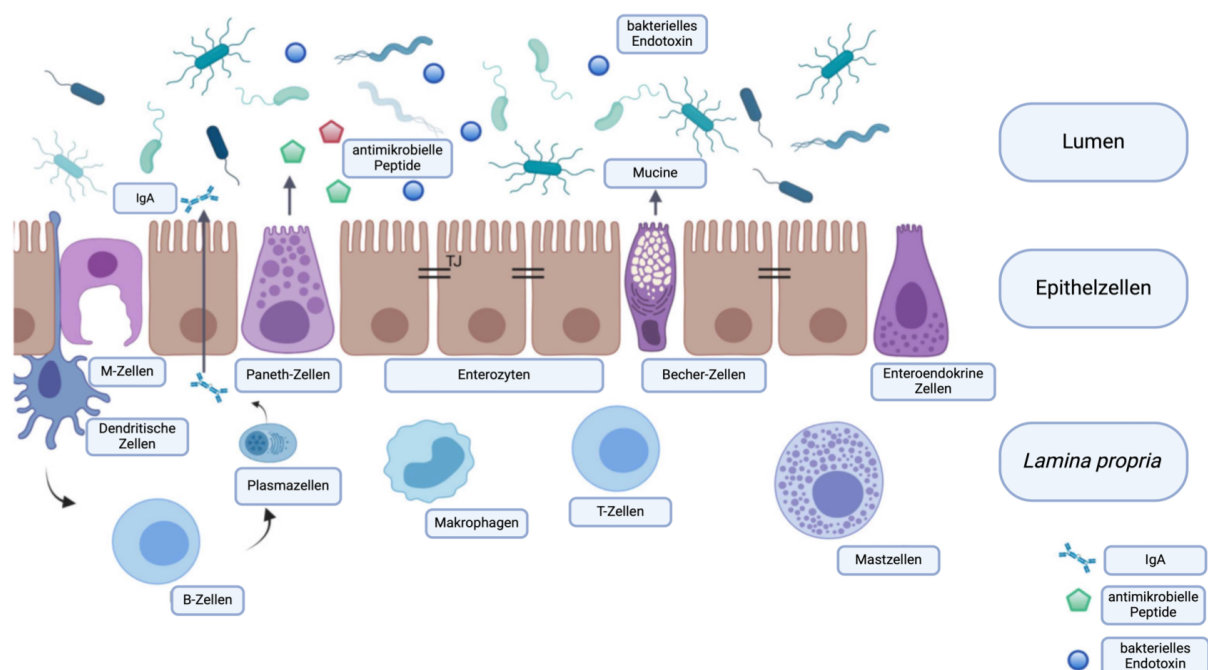


Abbildung 4: Schematische Darstellung der intestinalen Dünndarmbarriere. Die intestinale Barriere setzt sich aus einer mikrobiellen, biochemischen, physischen und immunologischen Schicht zusammen, die gemeinsam agieren. Im Lumen stellt die biochemische Schicht, bestehend aus der intestinalen bakteriellen Flora, Mukus, antimikrobiellen Peptiden und Antikörpern (IgA), die erste Verteidigungslinie gegen Fremdeinflüsse dar. Die physische Barriere bildet sich durch Enterozyten, Becherzellen, enteroendokrine Zellen, Paneth-Zellen und M-Zellen. Sie bilden zusammen die Epithelbarriere. In der Lamina propria unterhalb der Epithelzellen sorgen immunologische Zellen wie B-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen für zusätzlichen Schutz und interagieren mit der Darmbarriere. IgA – Immunglobulin A; TJ – Tight Junction. Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt, basierend auf (König et al., 2016; Tyszka et al., 2021; Vancamelbeke & Vermeire, 2017) und modifiziert nach (Untersmayr et al., 2022).

Die Interaktion der TJ und der Epithelzellen ist entscheidend für den Erhalt einer gesunden Epithelbarriere sowie den Erhalt der Permeabilität. (Untersmayr et al., 2022) Eine Störung dieser Interaktion kann für den Menschen/Organismus Folgen haben. Denn durch die Schäden an der Darmwand und die daraus folgende erhöhte Permeabilität

können bakterielle Endotoxine, pathogene Keime sowie antinutritive Stoffe parazellulär besser aufgenommen werden. (Camilleri, M., 2019)

Die immunologische Schicht, bestehend aus den Immunzellen, bildet das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe und befindet sich direkt unterhalb der Epithelzellen in der *Lamina propria*. Diese Zellen sind für die Immunüberwachung und die Abwehr von pathogenen Keimen und Fremdstoffen zuständig und versorgen ebenfalls das Lumen mit sekretorischen Antikörpern. (Mowat, A. Mcl., 2003)

1.3.2 Die altersassoziierte Veränderung der Darmbarriere

Wie bereits oben erläutert, kann Altern als „zeitbedingte Funktionsstörung“ bezeichnet werden. Davon ist auch der GIT betroffen. (Untersmayr et al., 2022) Obwohl in Studien bisher keine bedeutenden morphologischen Veränderungen im Epithelgewebe des Dünndarmes festgestellt worden sind, konnte bereits belegt werden, dass die Expression der TJ-Proteine z. B. ZO-1 und Occludin mit dem Alter abnimmt. (Tran & Greenwood-Van Meerveld, 2013; Untersmayr et al., 2022) Beobachtet wurde ebenfalls eine altersbedingte gestörte Stickstoffmonoxid (NO)-Homöostase in den Epithelzellen. (Brandt et al., 2022) Bei gesunden oder jungen Organismen spielt NO eine wichtige Rolle in der Regulation der epithelialen TJ-Proteine. (Mu et al., 2019) Seine antioxidative Wirkung schützt die Dünndarmbarriere vor oxidativem Stress und verhindert eine Dysfunktion der Barriere. (Katsube et al., 2007) Im Gegensatz zu den jungen Mäusen zeigen ältere Mäuse (24 Monate) eine reduzierte NO-Konzentration im Dünndarm und folglich eine gestörte Darmbarriere. (Brandt et al., 2022)

Konkret bedeutet dies, dass Reduktionen der TJ-Konzentration und NO-Konzentration eine Zunahme der Darmpermeabilität fördern und eine erleichterte Eintrittspforte für Nährstoffe, für bakterielle Toxine und pathogene Keime bilden, welche die Ätiologie vom „Leaky-Gut“-Syndrom, Reizdarmsyndrom und Kolonkrebs fördern könnte. (Camilleri, M., 2019; Hollander & Tarnawski, 1985; Katz et al., 1987; Kühn et al., 2020; Turner, J. R., 2009) Um die Mechanismen dieser Veränderungen verstehen zu können, braucht es noch weitere Studien am älteren Organismus.

1.3.3 Der Einfluss der Fructose auf die altersinduzierte Veränderung des Darmes

Mit der Zunahme der alternden Bevölkerung bis 2050 und darüber hinaus ist es wichtig, Wege zu finden, um die Gesundheitssysteme zu entlasten. Dies erfordert lösungsorientierte Antworten der Gesundheitsförderung, aber auch die Weiterentwicklung der Altersforschung. (De Winter, G., 2015) Forschungen zur Wirkung von Fructose auf den alternden Organismus, insbesondere im Dünndarm, könnten Lösungsansätze für dieses Problem liefern. In einer Studie mit *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) wurde bereits gezeigt, dass niedrige Dosen (10 g) die Lebensdauer verlängern, während hohe Dosen (100 g) sie verkürzen. (Zheng et al., 2017) Taylor et al. (2021) entdeckten zudem, dass bei Mäusen, die über 4 Wochen *ad libitum* eine 25%ige HFCS-Diät erhielten, die Anzahl der Dünndarmepithelzellen sowie die Zottenlänge erhöht war. (Taylor et al., 2021) Weitere Belege von Baumann et al. (2022) zeigen, dass Fructose oder ihre Metabolite in den Epithelzellen des Dünndarms vor der Verstoffwechslung die intestinale Barriere bei jungen Mäusen beeinflussen können und sich zudem positiv auf die NO-Synthese auswirken. (Baumann et al., 2022; Cho et al., 2021; Spruss et al., 2011; Staltner et al., 2023) Es fehlen jedoch noch Nachweise dafür, dass Fructose im alternden Organismus ähnliche Effekte hat.

1.4 Fragestellung

Ausgehend davon, dass eine beeinträchtigte Darmbarrierefunktion eine Schlüsselrolle bei der Entstehung altersassoziierter degenerativer Prozesse spielt und Fructose auf die Darmbarrierefunktion wirkt, wird in dieser Arbeit folgende Hypothese untersucht:

Fructose verlangsamt den Alterungsprozess bei Mäusen durch einen schützenden Effekt auf die Darmbarrierefunktion.

Die Hypothese soll anhand der folgenden Fragestellungen untersucht werden:

- 1. Beeinflusst Fructose die Marker der Zellalterung?***
- 2. Hat Fructose einen Effekt auf altersassozierte Veränderungen der Dünndarmbarriere und auf Marker der NO-Homöostase?***

2. Material- und Reagenzienübersicht

2.1 Allgemeine Labormaterialien

Material	Hersteller
96-well-Platten	VWR International, LLC, Radnor, Vereinigte Staaten
Aluminiumblock	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Aluminiumfolie Rotilabo®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
destilliertes Wasser (dH ₂ O)	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Dewar-Transportgefäß (Flüssigstickstoffbehälter)	KGW-Isotherm Karlsruher Glastechnisches Werk – Schieder GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Doppelt destilliertes Wasser (ddH ₂ O)	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Eppendorf Research® Kolbenhubpipetten (2,5 µL; 10 µL; 20 µL; 100 µL; 200 µL; 1000 µL)	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Ethanol 70 % (C ₂ H ₆ O)	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Feinwaage	VWR International, LLC, Radnor, Vereinigte Staaten
Flockeneisbereiter EF 103	Scotsman Industries Inc., Vernon Hills, Vereinigte Staaten
Flüssigstickstoff	Universität Wien, Wien, Österreich
Inkubator Heratherm™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten
KIMTECH™ Science, Labortücher – weiß	Kimberly-Clark Worldwide, Inc., Koblenz/Rheinhafen, Deutschland
Laborhandschuhe Größe L	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Magnetstäbchen Rotilabo®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Mehrkanalpipette (100 µL; 200 µL; 300 µL)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Messzylinder 1000 mL	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Mikro-Schraubröhre 2 mL	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Mixing Block MB-102	BIOER Technology, Zhejiang, China
Orion pH-Meter Five Easy	Mettler-Toledo GmbH, Columbus, Vereinigte Staaten
Palm Micro Centrifuge D1008	DLAB SCIENTIFIC CO., LTD, Peking, China
PCE MSP-100 Magnetic Stirrer	PCE-Instruments, Meschede, Deutschland
Peleusball	DLAB SCIENTIFIC CO., LTD, Peking, China
Permanent Marker – alkoholbeständig	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pinzette	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Pipettenspitzen (10 µL; 200 µL; 300 µL; 1000 µL)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Plastik-Wiegeschalen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Plastik-Pasteurpipetten	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Precellys 24touch	Bertin Technologies SAS, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich
Rasierklinge	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Reagenzglasschüttler RS-VA10	PHOENIX Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland
Reagiergefäßständer Rotilabo®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SafeSeal Reagiergefäße (0,5 mL; 1,5 mL; 2mL)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Schere	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich

Schraubröhren mit Spitzboden (15 mL; 50 mL)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Schraubröhrenständer	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Schutzbrille	Eigenbedarf
Serologische Pipette (5 mL; 10 mL; 25 mL)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Stainless Steel Beads, 5 mm	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Stoppuhr	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Styroporboxen	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Wiegebesteck	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge Z 216 MK	HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland

2.2 Die Versuchstierhaltung

Material	Hersteller
Abnehmspritzen	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
C57BL/6J-Mäuse (männlich)	Janvier S.A.S., Le-Genest-Saint-Isle, Frankreich
D (+)-Fructose (C₆H₁₂O₆)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ketamidol® 100 mg/mL (Ketamin)	Richter Pharma AG, Wels, Österreich
Nerfasin® vet 100 mg/mL (Xylazin)	Dechra Veterinary Products GmbH, Dornbirn, Österreich
Standardpellets (V1534-300)	ssniff Spezialitäten GmbH, Soest, Deutschland

2.3 Die histologische Gewebepräparation – Paraffineinbettung und Anfertigung von Dünndarmschnitte

Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte

Material	Hersteller
Brutschrank	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Einbetttschalen	Weckert Labortechnik, Kitzingen, Deutschland
Einbettstation: Cry Console, Dispensing Console, Thermal Console AP250	Microtom International GmbH, Walldorf, Deutschland
Filterpapier	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Gewebekassetten	Sanova Pharma GesmbH, Wien, Österreich
Mikrotom Leica RM2245	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland
Objektträger Superfrost® plus	Labxperts GmbH, Klosterneuburg, Österreich
Paraffin-Streckbad GFL 1052	LAUDA DR. R. WOBSE GMBH & CO. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
SB Einwegklingen	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland

Reagenzien und Lösungen

Reagenz/Lösung	Hersteller
Dinatriumhydrogenphosphat ≥ 99 %, wasserfrei (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol ≥ 99,8 %, vergällt (C ₂ H ₆ O)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 96 % (C ₂ H ₆ O)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehydlösung säurefrei 37 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid ≥ 99,5 % (KCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Kaliumdihydrogenphosphat $\geq 99\%$, wasserfrei (KH_2PO_4)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid $\geq 99,9\%$ (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Paraffin-Paraplast® Plus™	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure $\geq 37\%$ (HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.4 Die Gesamtproteinbestimmung nach Bradford mit BioRad-Farbreagenz

Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte

Material	Hersteller
Farbwanne	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
iMark™ Microplate Reader	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten

Reagenzien und Lösungen

Reagenz/Lösung	Hersteller
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.5 Der Semi-Dry Western Blot – Die Bestimmung von p16 und Albumin in Plasmaproben von C57BL/6J-Mäusen

Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte

Material	Hersteller
ChemiDoc™ MP Imaging System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten

Extra thick filter paper for western blotting	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten
Grant Bio™ PS-M3D Multifunktions-3D-Schüttler	Grant Instruments Ltd, Royston, Vereinigtes Königreich
Immun-blot® Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membranes for Protein Blotting	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten
Impulsschweißgerät	ROTEK Handels GmbH, Hagenbrunn, Österreich
Laborschüttler RK-30 Shaker	Premiere® (OCS.tec GmbH & Co. KG, Neuching, Deutschland)
Lineal	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Membran-Pinzette	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Mini-PROTEAN® Casting Stand Gaskets	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten
Mini-PROTEAN® Glass Plates	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten
Mini-PROTEAN® Spacer Plates (1,5 mm)	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten
Mini-PROTEAN® System Comb 15 well, 1.0	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten
Mini-PROTEAN® Tetra Cell Casting Stands & Clamp	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten
Plastikschälchen mit Deckel (2 Größen)	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Plastikschalen	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
PowerPac™ HC High-Current Power Supply	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten
Schere	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Schlauchfolie	ALLPAX GmbH & Co. KG, Papenburg, Deutschland

Schwimmteil-Schaumstoff	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten
Ultraschallbad Sonorex Digitec DT	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland

Reagenzien und Lösungen

Reagenz/Lösung	Hersteller
2-β-Mercaptoethanol (C ₂ H ₆ OS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid/Bis 30 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS) ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Anti-Rabbit IgG, Horseradish peroxidase (HRP)-linked Antibody (Sekundärantikörper)	Cell Signaling Technology, Danvers, Vereinigte Staaten
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bromophenolblau (C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Detektionslösung (Clarity™ Western ECL-Substrate) - Luminol/enhancer solution - Peroxide solution	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten
Dithiothreitol (DTT) (C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 100 % (C ₂ H ₄ O ₂)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol (C ₃ H ₈ O ₃)	Sigma Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Deutschland
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magermilch-Pulver (MMP)	ITW Reagents, Darmstadt, Deutschland

Methanol (CH₄O)	Sigma Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Deutschland
N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED) (C₆H₁₆N₂)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS) (C₁₂H₂₅NaO₄S)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ponceau S (C₂₂H₁₂N₄Na₄O₁₃S₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Precision Plus Protein Dual Color Standards (Proteinladder)	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten
CDKN2A (p16) antibody (p16-Primärantikörper)	biobyte Ltd., Durham, Vereinigte Staaten
Albumin antibody (Albumin Primärantikörper)	Cell Signaling Technology, Danvers, Vereinigte Staaten
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) PUFFERRAN® ≥ 99,9 % (C₄H₁₁NO₃)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween® 20 (C₅₈H₁₁₄O₂₆)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.6 Die D-Xylose-Permeationsmessung im ex vivo Everted-Sac-Modell

Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte

Material	Hersteller
CLARIOstar® Plus Microplate Reader	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Duodenum von C57BL/6J-Mäusen	Eigenzucht der SPF-Tierhaltung der Universität Wien, Wien, Österreich
Einmal-Injektionskanüle Sterican®	B. Braun Austria GmbH, Maria Enzersdorf, Österreich
Einmalspritze MAXIMA® (1 mL)	Henry Schein Services GmbH, Langen, Deutschland

Gavage-Nadeln	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Gefahrenstoffschränk	Düperthal Sicherheitstechnik GmbH & Co. KG, Karlstein, Deutschland
Gewebeschere	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Glaspasteurpipetten	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Lineal	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Mixing Block MB-102	BIOER Technology, Zhejiang, China
Nähfaden, Extra Stark M 782, 100 % Polyester	Gütermann GmbH, Gutach-Breisgau, Deutschland
Orion pH-Meter Five Easy	Mettler-Toledo GmbH, Columbus, Vereinigte Staaten
Petrischalen	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Pinzetten	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Wasserbad, Inkubationsbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Wiegeschälchen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Reagenzien und Lösungen

Bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion V ≥ 98 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Benzoessäure (C₇H₆O₂)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat (anhydrous) ≥ 99 % (CaCl₂ x 2 H₂O)	Chemische Fabrik Budenheim KG, Budenheim, Deutschland
D (+)-Fructose > 99,5 % (C₆H₁₂O₆)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
D (+)-Xylose (C₅H₁₀O₅)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung (DPBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Essigsäure 100 % (C₂H₄O₂)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Gasgemisch (95 % O₂, 5 % CO₂)	Air Liquide Austria GmbH, Schwechat, Österreich
HEPES (PUFFERAN®) ≥ 99,5 % (C₈H₁₈N₂O₄S)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid ≥ 99,5 % (KCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat ≥ 99 % (KH₂PO₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Lipopolysaccharide aus <i>Escherichia coli</i> O55:B5	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Magnesiumsulfat, wasserfrei ≥ 99,5 % (MgSO₄)	ThermoFisher GmbH, Kandel, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natronlauge 6 N (NaOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Phloroglucin-Dihydrat ≥ 98 % (C₆H₆O₃ x 2 H₂O)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure, rauchend 37 % (HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.7 Die Nitrit-Messung im oberen Dünndarm nach Griess

Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte

Material	Hersteller
CLARIOstar® Plus Microplate Reader	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland

Reagenzien und Lösungen

Reagenz/Lösung	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

N-(1-Naphthyl)ethyldiamin (NED)	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland
Nitrit-Standard 0,1 M	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland
Sulfonilamid-Lösung	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland

2.8 Die Zonula Occludens-1-Proteinfärbung im oberen Dünndarm

Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte

Material	Hersteller
Aufrechtes Mikroskop Leica DM6 B mit Kamera	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Deckgläser 24x50 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Entellan	Sigma Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Deutschland
Fettfester Stift (A-PAP Pen)	Daido Sangyo Co., Ltd, Tokio, Japan
Glaseinsatz für Färbetrog – Färbegestell	Sanova Pharma GesmbH, Wien, Österreich
Glasfärbetrog	Sanova Pharma GesmbH, Wien, Österreich
Glasstab	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kunststofffärbetrog	Sanova Pharma GesmbH, Wien, Österreich
Inkubator Heratherm™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten
Objektträger Superfrost® plus	Labxperts GmbH, Klosterneuburg, Österreich
Objektträger Tablett (Plastik & Karton)	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Orbital-Shaker	Heathrow Scientific, Vernon Hills, Vereinigte Staaten
StainTray™ (Färbesystem für Objektträger)	Simport Scientific Inc., Saint-Mathieu-de-Beloeil, Kanada
Immersol® Immersionsöl 518 N	Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen, Deutschland

Reagenzien und Lösungen

Reagenz/Lösung	Hersteller
DAKO Sekundärantikörper [EnVision+ System-HRP labelled Polymer (Anti-Rabbit)]	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Vereinigte Staaten
DAKO Liquid 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)+Substrate Chromogen System	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Vereinigte Staaten
Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol ≥ 99,8 %, vergällt (C₂H₆O)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 95 % (C₂H₆O)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 70 % (C₂H₆O)	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Hämatoxylin-Lösung	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Leitungswasser	Laborbestand, Universität Wien, Wien, Österreich
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Primärantikörper Zonula Occludens 1 (ZO-1)	Invitrogen lifetechnologies, Thermofisher Scientific Inc, Waltham, Vereinigte Staaten
Protease from <i>Streptomyces griseus</i>	Sigma Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Deutschland
Roti-Histol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.9 Softwares

Software	Hersteller
BioRender.com	BioRender, Toronto, Kanada
GraphPad Prism 7.0	GraphPad Software Inc., La Jolla, Vereinigte Staaten
Image Lab 3.0 Software	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten
Leica application suite 4.5	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica application suite X (LAS X)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
MARS Data Analysis Software	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Microplate Manager®	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten
Microsoft Office 365	Microsoft Corporation, Redmond, Vereinigte Staaten

3. Methodik

3.1 Das Versuchsdesign

Sämtliche Gewebeproben, die in dieser Arbeit verwendet und analysiert wurden, stammen aus einem von den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Bergheim durchgeführten Tierexperiment. Der Tierversuch (Genehmigungsnummer: 2023-0691.173) wurde vom österreichischen Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft und Forschung (BMBWF) bewilligt. Im Folgenden ist der Tierversuch kurz beschrieben.

Die Mäuse wurden in einer spezifisch pathogenfreien (SPF) Tierhaltung der Universität Wien unter standardisierten Bedingungen (12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus, Raumtemperatur 23-24 °C, Luftfeuchtigkeit ~ 55 %) aufgezogen. Insgesamt wurden für die Generierung der Daten Proben von 28 männlichen C57BL/6J-Mäusen verwendet, wobei 8 Mäuse nur als junge Vergleichsgruppe dienten. Diese wurden mit 8 Wochen erworben und bis zu ihrem Lebensende – weitere 2 Monate – mit Standardpelletfutter und Wasser *ad libitum* gefüttert. Die weiteren 14 Mäuse waren am Tag des Erwerbs 10 Monate alt und sind bis zur Feststellung einer Darmbarrierestörung mit Standardpelletfutter und Wasser *ad libitum* gefüttert worden. Nachfolgend wurden sie in 2 Gruppen randomisiert, wobei die Kontrollgruppe weiterhin mit dem Standardfutter und Wasser *ad libitum* gefüttert wurde und die Behandlungsgruppe für 7 Monate bis Versuchsende *ad libitum* Zugang zu Standardfutter und 5 % fructosehaltigem Wasser hatte.

Nach der Intervention wurden die Mäuse mit 100 mg/kg Körpergewicht (KG) Ketamin (Ketamidor®) und 16 mg/kg KG Xylazin (Nerfasin® vet) narkotisiert und aus der Pfortader wurde Blut entnommen. Anschließend wurden die Mäuse mittels zervikaler Dislokation getötet. Teile des Dünndarms wurden entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert oder in 4 % phosphatgepufferter Salzsäure (PBS)-gepufferter Formaldehydlösung fixiert.

3.2 Die histologische Gewebepräparation – Paraffineinbettung und Anfertigung von Dünndarmschnitte

Die histologische Gewebepräparation wurde von einer Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe Bergheim angefertigt. Mithilfe eines Mikrotoms wurden 4 µm dünne Schnitte aus dem in Paraffin eingebetteten Gewebe hergestellt. Anschließend wurde die Histologie untersucht bzw. mit spezifischen Antikörpern gefärbt. Im Folgenden sind die wesentlichen Schritte des Einbettverfahrens und das Herstellen der Präparate kurz zusammengefasst. Nach der Entnahme wurden die Dünndärme gespült, in Einbettkassetten überführt und in 4 % PBS-gepuffertem Formalin fixiert, mit kaltem Leitungswasser gewaschen und mit einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert. Das Gewebe wurde mit Paraffin eingebettet und über Nacht bei Raumtemperatur ausgehärtet. In der Tabelle 2 sind die Hauptschritte aufgelistet.

Tabelle 2: Verfahren zum Einbetten von Gewebe mit Paraffin

Inkubationszeit	Lösung
Fixierung	
≥ 48 Stunden	4 % PBS-gepuffertes Formalin
Waschen	
15 Minuten	Fließendes, kaltes Leitungswasser
Dehydrierung	
Jeweils ≥ 1 Stunde	- 75 % Ethanol
	- 85 % Ethanol
Über Nacht	95 % Ethanol
≥ 3 Stunden	100 % Ethanol
Überführen in Intermedium	
30 Minuten	Roti-Histol & 100 % Ethanol (1:1)
≥ 2 Stunden	Roti-Histol
Paraffinüberführung	
Jeweils 30 Minuten	Bei 60 °C in:
	- Paraffin 1
	- Paraffin 2
	- Paraffin 3

3.3 Die Gesamtproteinbestimmung nach Bradford mit BioRad-Farbreagenz

Die Gesamtproteinmenge der Proben wird experimentell mittels der Methode nach Bradford bestimmt. Es handelt sich dabei um eine einfache Methode, die auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Bradford-Reagenz – das Bio-Rad Farbreagenz – von 465 nm auf 595 nm basiert. Der Farbstoff Coomassie® Brilliant Blue G-250 – ein rot-brauner Farbstoff – ändert im sauren Milieu nach Bindung an die basischen und aromatischen Reste der Proteine die Farbe zu Blau. Dabei ist die Intensität der Farbe proportionell zur Proteinkonzentration. Nach der photometrischen Messung kann anhand einer Protein-Standard-Kalibrierungskurve die Proteinkonzentration der Proben bestimmt werden. (Bio-Rad Laboratories, 2024; Bradford, M. M., 1976; Goldring, J. P. D., 2019; Kielkopf et al., 2020)

Je nach verwendetem Probenextrakt mussten verschiedene Verdünnungen der Proben bzw. des Extraktionspuffers hergestellt werden. Eine Übersicht der Verdünnungen samt Extraktionspuffer sind in der Tab. 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Übersicht der Verdünnungsfaktoren der Proben & Puffer nach Methode und Farbreagenz

Methode	Verdünnungsfaktor*	Extraktionspuffer*
Nitritmessung (Kapitel 3.6)	1:5	DMEM
Bestimmung von CDKN2A (p16) & Albumin im Plasma (Kapitel 3.4)	1:200	dH ₂ O
BioRad-Farbreagenz	1:5	–

*mit dH₂O

Der Proteinstandard mit BSA wurde nach der unten angeführten Tab. 4 hergestellt. In einer 96-well-Platte wurden im Triplikat jeweils 5 µL der verdünnten Standardreihe und der verdünnten Proben pipettiert. Mit einer Mehrkanalpipette wurde 200 µL verdünntes Farbreagenz hinzugefügt. Die Platte wurde anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt und die Extinktionen bei einer Wellenlänge $\lambda = 590$ nm

photometrisch gemessen (iMark™ Microplate Reader). Die Proteinkonzentration konnte anhand einer auf Microsoft Excel erstellten Standardgeraden berechnet werden. (Kielkopf et al., 2020)

Tabelle 4: Herstellung der BSA-Standardreihe für die Proteinbestimmung

	BSA-Standardreihe	Verdünnter Probenpuffer	BSA-Konzentration [mg BSA/mL]
A	2 µL BSA-Aliquot*	198 µL	1,0
B	100 µL A	100 µL	0,5
C	100 µL B	100 µL	0,25
D	100 µL C	100 µL	0,125
E	100 µL D	100 µL	0,0625
F	-	100 µL	0

*100 mg BSA/mL in dH₂O; BSA – bovines Serumalbumin

3.4 Der Semi-Dry Western Blot – Die Bestimmung von p16 und Albumin im Plasma

Der Western Blot vereint verschiedene Methoden, um spezifische Proteine in einer flüssigen Probe zu identifizieren. Das Prinzip dieser Methode beruht auf drei wesentlichen Schritten: das Auftrennen der Proteine nach ihrem Molekulargewicht unter elektrischer Spannung mittels einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), das Übertragen der aufgetrennten Proteine auf einen Festkörperträger und die Identifikation der spezifischen Proteine mithilfe der Interaktion zwischen Antikörper und Zielprotein und einer Detektionslösung. (Hidayat & Wulandari, 2021)

In den folgenden Abschnitten werden die Schritte des Semi-Dry Western Blot für die Bestimmung des Altersmarkers p16 und des Housekeeping-Protein Albumin erklärt. Die Herstellung der benötigten Puffer und Lösungen kann im Anhang – Seite 73, Tabelle 14 – nachgelesen werden.

Das SDS-Gel

Für die Gelherstellung wurde zunächst die 10 %-APS-Lösung hergestellt. Die Größe der spezifischen Proteine bestimmt die Acrylamidkonzentration der Gele. (abcam, 2022) Da p16 und Albumin eine Proteingröße von 55 kDa bzw. 67 kDa haben, sind die 10 %- und 12 %-Gele am besten geeignet. Die Tabelle 5 fasst die Reagenzien für die Herstellung der SDS-Gele zusammen.

Tabelle 5: Reagenzien-Liste für die Herstellung von 10 %- und 12 %-Trenngel und 5 %-Sammelgel

TRENNGEL	10 %	12 %	SAMMELGEL	5 %
Komponenten für 1 Gel [μL]				
ddH₂O	2085	1750	ddH₂O	756,25
1,5 M Tris pH 8,8	1300	1300	0,5 M Tris pH 8,8	312,5
30 % Acryl/Bis	1665	2000	30 % Acryl/Bis	156,25
10 % SDS	50	50	10 % SDS	12,5
10 % APS¹	50	50	10 % APS¹	12,5
TEMED¹	3	3	TEMED¹	1,5

¹Das APS und das TEMED müssen die letzten Reagenzien sein, die hinzugefügt werden. (Hidayat & Wulandari, 2021)

Zwei saubere Glasplatten (Mini-PROTEAN® Glass Plates und Mini-PROTEAN® Spacer Plates (1,5 mm)) wurden in eine Plastikhalterung (Mini-PROTEAN® Tetra Cell Casting Stands & Clamp) eingespannt. Das Trenngel wurde nach der Tabelle 5 hergestellt und mit einer Pipette bis zu dem grünen Steg der Glashalterung aufgefüllt, danach mit 70%igem Ethanol (EtOH) überschichtet. Das Gel polymerisierte für ungefähr 30-45 Minuten. Nach der Inkubationszeit wurde das 5 %-Sammelgel hergestellt und mit einer Pipette bis zum Ende der Glasplatte aufgefüllt. Der Spalt wurde anschließend mit einem Plastikkamm (Mini-PROTEAN® System Comb 15 well, 1.0), der die Taschen für die Proben bildet, luftblasenfrei versiegelt. Es folgte ein weiterer Polymerisierungsschritt von 30-45 Minuten.

Die Vorbereitung der Proben

Vor Beginn der Methode wurde das Gesamtprotein der Plasmaproben nach der Bradford-Methode bestimmt (siehe Kapitel 3.3). Zur Bestimmung der beiden spezifischen Proteine wurden die geeigneten Konzentrationen in Vorversuchen ermittelt und auf 0,8 µg/µL für Albumin sowie 0,05 µg/µL für p16 festgelegt. Für die p16-Bestimmung wurde den Plasmaproben 30 µL 4x SDS-Ladepuffer, 88,39 µL ddH₂O und 18 µL DTT hinzugefügt, sie wurden durchmischt (Reagenzglas-Schüttler RS-VA10), abzentrifugiert (Palm Micro Centrifuge D1008) und anschließend im Ultraschallbad (Sonorex Digitec DT) 3-mal für 20 Sekunden erhitzt. Anschließend wurden die Proben für maximal 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und geschüttelt (Mixing Block MB-102). Diese Schritte dienen zur Verdünnung der Proteine sowie zu einer verstärkten Denaturierung. Folglich werden die Aminosäuren negativ geladen, was das Wandern im elektrischen Feld ermöglicht. (Hidayat & Wulandari, 2021)

Für die Albumin-Bestimmung wurde den Proben 17,58 µL ddH₂O, 6,25 µL 4x SDS-Ladepuffer und 3,75 µL DTT hinzugefügt. Danach wurden sie wie die p16-Proben aufbereitet. Die Plasmaproben waren nun auf 0,8 µg/µL für p16 bzw. 0,05 µg/µL für Albumin eingestellt.

Die SDS-Page

Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer (Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell) eingespannt, die Kammer wurde mit 1x Elektrophoresepuffer aufgefüllt und die Gele wurden anschließend mit 1,5 µL Precision Plus Protein Dual Color Standards (Proteinladder) und 10 µL Probe beladen. Die Elektrophoresekammer wurde auf Eis gestellt und das Auftrennen der Proteine lief bei 110 V für 1 Stunde und 30 Minuten ab (PowerPac™ HC High-Current Power Supply).

Die Proteinübertragung – Das Blotten

Nachdem das Auftrennen der Proteine abgeschlossen war, erfolgte die Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran – das Blotten. Die nächsten Schritte, die vor dem Blotten nötig sind, werden in der Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Vorbereitung des Blotting-Sandwichs

SCHRITT	BESCHREIBUNG
GELENTNAHME	Das Sammelgel abtrennen und 10 Minuten im Towbin-Transferpuffer schütteln*.
MEMBRANAKTIVIERUNG	Aktivierung der Membran in Methanol für 10 Sekunden. Schütteln* der Membran für 10 Minuten in Towbin-Transferpuffer.
AUFBAU DES BLOTTING-SANDWICHS	Filterpapier-Membran-Gel-Filterpapier

*Alle Materialien werden auf dem Laborschüttler RK-30 Shaker geschüttelt

Das Sandwich wurde in eine Kassette (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System) gelegt und nach dem Standard-SD-Programm (25 V, 1 A, 30 Minuten) geblottet. Die negativ geladenen Proteine sollten in Richtung der Anode migrieren, wurden jedoch von der Membran aufgefangen (Abb. 5).(abcam, 2024)

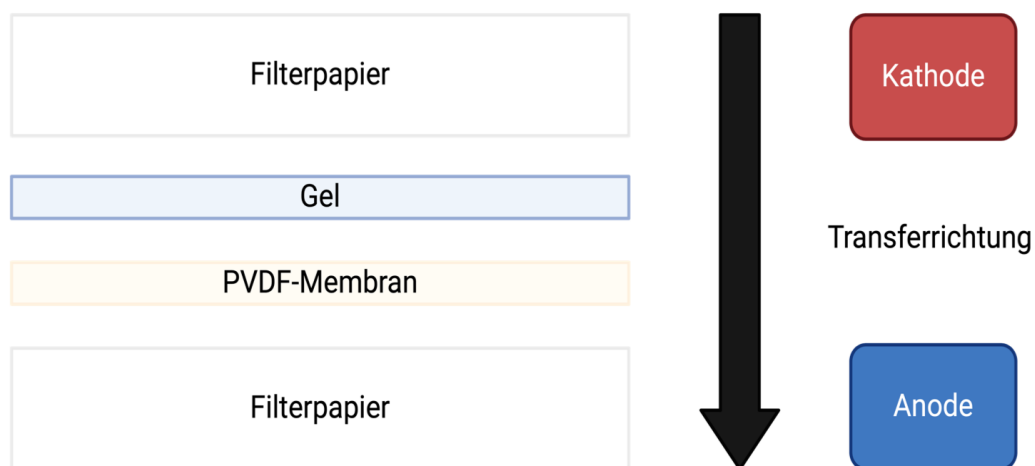


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Aufbaus des Blotting-Sandwichs und Ablauf des Blottings. Das Blotting-Sandwich wird folgendermaßen zusammengebaut: Filterpapier – PVDF-Membran – Gel – Filterpapier. Wegen der elektrischen Spannung wandern die Proteine Richtung Anode, werden von der Membran aufgefangen. PVDF – Polyvinylidendifluorid. Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt und nach (abcam, 2022) modifiziert.

Nach der Übertragung wurde die Membran für 1 Stunde getrocknet, um anschließend für die Detektion der Proteine verwendet zu werden.

Die Ponceau-S-Färbung

Die Ponceau-S-Färbung, eine reversible Färbung, ist eine Methode zur Überprüfung der totalen Proteinübertragung auf die Membran. (abcam, 2024; Goldman et al., 2016; Stochaj et al., 2006) Der Ponceau-S-Farbstoff, ein Diazo- und Anionenfarbstoff, erlaubt es aufgrund seiner negativen Ladung elektrostatisch mit den positiv geladenen Gruppen der Proteine auf der Membran zu interagieren. Ein Ponceau-S-Protein-Komplex entsteht und hellrosa-rote Banden erscheinen auf der Membran. (Sander et al., 2019) Die Membran wurde 5 Sekunden in dH₂O gewaschen und 3 Minuten in Ponceau S geschwenkt (Laborschüttler RK-30 Shaker). Anschließend wurde sie 3-mal in frischem dH₂O gespült und mittels kolorimetrischer Messung (ChemiDoc™ Imaging System) die Ladungsübertragung der Proben überprüft.

Die Inkubation mit dem Primär-Antikörper

Die folgenden Schritte sind für die Inkubation mit p16- oder Albumin-Primärantikörpern gleich, nur die Herstellung der beiden Blockierlösungen unterscheidet sich. Das Blockieren der Membran mit einem Waschpuffer wie Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween® 20 (TBST) verhindert die unspezifische Bindung der Primärantikörper an der Membran. Zudem konkurrieren die Blockierungsstoffe wie BSA oder MMP um die Bindungsstellen an der Membran. (Hidayat & Wulandari, 2021) Die wichtigsten Schritte für die Antikörper-Inkubation sind in der Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Inkubationsschritte

Schritt	Beschreibung
Blockieren der Membran	1 Stunde mit: - 5 % BSA in TBST (p16) - 5 % MMP in TBST (Albumin)
Herstellung der Primärantikörper-Lösung	1:500 Verdünnung in Blockierlösung
Inkubation mit Primärantikörper über Nacht	Die Membran eingeschweißt in Schlauchfolie mit spezifischer Primärantikörper-Lösung bei 4 °C im Kühlschrank in konstanter Rotation (Grant Bio™ PS-M3D Multifunktions-3D-Schüttler)
Waschvorgang	3-mal für 10 Minuten in frischem TBST geschüttelt*
Herstellung der Sekundärantikörper-Lösung	Anti-Rabbit-Antikörper wird 1:5000 in Blockierlösung verdünnt
Inkubation mit Sekundärantikörper	1 Stunde und 30 Minuten in jeweiliger Sekundärantikörper-Lösung in einer Plastischale geschüttelt*
Waschvorgang	3-mal für 10 Minuten in frischem TBST geschüttelt*

*(Laborschüttler RK-30 Shaker)

Die Detektion

Das Clarity™ Western ECL-Substrate (Detektionslösung) bestehend aus 2 Reagenzien wurde nach einem 1:1 Schema hergestellt. Diese Lösung interagiert mit dem HRP-konjugierten Anti-Rabbit-Antikörper und erzeugt ein Signal. (Hidayat & Wulandari, 2021) Die Membranen wurden für 5 Minuten im Dunkeln in einer Plastischale mit ~1 mL Detektionslösung inkubiert. Anschließend wurden die Banden detektiert (ChemiDoc™ Imaging System). Die Banden der jeweiligen Proteine wurden mit der Image Lab Software ausgewertet. Hierzu wurden die Bandenvolumina von p16 pro Probe auf die Bandenvolumina von Albumin pro Probe normalisiert.

3.5 Die Bestimmung der intestinalen Permeabilität mittels D-Xylose-Permeationsmessung im ex vivo Everted-Sac-Modell

Die für diese wissenschaftliche Arbeit verwendeten Ergebnisse wurden von einer Studierenden der Arbeitsgruppe Bergheim generiert. Die intestinale Permeabilität der Dünndärme von C57BL/6J-Mäusen wurde ex vivo mit der Everted-Sac-Methode

untersucht. Hiermit wird die Durchlässigkeit bzw. die Absorption eines Stoffes von der Mucosa in die Serosa untersucht. Diese Methode wird üblicherweise mit einer D-Xylose-Permeationsmessung kombiniert. Der D-Xylose-Assay wurde nach dem Protokoll von Hayashi et al. (2000) durchgeführt. Die Methode basiert auf der von Douglas (1981) modifizierten photometrischen Quantifikation des gefärbten Niederschlags Phloroglucid, der aus der unten beschriebenen Reaktion (Abb. 6) resultiert. (Douglas, S. G., 1981; Hayashi et al., 2000; Ismay, D., 1950; Kiszonas et al., 2012; Wilson & Wiseman, 1954)

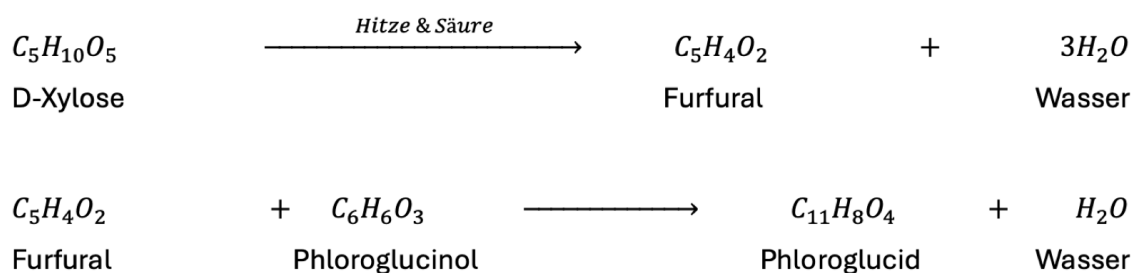


Abbildung 6: Reaktionsgleichung der D-Xylose-Permeationsmessung. Xylose wird unter Hitze und Säure-Zusatz in Furfural umgewandelt, um mit Phloroglucinol das gefärbte Präzipitat Phloroglucid zu bilden. Die Abbildung wurde nach (Kiszonas et al., 2012) modifiziert.

3.6 Die Nitrit-Messung im oberen Dünndarm nach Griess

Mithilfe der Nitritmessung nach Griess wird das Stickstoffmonoxid indirekt bestimmt. Griess beschrieb 1879 erstmals die Diazotierungsreaktion in einem flüssigen, sauren Medium. Für die Messung wurde das *GRIESS® Reagent System* (Promega) verwendet. Das *Reagent System* basiert auf der unten angeführten Diazotierungsreaktion (Abb. 7) mit den *GRIESS®*-Reagenzien Sulfanilamid und NED, die im weiteren Verlauf durch eine photometrische Messung bei $\lambda = 540 \text{ nm}$ die Quantifizierung des Nitritgehaltes erlaubt. (Promega Corporation, 2009; Tsikas, D., 2007)

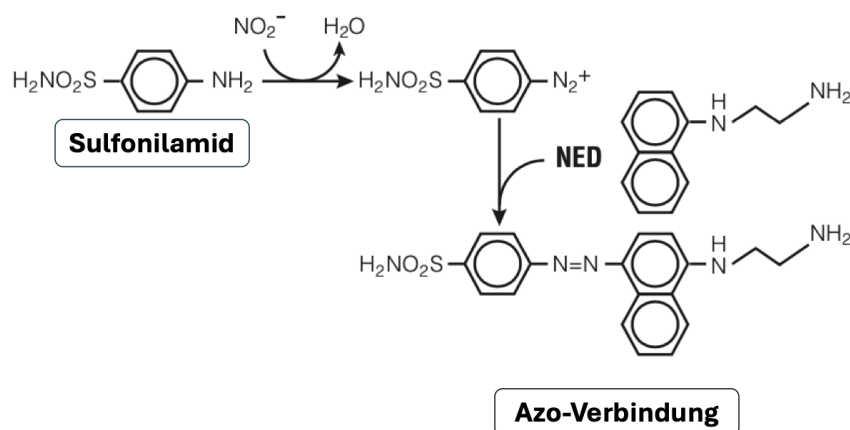


Abbildung 7: Diazotierungsreaktion im Griess-Assay. Das GRIESS®-Reagenzsystem beruht auf der Reaktion von Nitrit (NO_2^-) und Sulfanilamid im sauren Milieu mithilfe von N-1-Naphthylethylenediamindihydrochlorid (NED) zu einer Azo-Verbindung (farbiges Präzipitat). Die Abbildung wurde nach (Promega Corporation, 2009) modifiziert.

Kleine Dünndarmstücke der Mäuse wurden für diese Methode mit 200 μL Medium (DMEM) für 10 Sekunden bei 4500 rpm homogenisiert (Precellys 24touch) und anschließend für 20 Minuten bei 4 °C und 7000 g zentrifugiert (Zentrifuge Z 216 MK), um sie in ihre einzelnen Bestandteile zu trennen. Der flüssige Überstand wurde in weiteren Schritten verwendet und zwischenzeitlich auf Eis gelegt. Der vom Hersteller gelieferte Nitrit-Standard wurde 1:1000 mit DMEM verdünnt. Die Verdünnung der Standardreihe erfolgte nach dem Schema der unten angeführten Tabelle 8 im Triplikat in der 96-well-Platte. Vom Überstand wurden jeweils 40 μL im Duplikat auf die Platte pipettiert.

Mit einer Mehrkanalpipette wurde in jedes Well 40 μL Sulfonilamid-Lösung hinzugefügt. Nach diesem Schritt erfolgte im Dunkeln für 10 Minuten eine Inkubation der Platte bei Raumtemperatur. Nach der ersten Inkubation wurde mit einer Mehrkanalpipette in jedes Well 40 μL NED-Lösung hinzugefügt und wieder für 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der letzten Inkubation war eine Farbumstellung erkennbar (pink-violett) und die Extinktionen wurden bei einer Wellenlänge von $\lambda = 540 \text{ nm}$ photometrisch (CLARIOstar Plus Microplate Reader) gemessen.

Tabelle 8: Herstellung der Nitrit-Standardreihe

	Nitrit-Standardreihe	Medium* [μL]	Nitritstandard-Konzentration [μM]
A	80 μL Nitritstandard	-	100
B	40 μL A	40	50
C	40 μL B	40	25
D	40 μL C	40	12.5
E	40 μL D	40	6.25
F	40 μL E	40	3.13
G	40 μL F	40	1.56
H	-	40	0

*DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

Die Nitritkonzentration konnte anhand einer auf Microsoft Excel erstellten Standardgeraden berechnet und in einem weiteren Schritt auf die jeweilige Proteinkonzentration, die nach der Bradford-Methode bestimmt wurde (siehe Kapitel 3.3), normalisiert werden.

3.7 Die Zonula Occludens-1-Proteinfärbung im Duodenum

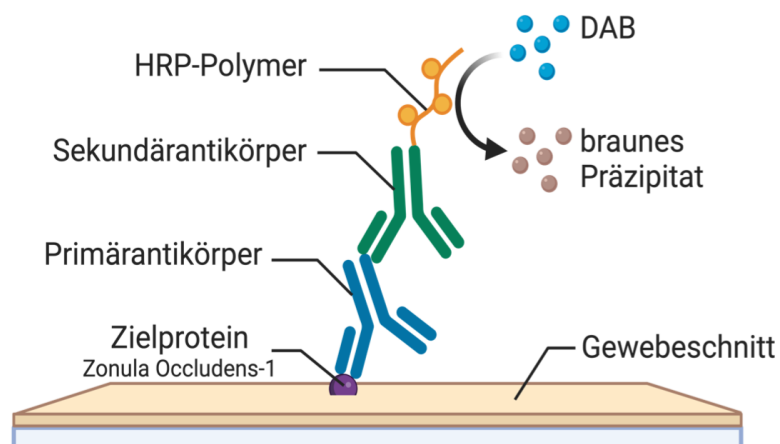


Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung einer Antigen-Antikörper-Komplex-Detektion. DAB – Diaminobenzidin; HRP – Horseradish Peroxidase. Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt und nach (Kim et al., 2016) modifiziert.

Die ZO-1-Proteinfärbung in den Dünndarmschnitten ist eine immunhistochemische Technik, dessen Grundlage auf der Interaktion zwischen Antikörper und Zielprotein beruht. Sichtbar werden diese Interaktionen durch unterschiedliche Detektionssysteme (Abb. 8). Anschließend werden die Reaktionen anhand eines Mikroskops visualisiert. (Kim et al., 2016; Schacht & Kern, 2015; Taylor & Burns, 1974) Im Anhang (Seite 74, Tabelle 15) kann die Herstellung des Waschpuffers nachgelesen werden. Die Objektträger mit den 4 µm dünnen Dünndarmschnitte wurden, wie in Tabelle 9 zusammengefasst, für diese Methode (1) entparaffiniert und (2) rehydriert.

Tabelle 9: Aufbereitungsschritte für Gewebeschnitte

1*	- 10 Minuten in Roti-Histol
	- 5 Minuten in:
	○ 100 % Ethanol
	○ 95 % Ethanol
	○ 70 % Ethanol
2*	- 10 Minuten in dH ₂ O

*Die Schnitte werden während der angegebenen Dauer bei 55 rpm geschüttelt (Orbital-Shaker).

Währenddessen wurde die Feuchtkammer (Staintray™) für die Schnitte vorbereitet. Es erfolgte die erste Inkubation mit der Protease (protease from *Streptomyces griseus*). Diese verstärkt die Präsenz der spezifischen Zielproteine/Antigene, die aufgrund der Formalinfixierung verändert wurden. (Schacht & Kern, 2015) Laut Protokoll werden 2 mg Protease pro mL PBS eingewogen. Ebenfalls wurde das Gewebe auf den Schnitten mit einem Fettstift (A-PAP Pen) umrandet, um ein Auslaufen der flüssigen Reagenzien während der Behandlungsschritte zu verhindern. (Rocklands Immunochemicals Inc., 2018) Es wurden jeweils ein paar Tropfen Protease-Lösung auf das Gewebe pipettiert und anschließend für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert (Inkubator Heratherm™).

Nach der Inkubation erfolgte ein 10-minütiger Waschschrift der Schnitte in PBS, um die Proteaselösung abzuwaschen. (Visikol Inc., 2024) Währenddessen wurde die Primärantikörperlösung hergestellt, dafür wurde der aliquotierte ZO-1-Antikörper (AK) 1:500 mit PBS verdünnt. Die Mitlaufkontrolle diente als (a) Positiv- und (b)

Negativkontrolle. (a) wurde wie eine normale Probe behandelt, und mit Primärantikörper inkubiert, (b) wurde mit einem Tropfen PBS inkubiert. Der Vergleich (a) zu (b) war bei einem weiteren Schritt nützlich. (Schacht & Kern, 2015) Auf die restlichen Gewebeschnitte wurde Primär-AK-Lösung verteilt und sie wurden über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Am Folgetag erfolgten folgende Schritte wie in der Tabelle 10 beschrieben.

Tabelle 10: Übersicht der Vorbereitung für die Inkubation mit dem Sekundärantikörper

-	9 Minuten in PBS waschen und schütteln
-	Inkubation mit einem HRP-markierten Polymer konjugiert am Sekundärantikörper für 10 Minuten bei 25°C (Inkubator Heratherm™) (Agilent Technologies Inc., 2022a)
-	9 Minuten waschen in PBS

PBS – phosphatgepufferte Salzlösung; HRP – horseradish peroxidase

Für die Inkubation mit dem DAB-Chromogen-Substrat wurde in einem mit Alufolie abgedunkelten Gefäß 1 Tropfen Chromogen mit 1 mL Substrat durchmischt. Die Oxidation des DAB durch die HRP wird am Zielprotein, dem ZO-1, ein braunes Endprodukt bilden. (Agilent Technologies Inc., 2022b)

Zunächst wurde mit der Mitlaufkontrolle die Inkubationszeit des Substrats getestet. Dafür wurde ein Tropfen Substrat gleichzeitig auf (a) und (b) verteilt. Sobald (a) sich im Gegensatz zu (b) verfärbte, wurde die Reaktion in dH₂O abgestoppt. Die Reaktionszeit, im Durchschnitt waren es 1-10 Sekunden, wurde auch bei den restlichen Schnitten angewendet. Anschließend erfolgten die Gegenfärbung mit Hämatoxylin und die Bläuungsschritte in Leitungswasser, welche eine bessere Unterscheidung des Gewebes vom gefärbten Zielprotein ermöglichten. (Carl Roth GmbH + Co. KG, 2022; Kim et al., 2016; Schacht & Kern, 2015) In den Tabellen 11 und 12 sind die Gegenfärbung und die Fixierung zusammengefasst.

Tabelle 11: Gegenfärbung mit Hämatoxylin

Lösung	Zeit
Hämatoxylin	20 Sekunden
Leitungswasser	10 Sekunden
Leitungswasser	10 Sekunden
dH ₂ O	Abstoppen der Reaktion

Tabelle 12: Fixierungsschritte

*Dehydrierung	- 10 Sekunden in: ○ 70 % Ethanol ○ 95 % Ethanol ○ 100 % Ethanol
	- 10 Minuten in Roti-Histol
Versiegelung	- Eindecken der Schnitte mit einem Tropfen Entellan und einem Deckglas

*bei 55 rpm geschüttelt (Orbital-Shaker)

Am Folgetag können diese unter dem Mikroskop bei 630-facher Vergrößerung betrachtet werden.

3.8 Die statistische Auswertung

Die Datenanalyse und die grafische Aufbereitung der generierten Ergebnisse erfolgten mit Hilfe von GraphPad Prism 7. Die Daten wurden mit dem Grubb's Test auf Ausreißer getestet und, wenn präsent, aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Statistische Unterschiede wurden mit einem einseitigen ungepaarten t-Test überprüft, wobei die Normalverteilung der Daten als Voraussetzung galt. Außerdem wurden die 4 Monate alten Mäuse aus der statistischen Analyse ausgeschlossen. Sie dienten nur zum Vergleich. Sämtliche Ergebnisse wurden als Mittelwert (MW) $\pm$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM) mit einem Signifikanzniveau $p \leq 0,05$ dargestellt.

4. Ergebnisse

Basierend auf der bestehenden Datenlage zum Effekt von Fructose auf die Dünndarmbarrierefunktion werden hier die Ergebnisse des Tierversuchs vorgestellt, der den Effekt einer 5%igen Fructoseanreicherung im Trinkwasser auf altersinduzierte Veränderungen der oberen Dünndarmbarriere und Marker der Zellalterung darstellt und beschreibt. Da in der vorliegenden Arbeit nur Teile der Studie analysiert wurden, wurden aus Gründen der Übersicht in der unten angeführten Tabelle 13 die durchschnittlichen Körper- und Lebergewichte sowie die Verhältnisse von Leber- zu Körpergewicht der 3 Mausgruppen angeführt.

Tabelle 13: Körpercharakteristika der Mäuse nach dem Versuch

	Gruppen		
	4 Monate	24 Monate	24 Monate + Fructose
*Körpergewicht [g]	29,24 ± 0,60	34,63 ± 0,85	34,13 ± 0,98
*Lebergewicht [g]	1,60 ± 0,05	1,92 ± 0,11	1,70 ± 0,10
*Leber-/ Körpergewichtsratio [%]	5,47 ± 0,10	5,28 ± 0,12	4,97 ± 0,21

*Werte dargestellt als MW ± SEM

4.1 Der Einfluss einer Fructoseanreicherung im Trinkwasser auf die Marker der Zellalterung

Um den Einfluss einer 5%igen Fructoseanreicherung im Trinkwasser auf das Altern von C57BL/6J-Mäusen zu untersuchen, wurde die Proteinkonzentration von Albumin und des Altersmarkers p16 im Pfortaderplasma bestimmt. Die jeweiligen Banden wurden bei 67 kDa (Albumin) und 55 kDa (p16) detektiert. Anschließend wurde die p16-Konzentration auf die Albuminkonzentration normalisiert und quantifiziert.

Obwohl die Ergebnisse der 4 Monate alten C57BL/6J-Mäuse nicht in die statistische Analyse eingeflossen sind, war zu beobachten, dass deren p16-Konzentration im Plasma im Vergleich zu den 24 Monate alten Kontroll- und Interventionsmäusen um 141 % bzw.

82 %, also deutlich erniedrigt war (Abb. 9). Die p16-Konzentration der mit Fructose behandelten Mäuse war um 60 % geringer als in der Kontrollgruppe, erreichte jedoch aufgrund der relativ hohen Streuung innerhalb der älteren Kontrollgruppe keine statistische Signifikanz ($p = 0,1$).

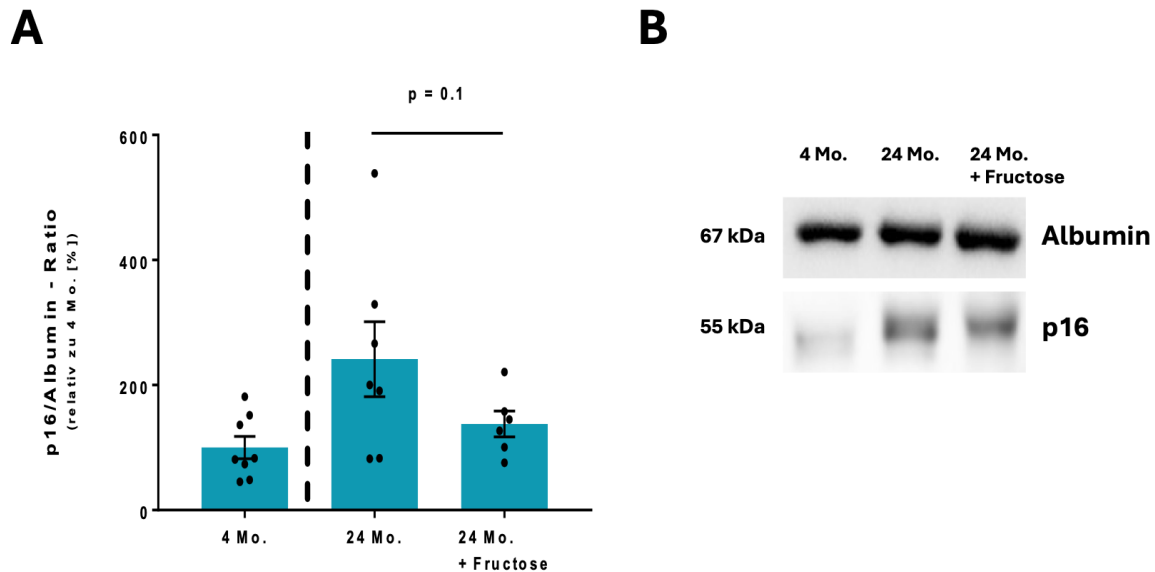


Abbildung 9: Der Einfluss einer Fructoseanreicherung im Trinkwasser auf die Parameter der Zellalterung. **A** Die relative p16-Konzentration im Plasma normalisiert auf die Albuminkonzentration von 4 Mo., 24 Mo. und 24 Mo. + Fructose alten C57BL/6J-Mäusen. Der p-Wert beträgt 0,1 im Vergleich zu 24 Monate alten Mäusen. Die Daten sind als Mittelwert (MW) $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. ($n = 7-8$ pro Gruppe) **B** Ein repräsentativer Western Blot der p16- und Albuminkonzentration im Plasma. Mo. – Monate; kDa – kilo Dalton

4.2 Der Einfluss einer Fructoseanreicherung im Trinkwasser auf die altersbedingten Veränderungen der Darmbarriere und Marker der NO-Homöostase

Um herauszufinden, ob eine 5%ige Fructoseanreicherung über das Trinkwasser die altersbedingten Veränderungen der Dünndarmbarriere beeinflussen kann, wurde in Gewebeschnitte des oberen Dünndarms der C57BL/6J-Mäuse das Tight Junction-Protein ZO-1 immunhistochemisch gefärbt.

Die Analyse der repräsentativen Bilder bei 630-facher Vergrößerung (Abb. 10 A) zeigte, dass bei den 24 Monate alten Kontrollmäusen im Vergleich zu den jungen Mäusen eine optische Reduktion der ZO-1-Verteilung zwischen den Enterozyten der Darmzotten pro 10

Zellen zu erkennen war (mit Pfeilen gekennzeichnet). Im Gegensatz dazu wurde bei den fructosegefütterten Mäusen im Vergleich zur gleichaltrigen Kontrollgruppe pro 10 Enterozyten keine optische Veränderung festgestellt.

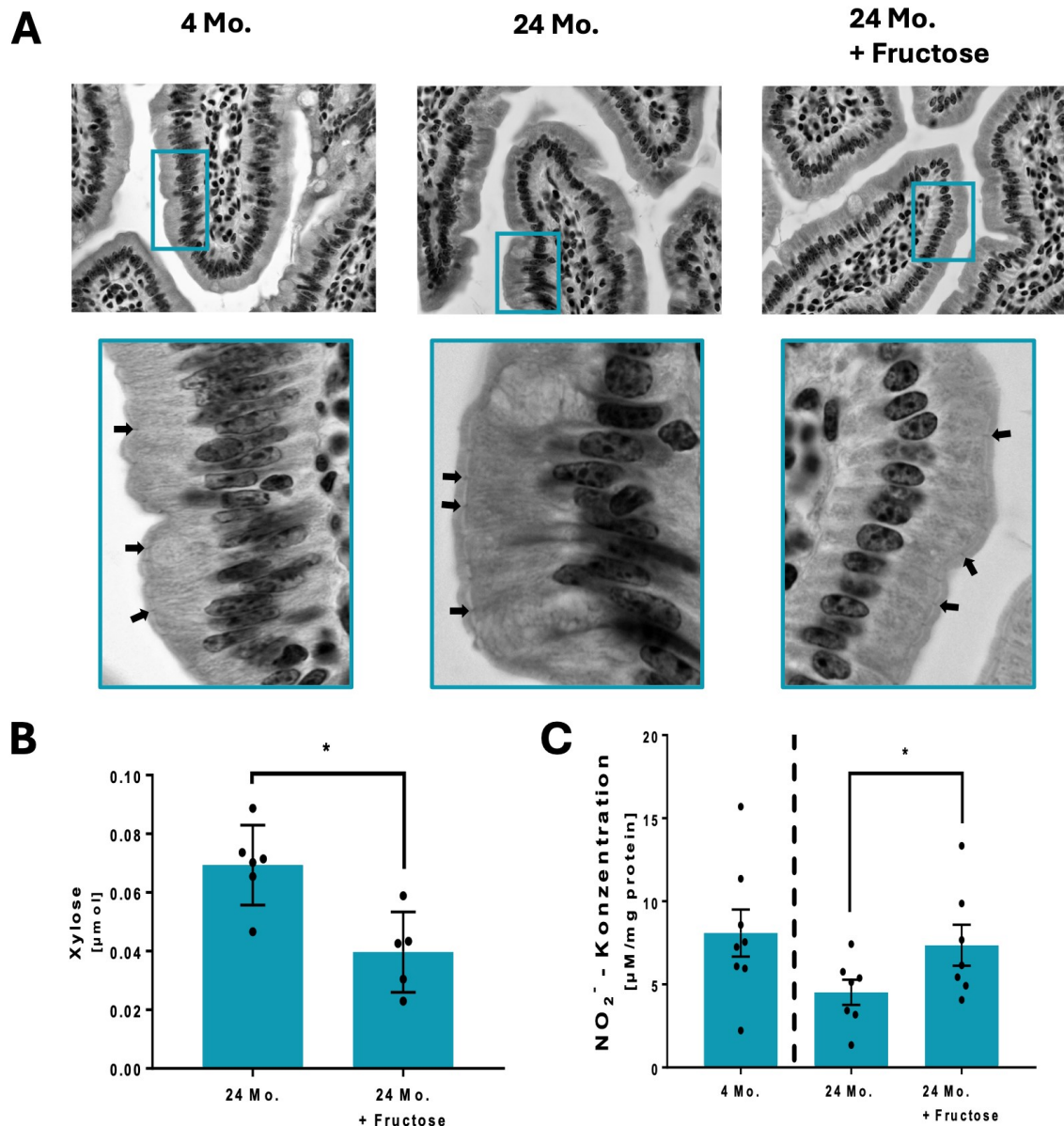


Abbildung 10: Der Einfluss einer Fructoseanreicherung im Trinkwasser auf die Parameter der Dünndarmbarriere **A** Repräsentative Bilder der ZO-1-Proteinfärbung im Duodenum der 4 Mo. & 24 Mo. alten Kontrollgruppen und der 24 Mo. alten Interventionsgruppe (Vergrößerung 630x). Die Pfeile kennzeichnen ZO-1 zwischen den Enterozyten der jeweiligen Bildabschnitte. **B** Der Effekt einer oralen 5%igen Fructosebehandlung über das Trinkwasser auf die D-Xylose-Permeation im ex vivo Everted-Sac-Modell von 24 Monate alten C57BL/6J-Mäusen. *Ein $p \leq 0,05$ im Vergleich zu 24 Monate alten Mäusen. **C** Der Effekt einer oralen 5%igen Fructosebehandlung über das Trinkwasser auf die altersinduzierten Veränderungen der NO_x-Konzentration im oberen Dünndarm. *Ein $p \leq 0.05$ im Vergleich zu 24 Monate alten Mäusen. Die Daten sind als Mittelwert (MW) $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. (n = 5-8 pro Gruppe) ZO-1 – Zonula Occludens-1; Mo. – Monate

Des Weiteren wurde *ex vivo* in Everted-Sac-Modellen des oberen Dünndarms bei den 24 Monate alten Kontroll- und fructosegefügterten Mäusen der Einfluss auf die Permeabilität des oberen Dünndarms untersucht, indem die D-Xylose-Konzentration bestimmt, wurde. (Abb. 10 B)

Die Daten zeigen, dass die orale Fructoseanreicherung über das Trinkwasser bei den 24 Monate alten Interventionsmäusen im Everted-Sac-Modell (Abb. 10 B) zu einer signifikanten Verringerung der D-Xylose-Permeation und somit zu einer Reduktion der D-Xylose-Konzentration geführt hat ($p \leq 0,05$).

Zur Untersuchung des Effektes von Fructose auf den NO-Stoffwechsel wurde die Nitritkonzentration im oberen Dünndarm von C57BL/6J-Mäusen gemessen. Das Experiment (Abb. 10 C) deutet darauf hin, dass die 4 Monate alten C57BL/6J-Mäuse die höchste Nitritkonzentration aufwiesen – wobei ihre Ergebnisse nicht in die statistische Auswertung einbezogen wurden. Bei den 24 Monate alten fructosegefügterten Mäusen zeigte sich im Vergleich zu den gleichaltrigen Kontrollmäusen eine mit 34 % signifikante Erhöhung der Nitritkonzentration ($p \leq 0,05$).

5. Diskussion

Metabolische Erkrankungen, Mangelernährung und kognitive sowie neurologische Einschränkungen sind Krankheitsbilder, deren Erkrankungsrisiko in alternden Organismen wie Mäusen oder Menschen erkennbar werden. (Jun Jin et al., 2020; Kritsilis et al., 2018; Salazar et al., 2013) Als Ätiologie dieser Krankheiten wird eine altersassoziierte Veränderung der Dünndarmbarrierefunktion mit einer erhöhten intestinalen Permeabilität diskutiert. In der vorliegenden Tierstudie wurde untersucht, ob eine 5%ige Fructoseanreicherung über das Trinkwasser die Marker der Zellalterung, die intestinale Permeabilität, die NO-Homöostase und somit die degenerativen Prozesse der Dünndarmbarriere im Alter beeinflussen könnte.

5.1 Einfluss von Fructose auf die Zellalterung: Altersabhängige Effekte und potenzielle Mechanismen

Zellseneszenz ist ein irreversibler Stillstand des Zellzyklus, gefolgt von verschiedenen zellulären Veränderungen wie der Akkumulation nicht-funktioneller Mitochondrien und Proteinaggregationen. (Kaufman, R. J., 2002; Nuss et al., 2008) Eigentlich dient Zellseneszenz als Schutzfunktion gegen unkontrolliertes Zellwachstum (Muñoz-Espín & Serrano, 2014), ist jedoch auch ein typisches Kennzeichen eines alternden Organismus. (Howcroft et al., 2013; Karin et al., 2019) Das Tumor-Suppressorgen p16, ein Inhibitor der cyclin-abhängigen Kinasen im Zellzyklus (Rayess et al., 2012), ist in seneszenten Zellen hochreguliert und verhindert somit deren Proliferation. (Qian & Chen, 2013) Dies führt unter anderem zur Verkümmern lebenswichtiger Organe wie Herz und Nieren und verkürzt die Lebensspanne von Mäusen und Menschen. (Baker et al., 2016) p16 eignet sich daher als Marker für Zellseneszenz und damit auch für zelluläre Alterung. (Baker et al., 2016; Karin et al., 2019; Safwan-Zaiter et al., 2022)

Obwohl die Ergebnisse dieser Studie in der alten Kontrollgruppe stark streuen, zeigte sich im Vergleich zur gleichaltrigen Kontrollgruppe eine geringere p16-Konzentration im Pfortaderplasma der fructosegefütterten Mäuse, was darauf hinweisen könnte, dass die regelmäßige Aufnahme kleiner Mengen Fructose den Alterungsprozess verlangsamt. Im Gegensatz dazu beobachteten Jang et al. (2019) bei weiblichen Mäusen, die eine

fettreiche Diät (60 % Fett) und eine 20%ige Fructoselösung erhielten, eine Hochregulation des Zellalterungsmarkers p16 im Hippocampus. (Jang et al., 2019) Wesentliche Unterschiede zwischen den Studien sind das Alter der Mäuse und weitere Ernährungsbestandteile wie das Fett: Während in der vorliegenden Arbeit ältere Mäuse (24 Monate) verwendet wurden, waren die Mäuse in der Studie von Jang et al. (2019) lediglich fünf Monate alt. Außerdem wurden die Mäuse aus der vorliegenden Arbeit nicht mit einer fettreichen Diät gefüttert. Dies legt nahe, dass die Zellalterungsprozesse durch Fructose möglicherweise auch vom Lebensalter und der allgemeinen Ernährung der Mäuse beeinflusst werden. (Petito et al., 2023)

Tierstudien mit jungen Mäusen weisen darauf hin, dass Fructose in Kombination mit weiteren Stressoren, wie z. B. freie Sauerstoffradikale und oxidativer Stress, eine pro-seneszente Wirkung entfalten könnte (Biala et al., 2015; Bratic & Larsson, 2013; Hajam et al., 2022), während sie in älteren Organismen – unter bestimmten Bedingungen – protektive Effekte auf die Zellalterung haben könnte. (Taylor et al., 2021; Zheng et al., 2017) Die vorliegenden Ergebnisse unterstreichen, dass die Effekte von Fructose auf Seneszenzmarker wie p16 nicht nur von der Gewebeart, sondern auch vom biologischen Alter abhängen könnten, jedoch ergibt sich daraus weiterer Forschungsbedarf.

5.2 Altersbedingte Veränderungen der Dünndarmbarriere: Die Rolle von Tight Junctions und der potenzielle Einfluss von Fructose

Eine defekte Dünndarmbarrierefunktion und die damit verbundene erhöhte Permeabilität werden häufig mit Darmerkrankungen wie z. B. chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) (Barmeyer et al., 2017) oder dem Reizdarmsyndrom (Piche et al., 2009; Schoultz & Keita, 2020) in Verbindung gebracht. Besonders im Alter spielt eine defekte Dünndarmbarriere eine wesentliche Rolle, da sie das Eindringen von Pathogenen erleichtert und somit Entzündungen gefördert werden können. Diese Entzündungen stehen wiederum mit neurodegenerativen und kognitiven Störungen oder Erkrankungen wie Alzheimer oder Demenz in Zusammenhang (Brandt et al., 2023), was auf die komplexe Wechselwirkung zwischen Darm und Hirn hinweist. (Socata et al., 2021; Wang et al., 2023)

Eine erhöhte Permeabilität wird oft durch strukturelle Schäden an den Epithelzellen, genauer an den TJ-Proteinen, hervorgerufen. Die Zellen werden von den TJ-Proteinen wie ZO-1 zusammengehalten und kontrollieren/regulieren den parazellulären Transport von Substanzen. (Matter & Balda, 2003) Mit dem Alter nimmt die Expression von ZO-1 häufig ab, was zu einer Schwächung der intestinalen Barriere führt. In einer Tierstudie mit 24 Monate alten Ratten wurde eine niedrigere ZO-1-Expression im Dünndarm festgestellt (Ren et al., 2014), welche die erhöhte Permeabilität im Alter erklärt. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein, die in repräsentativen Bildern eine geringere ZO-1-Verteilung in der älteren Kontrollgruppe im Vergleich zur jungen Kontrollgruppe zeigen. (Abb. 10 A)

Obwohl der Effekt des Alterns und die Ernährung für die menschliche Gesundheit schwer vergleichbare Faktoren sind, zeigten Studien, dass eine chronische fett- und fructosereiche Diät, ähnlich wie beim Alterungsprozess, die Konzentration von TJ-Proteinen wie ZO-1 im Dünndarm senkte. (Suzuki & Hara, 2010b; Volynets et al., 2010b) Bestätigt wurde dies anhand einer Studie, in der Mäuse 8 bis 16 Wochen lang eine Diät mit 30%iger Fructoseanreicherung im Trinkwasser und einer fettreichen Diät (60 % Fett) gefressen haben, was zu einer signifikanten Abnahme der ZO-1-Konzentration bei jungen Mäusen (8 bzw. 16 Wochen) führte. Die Kombination von Fett und Fructose in der Diät deutete auf eine erhöhte Schädigung der intestinalen Barriere mit erhöhten Endotoxin-Konzentrationen in der Pfortader. (Sellmann et al., 2015) Im Gegensatz dazu wurde in dieser Studie festgestellt, dass eine 5%ige Fructoselösung bei älteren Mäusen die ZO-1-Konzentration im Dünndarm nicht reduzierte. Die abnehmende Permeation von D-Xylose im *ex vivo* Everted-Sac-Modell (Abb. 10 B) unterstützt zudem einen potenziellen protektiven Effekt von Fructose auf die altersbedingte Störung der Dünndarmbarriere.

Eine mögliche Erklärung für die Schwächung der TJ-Proteine im Alter könnte die Aktivität der Protein-Phosphatase 2 A (PP2A) sein. PP2A wirkt der atypischen Proteinkinase C (aPKC) entgegen, die im Epithelgewebe eine Schlüsselrolle bei der Zellpolarität und der Bildung von Adherens Junctions und TJ-Proteinen wie ZO-1 spielt. (Moonwiryakit et al., 2023) Aufgrund von Dephosphorylierung verhindert PP2A die Aktivierung von aPKC und destabilisiert bestehende TJ-Proteine, was die parazelluläre Permeabilität erhöht. (Matter

& Balda, 2003) In einer Zellstudie zeigte die Hemmung von PP2A eine verbesserte Stabilität der TJ, Occludin und ZO-1 und zugleich eine reduzierte Permeabilität von Inulin. (Seth et al., 2007) Dies deutet darauf hin, dass PP2A als negativer Regulator der TJ fungieren könnte. (Moonwiryakit et al., 2023) Ob eine Hochregulation der PP2A im Alter tatsächlich die Bildung von Tight Junctions verhindern kann, muss in einem weiterführenden Forschungsvorhaben überprüft werden.

Taylor et al., (2021) zeigten, dass Fructose im Dünndarmepithel als Wachstumsfaktor wirkt und Zellwachstum eine Verlängerung der Darmzotten fördert, was wiederum die Absorptionsfläche für Nährstoffe erhöhen kann. (Taylor et al., 2021) Ihre Studie beschreibt, dass Fructose nach Aufnahme im Enterozyten zu Fructose-1-Phosphat verstoffwechselt wird und die Pyruvat-Kinase M 2 (PKM2) binden kann, ein Enzym der Glykolyse, das auch in Tumorzellen vorkommt. (Gupta & Bamezai, 2010; Luo & Semenza, 2012; Mazurek, 2011; Mazurek et al., 2005; Taylor et al., 2021) Diese Bindung transaktiviert den hypoxieinduzierten Faktor 1 α (HIF1 α), was Zellwachstum und Schutz vor hypoxischem Zelltod auslöst. (Li et al., 2015; Taylor et al., 2021) Nichtsdestotrotz muss in weiterführenden Untersuchungen geprüft werden, wie Fructose im Alter molekulare Mechanismen der Darmbarriere beeinflussen könnte.

5.3 Fructose und die altersbedingte Regulierung der NO-Homöostase: Auswirkungen auf die Darmbarrierefunktion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Nitritkonzentration im oberen Dünndarm nach der Fructoseintervention gemessen, um so einen indirekten Marker für die NO-Konzentration zu haben. NO fungiert als Botenstoff und erfüllt eine Rolle in der TJ-Regulation der intestinalen Epithelzellen. (Mu et al., 2019) Die NO-Produktion wird bei gesunden Organismen in den Epithelzellen durch die NO-Synthasen 1 und 3 (NOS1 und 3) reguliert (Korhonen et al., 2005), während die induzierte NOS (iNOS) hingegen bei entzündlichen Prozessen durch Zytokine hochreguliert wird (Salim et al., 2016; Salzman et al., 1995; Soufli et al., 2016; Vilar et al., 2014) und erhöhte Mengen an NO, das als Immunmodulator wirkt, produziert. (Mu et al., 2019)

Chronische Entzündungen können eine Überexpression von iNOS verursachen, was eine Überproduktion von NO und eine Schwächung der Barriere zur Folge hat. (Salzman et al., 1995) Stressoren wie hohe Alkohol- oder Fructosemengen sind in der Lage, eine Dysfunktion der Darmbarriere und eine Hochregulation der iNOS auszulösen, was zu Defekten in TJ-Proteinen wie ZO-1 führt. (Tang et al., 2015) Eine ähnliche Dysregulation wurde in einer Studie von Baumann et al., (2022) beobachtet: Mäuse, die eine cholesterin- und fructosereiche Diät erhielten, hatten nach 13 Wochen reduzierte ZO-1-Spiegel und erhöhte Nitritwerte im Dünndarm sowie eine erhöhte iNOS-Konzentration in der Leber. Die Kontrollgruppe hingegen zeigte niedrigere Nitritwerte, eine erhöhte ZO-1-Expression und eine vergleichsweise niedrigere iNOS-Konzentration in der Leber. (Baumann et al., 2022) Obwohl in dieser Tierstudie die Mäuse nicht mit einer fettreichen Diät gefüttert wurden, waren nach der 7-monatigen Fructosediet bei den alten Mäusen erhöhte Nitritwerte zu beobachten.

Während in der vorliegenden Arbeit die iNOS-Konzentration nicht gemessen wurde, stützen frühere Untersuchungen, dass eine chronische Fructoseaufnahme die iNOS-Expression und die NO-Synthese im Dünndarm fördert und so die Darmbarriere schädigen kann. (Mu et al., 2019; Spruss et al., 2011) Des Weiteren wurde in Studien gezeigt, dass mit dem Alter die Nitritkonzentration im Dünndarm abnimmt und somit eine erhöhte Darmpermeabilität fördert. (Baumann et al., 2021; Ren et al., 2014; Tran & Greenwood-Van Meerveld, 2013; Tremblay et al., 2017) Ein Grund dafür könnte die Hochregulation der Arginase-Aktivität sein. (Brandt et al., 2022)

Die Arginase ist ein Enzym, das im Harnstoffzyklus den letzten Schritt katalysiert, indem es L-Arginin in L-Ornithin und Harnstoff umwandelt. (Wu & Morris, 1998) Eine hochregulierte Aktivität der Arginase kann die NO-Synthese beeinträchtigen, da zu viel L-Arginin abgebaut wird. Dadurch steht der NOS weniger L-Arginin zur Verfügung, was die Bildung von NO verringert. (Caldwell et al., 2018) Hinzu kommt, dass der verstärkte Abbau von L-Arginin durch die Arginase nicht nur die Verfügbarkeit von L-Arginin für die NO-Synthese reduziert, sondern auch die Expression der iNOS herunterreguliert. Zudem hemmt die Arginase die iNOS-vermittelte NO-Produktion direkt durch die Bildung von

Harnstoff, was die Synthese von NO weiter beeinträchtigt. (El-Gayar et al., 2003; Lee et al., 2003; Prabhakar et al., 1997)

Studien weisen darauf hin, dass die Aktivität der Arginase im Darm altersbedingt induziert ist. Dies zeigte sich zumindest in endothelialen Zellen der Aorta von alten Ratten (24 Monaten), wo Arginase 1 hochreguliert war und die NOS herunterreguliert war. (Berkowitz et al., 2003) Diese altersbedingte Abnahme der NO-Konzentration und eine erhöhte Arginase-Aktivität werden durch Beobachtungen von Brandt et al., (2022) bestätigt, die bei alten Mäusen (24 Monate) niedrigere Nitritwerte, eine niedrigere iNOS-mRNA-Expression, eine erhöhte Arginase-Aktivität, reduzierte ZO-1-Konzentrationen und *ex vivo* eine erhöhte D-Xylose-Permeation im Everted-Sac-Modell fanden und somit eine altersbedingte geschädigte Darmbarriere mit erhöhter Permeabilität induziert wurde. (Brandt et al., 2022)

Wie oben bereits erwähnt, wurde in dieser Studie weder die Expression noch die Aktivität von NOS und iNOS sowie die Aktivität der Arginase bestimmt. Aber hier wurde festgestellt, dass alte gesunde Mäuse (24 Monate) im Vergleich zur jungen Kontrollgruppe (4 Monate) niedrigere Nitritspiegel aufwiesen. Diese altersbedingte Abnahme der NO-Konzentration bestätigt die Beobachtungen von Brandt et al., (2022). Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass Fructose im Alter einen Einfluss auf die NO-Homöostase haben könnte. Allerdings fehlen bislang umfassende Studien, um diesen Effekt und seine Mechanismen im Detail zu verstehen. (Staltner et al., 2023)

Trotz dieser Erkenntnisse gibt es zu dieser Studie einige zu berücksichtigende Limitationen, die die Aussagekraft und Übertragbarkeit der Ergebnisse einschränken. Hierzu zählen: die Stichprobengröße, das Geschlecht der Tiere, die Dauer der Intervention, die Dosis und die Darreichungsform (Mastrocola et al., 2018) der Fructoseintervention.

6. Fazit

Angeichts der alternden Bevölkerung und der damit verbundenen Zunahme altersbedingter Gesundheitsprobleme ist es von Bedeutung, die Mechanismen der altersinduzierten degenerativen Prozesse der Dünndarmbarrierefunktion zu untersuchen und zu verstehen. Dies könnte nicht nur die Altersforschung voranbringen, sondern auch neue Ansätze zur Gesundheitsförderung ermöglichen.

Die Ergebnisse der Arbeit deuten darauf hin, dass eine 5%ige Fructoseanreicherung im Trinkwasser möglicherweise Alterungsprozesse verlangsamen könnte, nahegelegt durch die Reduktion des Zellalterungsmarkers p16. Zudem hat die Fructoseintervention einen protektiven Effekt auf die Dünndarmbarriere gezeigt, belegt durch eine unveränderte ZO-1-Expression und eine im *ex vivo* Everted-Sac-Modell verringerte D-Xylose-Permeation. Die erhöhten Nitritspiegel bei fructosegefütterten Mäusen könnten eine Rolle bei der Regulierung der NO-Homöostase spielen und somit die Barrierefunktion unterstützen.

Die Analyse der bestehenden Literatur hat gezeigt, dass die vorliegende Arbeit neuartige Aspekte beleuchtet. Während der Einfluss von Fructose auf Lebensdauer, Darmpermeabilität und NO-Homöostase bereits untersucht wurde, ist dies die erste Arbeit, die in diesem Zusammenhang altersbedingte Veränderungen der Dünndarmbarriere und der intestinalen Permeabilität bei älteren Mäusen betrachtet. Dennoch bleiben die molekularen Prozesse, einschließlich der Rolle weiterer Tight Junction-Proteine (z. B. Occludin) sowie die Enzym-Aktivitäten der Arginase und (i)NOS, weitgehend ungeklärt.

Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass Fructose bei älteren Organismen potenziell protektive Effekte auf die Darmbarrierefunktion und die NO-Homöostase haben kann. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Effekte von Fructose auf die molekularen Mechanismen des Alterns und die intestinale Permeabilität vollständig zu verstehen.

7. Zusammenfassung

Die zunehmende Alterung der globalen Bevölkerung geht mit einer steigenden Prävalenz altersassoziierter Gesundheitsprobleme einher, darunter degenerative Veränderungen des Dünndarms. Um die Gesundheit und die Lebensqualität im Alter zu erhalten, sind neue präventive Strategien von entscheidender Bedeutung. Während Studien darauf hinweisen, dass ein Überkonsum an Fructose im Tiermodell und beim Menschen die Darmbarrierefunktion beeinträchtigen kann, wurde bislang nicht untersucht, ob eine geringe Fructosezufuhr die altersassozierten Störungen der Dünndarmbarriere beeinflussen könnte. Die vorliegende Studie untersuchte in einem Mausmodell, ob eine 5%ige Anreicherung des Trinkwassers mit Fructose altersinduzierte Veränderungen der Dünndarmbarrierefunktion beeinflussen könnte. 28 männliche C57BL/6J-Mäuse wurden in eine junge (2 Monate alte) Kontrollgruppe und in alte (17 Monate alte) Kontroll- und Interventionsgruppen aufgeteilt. Sowohl die junge als auch die alte Kontrollgruppe wurden mit Standard-Pelletfutter und Trinkwasser *ad libitum* gefüttert, währenddessen die Behandlungsgruppe über 7 Monate hinweg mit 5 % fructosehaltigem Trinkwasser und Standard-Pelletfutter *ad libitum* gefüttert wurde. Zur Analyse der Hypothese wurden Marker der Zellerterung (p16) im Pfortaderplasma mittels der Semi-Dry-Western-Blot-Methode bestimmt, Marker der intestinalen Permeabilität (ZO-1) immunhistochemisch gefärbt, die Permeation von D-Xylose *ex vivo* im Everted-Sac-Modell sowie die Nitritkonzentration im Duodenum als Marker der NO-Homöostase nach dem GRIESS-Assay bestimmt. Die Mäuse, die eine 5%ige Fructoseanreicherung über das Trinkwasser erhielten, wiesen im Vergleich zu den Mäusen, die einfaches Trinkwasser erhielten, geringere p16-Plasmakonzentrationen auf. Zudem wurde in der *ex vivo*-Untersuchung eine geringere Permeation von D-Xylose nachgewiesen, unterstützt durch einen geringeren Verlust des Tight Junction-Proteins ZO-1 im oberen Dünndarm. Zusätzlich ging die Fructoseintervention mit einer Erhöhung der NO-Spiegel im Dünndarm einher. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein geringer Fructosekonsum im Alter schützende Effekte auf die altersinduzierten Veränderungen der Dünndarmbarriere haben könnte. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen des Alterns zu untersuchen und die potenzielle Übertragbarkeit auf den Menschen zu verstehen.

8. Summary

The increasing age of the global population is associated with a rising prevalence of age-related health problems, including degenerative changes in the small intestine. To maintain health and quality of life in old age, new preventive strategies are of crucial importance. While studies show that excessive fructose intake can alter the intestinal barrier function in both animal and human models, it has not yet been investigated whether moderate fructose consumption could influence age-related disruptions of the small intestinal barrier. This study examined in a mouse model whether the 5 % fortified fructose of drinking water will affect age-induced changes in small intestinal barrier function. Twenty-eight male C57BL/6J mice were divided into a young (2 months) control group and old (17 months) control and intervention groups. Both the young and the old control groups received a standard chow diet and drinking water *ad libitum*, while the intervention group was provided with 5 % fructose-fortified drinking water and standard chow diet *ad libitum* over a period of seven months. In order to examine the hypothesis, markers of cellular senescence (p16) were measured in portal vein plasma using the semi-dry Western Blot method, markers of intestinal permeability (ZO-1) were determined immunohistochemically, while D-xylose permeability was determined with an *ex vivo* everted gut sac model, and nitrite concentration as a marker of NO homeostasis was measured with a GRIESS assay. Mice that received the 5 % fructose-fortified water had lower p16 plasma concentrations compared to those given regular water. Additionally, employing an *ex vivo* everted gut sac model showed improved D-xylose permeability supported by reduced loss of the tight junction protein ZO-1 in the duodenum. The fructose intervention was also associated with increased levels of nitrite in the duodenum. These findings suggest that a low fructose consumption in old age may have protective effects on age-induced changes in the small intestinal barrier. Further studies are needed to explore the underlying molecular mechanisms of ageing and to assess the potential transferability to humans.

9. Literaturverzeichnis

abcam. (2022, Februar 21). *Western blot protocol*. Internet: <https://www.abcam.com/en-us/technical-resources/protocols/western-blot> (Stand: 26.11.24)

Im Text: (abcam, 2022)

abcam. (2024). *Protein transfer and visualization in western blot*. Internet: <https://www.abcam.com/en-us/technical-resources/guides/western-blot-guide/protein-transfer-and-visualization-in-western-blot> (Stand: 26.11.24)

Im Text: (abcam, 2024)

Agilent Technologies Inc. (2022a). *Dako EnVision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit Code-Nr. K4003* (S. 1–5). Internet: www.agilent.com (Stand: 26.11.24)

Im Text: (Agilent Technologies Inc., 2022a)

Agilent Technologies Inc. (2022b). *Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System Code-Nr. K3467* (S. 1–3). Internet: www.agilent.com (Stand: 26.11.24)

Im Text: (Agilent Technologies Inc., 2022b)

Aoun, R., Chokor, F. A. Z., Taktouk, M., Nasrallah, M., Ismaeel, H., Tamim, H., & Nasreddine, L. (2022). Dietary fructose and its association with the metabolic syndrome in Lebanese healthy adults: a cross-sectional study. *Diabetology and Metabolic Syndrome*, 14(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13098-022-00800-5>

Im Text: (Aoun et al., 2022)

Baker, D. J., Childs, B. G., Durik, M., Wijers, M. E., Sieben, C. J., Zhong, J., A. Saltness, R., Jeganathan, K. B., Verzosa, G. C., Pezeshki, A., Khazaie, K., Miller, J. D., & Van Deursen, J. M. (2016). Naturally occurring p16 Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*, 530(7589), 184–189. <https://doi.org/10.1038/nature16932>

Im Text: (Baker et al., 2016)

Barmeyer, C., Fromm, M., & Schulzke, J.-D. (2017). Active and passive involvement of claudins in the pathophysiology of intestinal inflammatory diseases. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 469(1), 15-26. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1914-6>

Im Text: (Barmeyer et al., 2017)

Baumann, A., Hernández-Arriaga, A., Brandt, A., Sánchez, V., Nier, A., Jung, F., Kehm, R., Höhn, A., Grune, T., Frahm, C., Witte, O. W., Camarinha-Silva, A., & Bergheim, I. (2021). Microbiota profiling in aging-associated inflammation and liver degeneration. *International Journal of Medical Microbiology*, 311(4), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2021.151500>

Im Text: (Baumann et al., 2021)

Baumann, A., Rajcic, D., Brandt, A., Sánchez, V., Jung, F., Staltner, R., Nier, A., Trauner, M., Staufer, K., & Bergheim, I. (2022). Alterations of nitric oxide homeostasis as trigger of intestinal barrier dysfunction in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 26(4), 1206-1218. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17175>

Im Text: (Baumann et al., 2022)

Beard, J. R., Officer, A., De Carvalho, I. A., Sadana, R., Pot, A. M., Michel, J. P., Lloyd-Sherlock, P., Epping-Jordan, J. E., Peeters, G. M. E. E., Mahanani, W. R., Thiyagarajan, J. A., & Chatterji, S. (2016). The World report on ageing and health: A policy framework for healthy ageing. *The Lancet*, 387(10033), 2145-2154. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00516-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00516-4)

Im Text: (Beard et al., 2016)

Berkowitz, D. E., White, R., Li, D., Minhas, K. M., Cernetich, A., Kim, S., Burke, S., Shoukas, A. A., Nyhan, D., Champion, H. C., & Hare, J. M. (2003). Arginase Reciprocally Regulates Nitric Oxide Synthase Activity and Contributes to Endothelial Dysfunction in Aging Blood Vessels. *Circulation*, 108(16), 2000-2006. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000092948.04444.C7>

Im Text: (Berkowitz et al., 2003)

Biala, A. K., Dhingra, R., & Kirshenbaum, L. A. (2015). Mitochondrial dynamics: Orchestrating the journey to advanced age. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 83, 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.04.015>

Im Text: (Biala et al., 2015)

Bio-Rad Laboratories. (2024). *Bio-Rad Protein Assay*. Internet: <https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT33.pdf> (Stand: 26.11.24)

Im Text: (Bio-Rad Laboratories, 2024)

Boccardi, V., Esposito, A., Rizzo, M. R., Marfella, R., Barbieri, M., & Paolisso, G. (2013). Mediterranean Diet, Telomere Maintenance and Health Status among Elderly. *PLoS ONE*, 8(4), e62781. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062781>

Im Text: (Boccardi et al., 2013)

Boyce, J. M., & Shone, G. R. (2006). Effects of ageing on smell and taste. *Postgraduate Medical Journal*, 82(966), 239-241. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2005.039453>

Im Text: (Boyce & Shone, 2006)

Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, 72, 248-254.

Im Text: (Bradford, M. M., 1976)

Brandt, A., Baumann, A., Hernández-Arriaga, A., Jung, F., Nier, A., Staltner, R., Rajcic, D., Schmeer, C., Witte, O. W., Wessner, B., Franzke, B., Wagner, K. H., Camarinha-Silva, A., & Bergheim, I. (2022). Impairments of intestinal arginine and NO metabolisms trigger aging-associated intestinal barrier dysfunction and 'inflammaging'. *Redox Biology*, 58, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102528>

Im Text: (Brandt et al., 2022)

Brandt, A., Kromm, F., Hernández-Arriaga, A., Martínez Sánchez, I., Bozkir, H. Ö., Staltner, R., Baumann, A., Camarinha-Silva, A., Heijtz, R. D., & Bergheim, I. (2023). Cognitive Alterations in Old Mice Are Associated with Intestinal Barrier Dysfunction and Induced Toll-like Receptor 2 and 4 Signaling in Different Brain Regions. *Cells*, 12(17), 1-18. <https://doi.org/10.3390/cells12172153>

Im Text: (Brandt et al., 2023)

Bratic, A., & Larsson, N.-G. (2013). The role of mitochondria in aging. *Journal of Clinical Investigation*, 123(3), 951–957. <https://doi.org/10.1172/JCI64125>

Im Text: (Bratic & Larsson, 2013)

Britton, E., & McLaughlin, J. T. (2013). Ageing and the gut. *Proceedings of the Nutrition Society*, 72(1), 173-177. <https://doi.org/10.1017/S0029665112002807>

Im Text: (Britton & McLaughlin, 2013)

Bronikowski, A. M., & Flatt, T. (2010). Aging and its demographic measurement. *Nature Education Knowledge*, 1(12). <https://www.researchgate.net/publication/294701842>

Im Text: (Bronikowski & Flatt, 2010)

Bundesarbeiterkammer. (2024). *Alterspension*. Internet: [https://www.arbeiterkammer.at/beratung/arbeitundrecht/pension/pensionsformen/Alterspension.html#:~:text=Welt%20gekommen%20sind.-,Wann%20kann%20ich%20frühestens%20in%20Pension%20gehen%3F,einheitliches%20Regelpensionsalter%20von%2065%20Jahren.\(Stand:26.11.24\)](https://www.arbeiterkammer.at/beratung/arbeitundrecht/pension/pensionsformen/Alterspension.html#:~:text=Welt%20gekommen%20sind.-,Wann%20kann%20ich%20frühestens%20in%20Pension%20gehen%3F,einheitliches%20Regelpensionsalter%20von%2065%20Jahren.(Stand:26.11.24))

Im Text: (Bundesarbeiterkammer, 2004)

Caldwell, R. W., Rodriguez, P. C., Toque, H. A., Priya Narayanan, S., & Caldwell, R. B. (2018). Arginase: A multifaceted enzyme important in health and disease. *Physiological Reviews*, 98(2), 641–665. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2016>

Im Text: (Caldwell et al., 2018)

Camilleri, M. (2019). Leaky gut: mechanisms, measurement and clinical implications in humans. *Gut*, 68(8), 1516-1526. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318427>

Im Text: (Camilleri, M., 2019)

Carl Roth GmbH + Co. KG. (2022). *Hämatoxylin/Eosin-Färbung H & E* (S. 1–2). Internet: <https://www.carlroth.com/medias/Infobroschuere-HundE-Faerbung-DE.pdf?context=bWFzdGVyfHRlY2huaWNhbERvY3VtZW50c3wyMzE4OTg4YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHRlY2huaWNhbERvY3VtZW50cy9oZTgvaGE5LzlxMTY3Mzc4MzA5NDlu cGRmfDAwMDI5ODVjMzBlODVjYWI1MzRiNjBiMml0ZjEzYjQxZGNkYTg5NGM4NDBiZm MyZjYwMjA3NmM4N2I5MTA1YWU> (Stand: 26.11.24)

Im Text: (Carl Roth GmbH + Co. KG, 2022)

Cho, Y., Kim, D., Seo, W., Gao, B., Yoo, S., & Song, B. (2021). Fructose Promotes Leaky Gut, Endotoxemia, and Liver Fibrosis Through Ethanol-Inducible Cytochrome P450-2E1-Mediated Oxidative and Nitritative Stress. *Hepatology*, 73(6), 2180-2195. <https://doi.org/10.1002/hep.30652>

Im Text: (Cho et al., 2021)

Chou, Y.-C., Lee, M.-S., Chiou, J.-M., Chen, T.-F., Chen, Y.-C., & Chen, J.-H. (2019). Association of Diet Quality and Vegetable Variety with the Risk of Cognitive Decline in Chinese Older Adults. *Nutrients*, 11(7), 1666. <https://doi.org/10.3390/nu11071666>

Im Text: (Chou et al., 2019)

Cummings, J. H., & Stephen, A. M. (2007). Carbohydrate terminology and classification. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61(61), S5-S18. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602936>

Im Text: (Cummings & Stephen, 2007)

De Winter, G. (2015). Aging as Disease. *Medicine, Health Care and Philosophy*, 18(2), 237-243. <https://doi.org/10.1007/s11019-014-9600-y>

Im Text: (De Winter, G., 2015)

Debras, C., Chazelas, E., Srour, B., Kesse-Guyot, E., Julia, C., Zelek, L., Agaesse, C., Druesne-Pecollo, N., Galan, P., Hercberg, S., Latino-Martel, P., Deschasaux, M., & Touvier, M. (2020). Total and added sugar intakes, sugar types, and cancer risk: Results from the prospective NutriNet-Santé cohort. *American Journal of Clinical Nutrition*, 112(5), 1267-1279. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqaa246>

Im Text: (Debras et al., 2020)

Douglas, S. G. (1981). A Rapid Method for the Determination of Pentosans in Wheat Flour. In *Food Chemistry* (Bd. 7).

Im Text: (Douglas, S. G., 1981)

El-Gayar, S., Thüring-Nahler, H., Pfeilschifter, J., RölinghoO, M., & Bogdan, C. (2003). Translational Control of Inducible Nitric Oxide Synthase by IL-13 and Arginine Availability in Inflammatory Macrophages. *The Journal of Immunology*, 171(9), 4561-4568. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.9.4561>

Im Text: (El-Gayar et al., 2003)

Febbraio, M. A., & Karin, M. (2021). “Sweet death”: Fructose as a metabolic toxin that targets the gut-liver axis. *Cell Metabolism*, 33(12), 2316-2328. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.09.004>
Im Text: (Febbraio & Karin, 2021)

Ferraris, R. P., Choe, J. Y., & Patel, C. R. (2018). Intestinal absorption of fructose. *Annual Review of Nutrition*, 38, 41–67. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-082117-051707> Im Text: (Ferraris et al., 2018)

Freid, V. M., Bernstein, A. B. D., & Bush, M. A. (2012). *Multiple Chronic Conditions Among Adults Aged 45 and Over: Trends Over the Past 10 Years Key findings. NCHS data brief, no 100*. Internet: http://www.cdc.gov/nchs/data/databriefs/db100_tables.pdf#1. Im Text: (Freid et al., 2018)

Gäbele, E., Dostert, K., Hofmann, C., Wiest, R., Schölmerich, J., Hellerbrand, C., & Obermeier, F. (2011). DSS induced colitis increases portal LPS levels and enhances hepatic inflammation and fibrogenesis in experimental NASH. *Journal of Hepatology*, 55(6), 1391-1399. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.02.035>
Im Text: (Gäbele et al., 2011)

Geidl-Flueck, B., & Gerber, P. A. (2017). Insights into the hexose liver metabolism – glucose versus fructose. *Nutrients*, 9(9), 1-21. <https://doi.org/10.3390/nu9091026>
Im Text: (Geidl-Flueck & Gerber, 2017)

Goldman, A., Harper, S., & Speicher, D. W. (2016). Detection of proteins on blot membranes. *Current Protocols in Protein Science*, 2016, 10.8.1-10.8.11. <https://doi.org/10.1002/cpps.15>
Im Text: (Goldman et al., 2016)

Goldring, J. P. D. (2019). Measuring protein concentration with absorbance, lowry, bradford coomassie blue, or the smith bicinchoninic acid assay before electrophoresis. In B. T. Kurien & R. Hal Scofield (Hrsg.), *Electrophoretic Separation of Proteins: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology* (Bd. 1855, S. 31-39). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8793-1_3
Im Text: (Goldring, J. P. D., 2019)

Gupta, V., & Bamezai, R. N. K. (2010). Human pyruvate kinase M2: A multifunctional protein. *Protein Science*, 19(11), 2031-2044. <https://doi.org/10.1002/pro.505>
Im Text: (Gupta & Bamezai, 2010)

Hajam, Y. A., Rani, R., Ganie, S. Y., Sheikh, T. A., Javaid, D., Qadri, S. S., Pramodh, S., Alsulimani, A., Alkhanani, M. F., Harakeh, S., Hussain, A., Haque, S., & Reshi, M. S. (2022). Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives. *Cells*, 11(3), 552. <https://doi.org/10.3390/cells11030552>
Im Text: (Hajam et al., 2022)

Hayashi, M., Hirose, H., Senga, S., Onitsuka, A., Fuwa, S., Mori, Y., & Yamada, T. (2000). Effect of Portal Hypertension Caused by Chronic High Venous Pressure on Small-Intestinal Sugar Absorption. *Nutrition*, 16, 30–33.
Im Text: (Hayashi et al., 2000)

Helmich, U. (2021). Monosaccharide: Einteilung nach der funktionellen Gruppe. Internet: <https://www.u-helmich.de/el/02-Kohlenhydrate/Kohlenhydrate.html> (Stand: 26.11.24)
Im Text: (Helmich, U., 2021)

Herman, M. A., & Birnbaum, M. J. (2021). Molecular aspects of fructose metabolism and metabolic disease. *Cell Metabolism*, 33(12), 2329-2354.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.09.010>
Im Text: (Herman & Birnbaum, 2021)

Hidayat, R., & Wulandari, P. (2021). Western Blotting (WB) Technique Guideline for Separation and Isolation of Protein. *Bioscientia Medicina: Journal of Biomedicine & Translational Research*, 5(4), 367–380. <https://doi.org/10.32539/bsm.v5i4.229>
Im Text: (Hidayat & Wulandari, 2021)

Hollander, D., & Tarnawski, H. (1985). Aging-Associated Increase in Intestinal Absorption of Macromolecules. *Gerontology*, 31(3), 133-137. <https://doi.org/10.1159/000212694>
Text: (Hollander & Tarnawski, 1985)

Hosseini-Esfahani, F., Bahadoran, Z., Mirmiran, P., Hosseinpour-Niazi, S., Hosseinpour, F., & Azizi, F. (2011). Dietary fructose and risk of metabolic syndrome in adults: Tehran Lipid and Glucose study. *Nutrition and Metabolism*, 8, 1-8.
<https://doi.org/10.1186/1743-7075-8-50>
Im Text: (Hosseini-Esfahani et al., 2011)

Howcroft, T. K., Campisi, J., Louis, G. B., Smith, M. T., Wise, B., Wyss-Coray, T., Augustine, A. D., McElhaney, J. E., Kohanski, R., & Sierra, F. (2013). The role of inflammation in age-related disease. *Aging*, 5(1), 84–93. <https://doi.org/10.18632/aging.100531>
Im Text: (Howcroft et al., 2013)

Ismay, D. (1950). Some colour reactions of phloroglucinol. *Journal of the Society of Chemical Industry*, 69(2), 58-60. <https://doi.org/10.1002/jctb.5000690207>
Im Text: (Ismay, D., 1950)

Jacques, P. F., & Tucker, K. L. (2001). Are dietary patterns useful for understanding the role of diet in chronic disease? *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 1-2.
Im Text: (Jacques & Tucker, 2001)

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 Metabolism*, 27(2), 351-361.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.016>

Im Text: (C. Jang et al., 2018)

Jang, Y., Kwon, I., Cosio-Lima, L., Wirth, C., Vinci, D. M., & Lee, Y. (2019). Endurance Exercise Prevents Metabolic Distress-induced Senescence in the Hippocampus. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 51(10), 2012-2024. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000002011>

Im Text: (Jang et al., 2019)

Johnson, K. O., Shannon, O. M., Matu, J., Holliday, A., Ispoglou, T., & Deighton, K. (2020). Differences in circulating appetite-related hormone concentrations between younger and older adults: a systematic review and meta-analysis. *Aging Clinical and Experimental Research*, 32(7), 1233-1244. <https://doi.org/10.1007/s40520-019-01292-6>

Im Text: (Johnson et al., 2020)

Jun Jin, C., Baumann, A., Brandt, A., Janina Engstler, A., Nier, A., Hege, M., Schmeer, C., Kehm, R., Höhn, A., Grune, T., Witte, O. W., & Bergheim, I. (2020). Aging-related liver degeneration is associated with increased bacterial endotoxin and lipopolysaccharide binding protein levels. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 318, 736-747. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00345.2018.-Aging>

Im Text: (Jun Jin et al., 2020)

Karin, O., Agrawal, A., Porat, Z., Krizhanovsky, V., & Alon, U. (2019). Senescent cell turnover slows with age providing an explanation for the Gompertz law. *Nature Communications*, 10(1), 5495. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13192-4>

Im Text: (Karin et al., 2019)

Katsube, T., Tsuji, H., & Onoda, M. (2007). Nitric oxide attenuates hydrogen peroxide-induced barrier disruption and protein tyrosine phosphorylation in monolayers of intestinal epithelial cell. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1773(6), 794-803. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.03.002>

Im Text: (Katsube et al., 2007)

Katz, D., Hollander, D., Said, H. M., & Dadufalza, V. (1987). Aging-associated increase in intestinal permeability to polyethylene glycol 900. *Digestive Diseases and Sciences*, 32(3), 285-288. <https://doi.org/10.1007/BF01297055>

Im Text: (Katz et al., 1987)

Kaufman, R. J. (2002). Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *Journal of Clinical Investigation*, 110(10), 1389-1398. <https://doi.org/10.1172/JCI16886>

Im Text: (Kaufman, R. J., 2002)

Kelishadi, R., Mansourian, M., & Heidari-Beni, M. (2014). Association of fructose consumption and components of metabolic syndrome in human studies: A systematic review and meta-analysis. *Nutrition*, 30(5), 503-510. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.08.014>

Im Text: (Kelishadi et al., 2014)

Khalatbari-Soltani, S., Marques-Vidal, P., Imamura, F., & Forouhi, N. G. (2020). Prospective association between adherence to the Mediterranean diet and hepatic steatosis: the Swiss CoLaus cohort study. *BMJ Open*, 10(12), e040959. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-040959>

Im Text: (Khalatbari-Soltani et al., 2020)

Kieft-De Jong, J. C., Mathers, J. C., & Franco, O. H. (2014). Nutrition and healthy ageing: The key ingredients. *Proceedings of the Nutrition Society*, 73(2), 249-259. <https://doi.org/10.1017/S0029665113003881>

Im Text: (Kieft-De Jong et al., 2014)

Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L. (2020). Bradford assay for determining protein concentration. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020(4), 136-138. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot102269>

Im Text: (Kielkopf et al., 2020)

Kim, S. W., Roh, J., & Park, C. S. (2016). Immunohistochemistry for pathologists: Protocols, pitfalls, and tips. *Journal of Pathology and Translational Medicine*, 50(6), 411-418. <https://doi.org/10.4132/jptm.2016.08.08>

Im Text: (Kim et al., 2016)

Kiszonas, A. M., Courtin, C. M., & Morris, C. F. (2012). A critical assessment of the quantification of wheat grain arabinoxylans using a phloroglucinol colorimetric assay. *Cereal Chemistry*, 89(3), 143-150. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-02-12-0016-R>

Im Text: (Kiszonas et al., 2012)

Korhonen, R., Lahti, A., Kankaanranta, H., & Moilanen, E. (2005). Nitric Oxide Production and Signaling in Inflammation. *Current Drug Target -Inflammation & Allergy*, 4(4), 471-479. <https://doi.org/10.2174/1568010054526359>

Im Text: (Korhonen et al., 2005)

Kritsilis, M., V. Rizou, S., Koutsoudaki, P. N., Evangelou, K., Gorgoulis, V. G., & Papadopoulos, D. (2018). Ageing, Cellular Senescence and Neurodegenerative Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 2937. <https://doi.org/10.3390/ijms19102937>

Im Text: (Kritsilis et al., 2018)

König, J., Wells, J., Cani, P. D., García-Ródenas, C. L., MacDonald, T., Mercenier, A., Whyte, J., Troost, F., & Brummer, R. J. (2016). Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease. *Clinical and translational gastroenterology*, 7(10), e196. <https://doi.org/10.1038/ctg.2016.54>

Im Text: (König et al., 2016)

Kühn, F., Adiliaghdam, F., Cavallaro, P. M., Hamarneh, S. R., Tsurumi, A., Hoda, R. S., Munoz, A. R., Dhole, Y., Ramirez, J. M., Liu, E., Vasan, R., Liu, Y., Samarbafzadeh, E., Nunez, R. A., Farber, M. Z., Chopra, V., Malo, M. S., Rahme, L. G., & Hodin, R. A. (2020). Intestinal alkaline phosphatase targets the gut barrier to prevent aging. *JCI Insight*, 5(6). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.134049>

Im Text: (Kühn et al., 2020)

Kyriazis, M. (2020). Ageing Throughout History: The Evolution of Human Lifespan. *Journal of Molecular Evolution*, 88(1), 57-65. <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09896-2>

Im Text: (Kyriazis, M., 2020)

Lee, J., Ryu, H., Ferrante, R. J., Morris, S. M., & Ratan, R. R. (2003). Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8), 4843-4848. <https://doi.org/10.1073/pnas.0735876100>

Im Text: (Lee et al., 2003)

Leitão, C., Mignano, A., Estrela, M., Fardilha, M., Figueiras, A., Roque, F., & Herdeiro, M. T. (2022). The Effect of Nutrition on Aging – A Systematic Review Focusing on Aging-Related Biomarkers. *Nutrients*, 14, 1-29. <https://doi.org/10.3390/nu14030554>

Im Text: (Leitão et al., 2022)

Li, Q., Zhang, D., Chen, X., He, L., Li, T., Xu, X., & Li, M. (2015). Nuclear PKM2 contributes to gefitinib resistance via upregulation of STAT3 activation in colorectal cancer. *Scientific Reports*, 5(1), 16082. <https://doi.org/10.1038/srep16082>

Im Text: (Li et al., 2015)

Luo, W., & Semenza, G. L. (2012). Emerging roles of PKM2 in cell metabolism and cancer progression. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(11), 560-566. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.06.010>

Im Text: (Luo & Semenza, 2012)

Marriott, B. P., Cole, N., & Lee, E. (2009). National estimates of dietary fructose intake increased from 1977 to 2004 in the United States. *Journal of Nutrition*, 139(6), 1228S-1235S. <https://doi.org/10.3945/jn.108.098277>

Im Text: (Marriott et al., 2009)

Mastrocola, R., Ferrocino, I., Liberto, E., Chiazza, F., Cento, A. S., Collotta, D., Querio, G., Nigro, D., Bitonto, V., Cutrin, J. C., Rantsiou, K., Durante, M., Masini, E., Aragno, M., Cordero, C., Cocolin, L., & Collino, M. (2018). Fructose liquid and solid formulations differently affect gut integrity, microbiota composition and related liver toxicity: a comparative in vivo study. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 55, 185-199. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.02.003>

Im Text: (Mastrocola et al., 2018)

Matter, K., & Balda, M. S. (2003). Signalling to and from tight junctions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(3), 225-236. <https://doi.org/10.1038/nrm1055>

Im Text: (Matter & Balda, 2003)

Mazurek, S. (2011). Pyruvate kinase type M2: A key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(7), 969-980. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.02.005>

Im Text: (Mazurek, S., 2011)

Mazurek, S., Boschek, C. B., Hugo, F., & Eigenbrodt, E. (2005). Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Seminars in Cancer Biology*, 15(4), 300-308. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.04.009>

Im Text: (Mazurek et al., 2005)

Meng, W., & Takeichi, M. (2009). Adherens Junction: Molecular Architecture and Regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(6), a002899-a002899. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002899>

Im Text: (Meng & Takeichi, 2009)

Merino, B., Fernández-Díaz, C. M., Cózar-Castellano, I., & Perdomo, G. (2020). Intestinal Fructose and Glucose Metabolism in Health and Disease. *Nutrients*, 12(1), 94. <https://doi.org/10.3390/nu12010094>

Im Text: (Merino et al., 2020)

Moonwiriyaakit, A., Pathomthongtaweethai, N., Steinhagen, P. R., Chantawichitwong, P., Satianrapapong, W., & Pongkorpsakol, P. (2023). Tight junctions: from molecules to gastrointestinal diseases. *Tissue Barriers*, 11(2), 114-146. <https://doi.org/10.1080/21688370.2022.2077620>

Im Text: (Moonwiriyaakit et al., 2023)

Mowat, A. Mcl. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews Immunology*, 3(4), 331-341. <https://doi.org/10.1038/nri1057>

Im Text: (Mowat, A. Mcl., 2003)

Mu, K., Yu, S., & Kitts, D. D. (2019). The role of nitric oxide in regulating intestinal redox status and intestinal epithelial cell functionality. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1-14. <https://doi.org/10.3390/ijms20071755>

Im Text: (Mu et al., 2019)

Muñoz-Espín, D., & Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(7), 482-496. <https://doi.org/10.1038/nrm3823>

Im Text: (Muñoz-Espín & Serrano, 2014)

Neth, B. J., Mintz, A., Whitlow, C., Jung, Y., Solingapuram Sai, K., Register, T. C., Kellar, D., Lockhart, S. N., Hoscheidt, S., Maldjian, J., Heslegrave, A. J., Blennow, K., Cunnane, S. C., Castellano, C.-A., Zetterberg, H., & Craft, S. (2020). Modified ketogenic diet is associated with improved cerebrospinal fluid biomarker profile, cerebral perfusion, and cerebral ketone body uptake in older adults at risk for Alzheimer's disease: a pilot study. *Neurobiology of Aging*, 86, 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.09.015>

Im Text: (Neth et al., 2020)

Nuss, J. E., Choksi, K. B., DeFord, J. H., & Papaconstantinou, J. (2008). Decreased enzyme activities of chaperones PDI and BiP in aged mouse livers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 365(2), 355-361. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.10.194>

Im Text: (Nuss et al., 2008)

Oxford University Press. (1993). *World Development Report 1993 – Investing in health*. Published for the World Bank, Oxford University Press. Internet: <https://documents.worldbank.org/en/publication/documents-reports/documentdetail/468831468340807129/world-development-report-1993-investing-in-health> (Stand: 26.11.24)

Im Text: (Oxford University Press, 1993)

Pang, S., Song, P., Sun, X., Qi, W., Yang, C., Song, G., Wang, Y., & Zhang, J. (2021). Dietary fructose and risk of metabolic syndrome in Chinese residents aged 45 and above: results from the China National Nutrition and Health Survey. *Nutrition Journal*, 20(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12937-021-00739-9>

Im Text: (Pang et al., 2021)

Park, Y. K., & Yetley, E. A. (1993). Intakes and food sources of fructose in the United States. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 58, 737-747.

Im Text: (Park & Yetley, 1993)

Partridge, L., Deelen, J., & Slagboom, P. E. (2018). Facing up to the global challenges of ageing. *Nature*, 561(7721), 45-56. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0457-8>

Im Text: (Partridge et al., 2018)

Petito, G., Giacco, A., CioOi, F., Mazzoli, A., Magnacca, N., Iossa, S., Goglia, F., Senese, R., & Lanni, A. (2023). Short-term fructose feeding alters tissue metabolic pathways by modulating microRNAs expression both in young and adult rats. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1101844>

Im Text: (Petito et al., 2023)

Piche, T., Barbara, G., Aubert, P., Bruley des Varannes, S., Dainese, R., Nano, J. L., Cremon, C., Stanghellini, V., De Giorgio, R., Galmiche, J. P., & Neunlist, M. (2009). Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut*, 58(2), 196-201. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.140806>

Im Text: (Piche et al., 2009)

Prabhakar, S. S., Zeballos, G. A., Montoya-Zavala, M., & Leonard, C. (1997). Urea inhibits inducible nitric oxide synthase in macrophage cell line. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 273(6), <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.6.C1882>

Im Text: Prabhakar et al., 1997)

Promega Corporation. (2009). *Griess Reagent System Technical Bulletin*. Internet: <https://at.promega.com/products/cell-health-assays/oxidative-stress-assays/griess-reagent-system/?catNum=G2930#protocols> (Stand: 26.11.24)

Im Text: (Promega Corporation, 2009)

Qian, Y., & Chen, X. (2013). Senescence Regulation by the p53 Protein Family. In *Methods in Molecular Biology* (Bd. 965, S. 37-61). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1_3

Im Text: (Qian & Chen, 2013)

Rana, H., Mallet, M. C., Gonzalez, A., Verreault, M. F., & St-Pierre, S. (2021). Free sugars consumption in canada. *Nutrients*, 13(5), 1-12. <https://doi.org/10.3390/nu13051471>

Im Text: (Rana et al., 2021)

Rayess, H., Wang, M. B., & Srivatsan, E. S. (2012). Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *International Journal of Cancer*, 130(8), 1715-1725. <https://doi.org/10.1002/ijc.27316>

Im Text: (Rayess et al., 2012)

Ren, W. Y., Wu, K. F., Li, X., Luo, M., Liu, H. C., Zhang, S. C., & Hu, Y. (2014). Age-related changes in small intestinal mucosa epithelium architecture and epithelial tight junction in rat models. *Aging Clinical and Experimental Research*, 26(2), 183-191. <https://doi.org/10.1007/s40520-013-0148-0>

Im Text: (Ren et al., 2014)

Rocklands Immunochemicals Inc. (2018). *Staining Parahin Sections by PAP Protocol*. Internet: <https://www.rockland.com/globalassets/documents/protocols/staining-paraOin-sections-pap-protocol.pdf?srsId=AfmBOoqP1S49ZthLoULobf7QxTOKhainhTY5CdPU-syy1vstloqZC6jU> (Stand: 26.11.24)

Im Text: (Rocklands Immunochemicals Inc., 2018)

Safwan-Zaiter, H., Wagner, N., & Wagner, K.-D. (2022). P16INK4A – More Than a Senescence Marker. *Life*, 12(9), 1332. <https://doi.org/10.3390/life12091332>

Im Text: (Safwan-Zaiter, 2022)

Salazar, N., López, P., Valdés, L., Margolles, A., Suárez, A., Patterson, Á. M., Cuervo, A., Reyes-Gavilán, C. G. de los, Ruas-Madiedo, P., Gonzalez, S., & Gueimonde, M. (2013). Microbial Targets for the Development of Functional Foods Accordingly with Nutritional and Immune Parameters Altered in the Elderly. *Journal of the American College of Nutrition*, 32(6), 399-406. <https://doi.org/10.1080/07315724.2013.827047>

Im Text: (Salazar et al., 2013)

Salim, T., Sershen, C. L., & May, E. E. (2016). Investigating the Role of TNF- α and IFN- γ Activation on the Dynamics of iNOS Gene Expression in LPS Stimulated Macrophages. *PLOS ONE*, 11(6), e0153289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153289>

Im Text: (Salim et al., 2016)

Salzman, A. L., Menconi, M. J., Unno, N., Ezzell, R. M., Casey, D. M., Gonzalez, P. K., & Fink, M. P. (1995). Nitric oxide dilates tight junctions and depletes ATP in cultured Caco-2BBE intestinal epithelial monolayers. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 268(2), G361-G373. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1995.268.2.G361>

Im Text: (Salzman et al., 1995)

Sander, H., Wallace, S., Plouse, R., Tiwari, S., & Gomes, A. V. (2019). Ponceau S waste: Ponceau S staining for total protein normalization. *Analytical Biochemistry*, 575, 44-53. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.03.010>

Im Text: (Sander et al., 2019)

Schacht, V., & Kern, J. S. (2015). Basics of immunohistochemistry. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(3), e30. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.541>

Im Text: (Schat & Kern, 2015)

Schoultz, I., & Keita, Å. V. (2020). The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability. *Cells*, 9(8), 1-30. <https://doi.org/10.3390/cells9081909>

Im Text: (Schoultz & Keita, 2020)

Sellmann, C., Prieb, J., Landmann, M., Degen, C., Engstler, A. J., Jin, C. J., Gärtner, S., Spruss, A., Huber, O., & Bergheim, I. (2015). Diets rich in fructose, fat or fructose and fat alter intestinal barrier function and lead to the development of nonalcoholic fatty liver disease over time. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(11), 1183-1192. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.05.011>

Im Text: (Sellmann et al., 2015)

Seth, A., Sheth, P., Elias, B. C., & Rao, R. (2007). Protein phosphatases 2A and 1 interact with occludin and negatively regulate the assembly of tight junctions in the CACO-2 cell monolayer. *Journal of Biological Chemistry*, 282(15), 11487-11498. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610597200>

Im Text: (Seth et al., 2007)

Singh, G. M., Goodarz Danaei, ;, Pelizzari, P. M., Lin, J. K., Cowan, M. J., Stevens, G. A., Farzadfar, F., Khang, Y.-H., Lu, Y., Riley, L. M., Lim, S. S., & Ezzati, M. (2012). The Age Associations of Blood Pressure, Cholesterol, and Glucose Analysis of Health Examination Surveys From International Populations. *Circulation*, 125(18), 2204-2211. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.058834/-/DC1>

Im Text: (Singh et al., 2012)

Socała, K., Doboszewska, U., Szopa, A., Serefko, A., Włodarczyk, M., Zielińska, A., Poleszak, E., Fichna, J., & Wlaź, P. (2021). The role of microbiota-gut-brain axis in neuropsychiatric and neurological disorders. *Pharmacological Research*, 172, 105840. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105840>

Im Text: (Socała et al., 2021)

Soufli, I., Toumi, R., Rafa, H., & Touil-BoukoOa, C. (2016). Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immuno-pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 7(3), 353. <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v7.i3.353>

Im Text: (Soufli et al., 2016)

Spruss, A., Kanuri, G., Uebel, K., Bischof, S. C., & Bergheim, I. (2011). Role of the Inducible Nitric Oxide Synthase in the Onset of Fructose-Induced Steatosis in Mice. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(11), 2121-2135. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3263>

Im Text: (Spruss et al., 2011)

Spruss, A., Kanuri, G., Wagnerberger, S., Haub, S., Bischoff, S. C., & Bergheim, I. (2009). Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology*, 50(4), 1094-1104. <https://doi.org/10.1002/hep.23122>

Im Text: (Spruss et al., 2009)

Staltner, R., Burger, K., Baumann, A., & Bergheim, I. (2023). Fructose: a modulator of intestinal barrier function and hepatic health? *European Journal of Nutrition*, 62(8), 3113-3124. <https://doi.org/10.1007/s00394-023-03232-7>

Im Text: (Staltner et al., 2023)

STATISTIK AUSTRIA. Wien, Österreich (2020). *Österreichische Gesundheitsbefragung 2019*.

Internet: <https://www.statistik.at/services/tools/services/publikationen/detail/848>. (Stand 26.11.24)

Im Text: (STATISTIK AUSTRIA, 2020)

STATISTIK AUSTRIA. (2024a, Juli 1). *Bevölkerungsprognosen für Österreich und die Bundesländer*. Internet: <https://www.statistik.at/statistiken/bevoelkerung-und-soziales/bevoelkerung/demographische-prognosen/bevoelkerungsprognosen-fuer-oesterreich-und-die-bundeslaender> (Stand: 26.11.24)

Im Text: (STATISTIK AUSTRIA, 2024a)

STATISTIK AUSTRIA. (2023). *Bevölkerungspyramide Österreich 1952-2100*. Internet: https://www.statistik.at/atlas/bev_prognose/ (Stand: 26.11.24)
Im Text: (STATISTIK AUSTRIA, 2023)

STATISTIK AUSTRIA. (2024b, Oktober 18). *Sterbetafel*n. Internet : <https://www.statistik.at/statistiken/bevoelkerung-und-soziales/bevoelkerung/demographische-indikatoren-und-tafeln/sterbetafel> (Stand: 26.11.24)
Im Text: (STATISTIK AUSTRIA, 2024b)

Stochaj, W. R., Berkelman, T., & Laird, N. (2006, Oktober). *Staining Membrane-Bound Proteins with Ponceau S*. Cold Spring Harbor Protocols; Cold Spring Harbor Laboratory. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4543>
Im Text: (Stochaj et al., 2006)

Stuck, A. E., Siu, A. L., Wieland, G. D., Adams, J., & Rubenstein, L. Z. (1993). Comprehensive geriatric assessment: a meta-analysis of controlled trials. *The Lancet*, 342, 1032-1036.
Im Text: (Stuck et al., 1993)

Sun, S. Z., Anderson, G. H., Flickinger, B. D., Williamson-Hughes, P. S., & Empie, M. W. (2011). Fructose and non-fructose sugar intakes in the US population and their associations with indicators of metabolic syndrome. *Food and Chemical Toxicology*, 49(11), 2875-2882. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.07.068>
Im Text: (Sun et al., 2011)

Suzuki, T., & Hara, H. (2010a). Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats. *Nutrition & Metabolism*, 7(1), 19. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-19>
Im Text: (Suzuki & Hara, 2010a)

Suzuki, T., & Hara, H. (2010b). Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats. *Nutrition & Metabolism*, 7(1), 19. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-19>
Im Text: (Suzuki & Hara, 2010b)

Tang, Y., Zhang, L., Forsyth, C. B., Shaikh, M., Song, S., & Keshavarzian, A. (2015). The Role of miR-212 and iNOS in Alcohol-Induced Intestinal Barrier Dysfunction and Steatohepatitis. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 39(9), 1632-1641. <https://doi.org/10.1111/acer.12813>
Im Text: (Tang et al., 2015)

Taylor, C. R., & Burns, J. (1974). The demonstration of plasma cells and other immunoglobulin-containing cells in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using peroxidase-labelled antibody. *J.-clin. Path*, 27, 14-20.
Im Text: (Taylor & Burns, 1974)

Taylor, S. R., Ramsamooj, S., Liang, R. J., Katti, A., Pozovskiy, R., Vasan, N., Hwang, S. K., Nahiyaan, N., Francoeur, N. J., SchatoO, E. M., Johnson, J. L., Shah, M. A., Dannenberg, A. J., Sebra, R. P., Dow, L. E., Cantley, L. C., Rhee, K. Y., & Goncalves, M. D. (2021). Dietary fructose improves intestinal cell survival and nutrient absorption. *Nature*, 597(7875), 263–267. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03827-2>
Im Text: (Taylor et al., 2021)

Tran, L., & Greenwood-Van Meerveld, B. (2013). Age-Associated Remodeling of the Intestinal Epithelial Barrier. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 68(9), 1045-1056. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt106>
Im Text: (Tran & Greenwood-Van Meerveld, 2013)

Tremblay, S., Côté, N. M. L., Grenier, G., Duclos-Lasnier, G., Fortier, L.-C., Ilangumaran, S., & Menendez, A. (2017). Ileal antimicrobial peptide expression is dysregulated in old age. *Immunity & Ageing*, 14(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s12979-017-0101-8>
Im Text: (Tremblay et al., 2017)

Tsikis, D. (2007). Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 851(1–2), 51–70. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.054>
Im Text: (Tsikis, D., 2007)

Turner, J. R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(11), 799-809. <https://doi.org/10.1038/nri2653>
Im Text: (Turner, J. R., 2009)

Tyszka, M., Biliński, J., & Basak, G. W. (2021). Advances in Intestinal Barrier Preservation and Restoration in the Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Setting. *Journal of clinical medicine*, 10(11), 2508. <https://doi.org/10.3390/jcm10112508>
Im Text: (Tyszka et al., 2021)

Umar, S. (2010). Intestinal Stem Cells. *Current Gastroenterology Reports*, 12(5), 340-348. <https://doi.org/10.1007/s11894-010-0130-3>
Im Text: (Umar, S., 2010)

United Nations. (2017). *Ageing, Older Persons and the 2030 Agenda for Sustainable Development*. Internet: <https://www.undp.org/publications/ageing-older-persons-and-2030-agenda-sustainable-development> (Stand: 26.11.24)
Im Text: (United Nations, 2017)

Untersmayr, E., Brandt, A., Koidl, L., & Bergheim, I. (2022). The Intestinal Barrier Dysfunction as Driving Factor of Inflammaging. *Nutrients*, 14(5), 1-20. <https://doi.org/10.3390/nu14050949>
Im Text: (Untersmayr et al., 2022)

van Rossum, C. T. M., Buurma-Rethans, E. J. M., Dinnissen, C. S., Beukers, M. H., Brants, H. A. M., Dekkers, A. L. M., & Ocké, M. C. (2020). *The diet of the Dutch. Results of the Dutch National Food Consumption Survey 2012-2016*. <https://doi.org/10.21945/RIVM-2020-0083>
Im Text: (van Rossum et al., 2020)

Vancamelbeke, M., & Vermeire, S. (2017). The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 11(9), 821-834. <https://doi.org/10.1080/17474124.2017.1343143>
Im Text: (Vancamelbeke & Vermeire, 2017)

Vilar, A., de Lemos, L., Patraca, I., Martínez, N., Folch, J., Junyent, F., Verdaguer, E., Pallàs, M., Auladell, C., & Camins, A. (2014). Melatonin suppresses nitric oxide production in glial cultures by pro-inflammatory cytokines through p38 MAPK inhibition. *Free Radical Research*, 48(2), 119-128. <https://doi.org/10.3109/10715762.2013.845295>
Im Text: (Vilar et al., 2014)

Volynets, V., Spruss, A., Kanuri, G., Wagnerberger, S., Bischoff, S. C., & Bergheim, I. (2010a). Protective effect of bile acids on the onset of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Journal of Lipid Research*, 51(12), 3414-3424. <https://doi.org/10.1194/jlr.M007179>
Im Text: (Volynets et al., 2010a)

Volynets, V., Spruss, A., Kanuri, G., Wagnerberger, S., Bischoff, S. C., & Bergheim, I. (2010b). Protective effect of bile acids on the onset of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Journal of Lipid Research*, 51(12), 3414-3424. <https://doi.org/10.1194/jlr.M007179>
Im Text: (Volynets et al., 2010b)

Volynets, V., Spruss, A., Kanuri, G., Wagnerberger, S., Bischoff, S. C., & Bergheim, I. (2010b). Protective effect of bile acids on the onset of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Journal of Lipid Research*, 51(12), 3414-3424. <https://doi.org/10.1194/jlr.M007179>
Im Text: (Volynets et al., 2010b)

Vos, M. B., Kimmons, J. E., Gillespie, C., Welsh, J., & Blanck, H. M. (2008). Health and Nutrition Examination Survey. *Medscape J Med*, 10(7). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2525476/?report=printable>
Im Text: (Vos et al., 2008)

Wagnerberger, S., Spruss, A., Kanuri, G., Volynets, V., Stahl, C., Bischoff, S. C., & Bergheim, I. (2012). Toll-like receptors 1–9 are elevated in livers with fructose-induced hepatic steatosis. *British Journal of Nutrition*, 107(12), 1727-1738. <https://doi.org/10.1017/S0007114511004983>

Im Text: (Wagnerberger et al., 2021)

Wang, Q., Yang, Q., & Liu, X. (2023). The microbiota–gut–brain axis and neurodevelopmental disorders. *Protein & Cell*, 14(10), 762-775. <https://doi.org/10.1093/procel/pwad026>

Im Text: (Wang et al., 2023)

White, J. S. (2008). Straight talk about high-fructose corn syrup: what it is and what it ain't. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(6), 1716S-1721S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.25825B>

Im Text: (White, J. S., 2008)

Wilson, T. H., & Wiseman, G. (1954). The Use of Sacs of Everted Small Intestine for the Study of the Transference of Substances from the Mucosal to the Serosal Surface. *J. Physiol*, 123, 116-125.

Im Text: (Wilson & Wiseman, 1954)

World Health Organization. (2015). *Guideline: Sugars intake for adults and children*. Geneva, Switzerland. Internet: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549028> (Stand: 26.11.24)

Im Text: (World Health Organization, 2015)

World Health Organization. (2017). *Integrated care for older people: Guidelines on community-level interventions to manage declines in intrinsic capacity*. Geneva, Switzerland Internet: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241550109> (Stand: 26.11.24)

Im Text: (World Health Organization, 2017)

Wu, G., & Morris, S. M. (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal*, 336(1), 1-17. <https://doi.org/10.1042/bj3360001>

Im Text: (Wu & Morris, 1998)

Ye, D., Li, F. Y. L., Lam, K. S. L., Li, H., Jia, W., Wang, Y., Man, K., Lo, C. M., Li, X., & Xu, A. (2012). Toll-like receptor-4 mediates obesity-induced non-alcoholic steatohepatitis through activation of X-box binding protein-1 in mice. *Gut*, 61(7), 1058-1067. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300269>

Im Text: (Ye et al., 2012)

Yeung, S. S. Y., Kwan, M., & Woo, J. (2021). Healthy diet for healthy aging. *Nutrients*, 13(12), 1-17. <https://doi.org/10.3390/nu13124310>

Im Text: (Yeung et al., 2021)

Zhao, S., Torres, A. M., Henry, R. A., Trefely, S., Wallace, M., Lee, J. V., Carrer, A., Sengupta, A., Campbell, S. L., Kuo, Y. M., Frey, A. J., Meurs, N., Viola, J. M., Blair, I. A., Weljie, A. M., Metallo, C. M., Snyder, N. W., Andrews, A. J., & Wellen, K. E. (2016). ATP-Citrate Lyase Controls a Glucose-to-Acetate Metabolic Switch. *Cell Reports*, 17(4), 1037-1052. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.069>

Im Text: (Zhao et al., 2016)

Zheng, J., Gao, C., Wang, M., Tran, P., Mai, N., Finley, J. W., Heymsfield, S. B., Greenway, F. L., Li, Z., Heber, D., Burton, J. H., Johnson, W. D., & Laine, R. A. (2017). Lower Doses of Fructose Extend Lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Dietary Supplements*, 14(3), 264-277. <https://doi.org/10.1080/19390211.2016.1212959>

Im Text: (Zheng et al., 2017)

10. Anhang

Tabelle 14: Herstellung der Puffer und Lösungen für den Semi-Dry Western Blot

Lösung	Chemikalie(n)	Menge
Tris (0,5 M) pH = 6,8 in 90 mL ddH ₂ O gelöst pH eingestellt auf 100 mL mit ddH ₂ O auffüllen	Tris PUFFERRAN® ≥ 99,9 %	6,05 g
Tris (1,5 M) pH = 8,8 in 80 mL ddH ₂ O gelöst pH eingestellt auf 100 mL mit ddH ₂ O auffüllen	Tris PUFFERRAN® ≥ 99,9 %	18,15 g
SDS (10 %) in 100 mL ddH ₂ O lösen	SDS	10 g
Acrylamid (30%) Lösung aus dem Handel	-	-
APS (10 %) in 1 mL dH ₂ O lösen	APS	100 mg
TEMED Lösung aus dem Handel	-	-
DTT 100 mM in 2 mL dH ₂ O lösen	DTT	30,85 mg
10x Elektrophoresepuffer pH = 8,5-8,7 in 1000 mL ddH ₂ O lösen	Tris PUFFERRAN® ≥ 99,9 % SDS Glycin	30,26 g 10,00 g 144,13 g
1x Elektrophoresepuffer 100 mL 10x Elektrophoresepuffer in 900 mL ddH ₂ O verdünnen	-	-
4x SDS-Ladepuffer mit 25 mL ddH ₂ O auffüllen	1,5 M Tris pH 6,8 SDS Glycerol 2-β-Mercaptoethanol Bromophenolblau	5,217 mL 2,5 g 12,5 mL 5 mL 12,5 mg
10x TBS pH = 7,64 In ca. 950 mL lösen pH einstellen mit ca. 50 mL auffüllen	Tris (base) NaCl	24,2 g 80 g
1x TBS 100 mL 10x TBS in 900 mL ddH ₂ O verdünnen	-	-

1x TBST	Tween® 20	500 µL
100 mL 10x TBS in 900 mL ddH₂O verdünnen		
Towbin Transferpuffer	Tris PUFFERRAN® ≥ 99,9 %	14,4 g
pH = 8,1-8,5	Glycin	3,03 g
Auf 1000 mL mit dH₂O auffüllen	Methanol	200 mL
Ponceau S	Ponceau S	0,1 g
Auf 50 mL ddH₂O auffüllen	Essigsäure 100 %	500 µL
Blocking-solution	5% MMP in TBST	-
	5% BSA in TBST	

Tabelle 15: Herstellung von 10x PBS und PBS

Lösung	Chemikalie(n)	Menge
10x PBS, pH 7,4	NaCl	80 g
in 800 mL dH₂O auflösen	KCl	2 g
*pH einstellen	Na ₂ HPO ₄	7,62 g
auf 1000 mL auffüllen	KH ₂ PO ₄	0,77 g
1x PBS	-	-
100 mL 10x PBS in 900 mL ddH₂O verdünnen		

*gegebenenfalls mit konzentrierter HCl oder NaOH einstellen

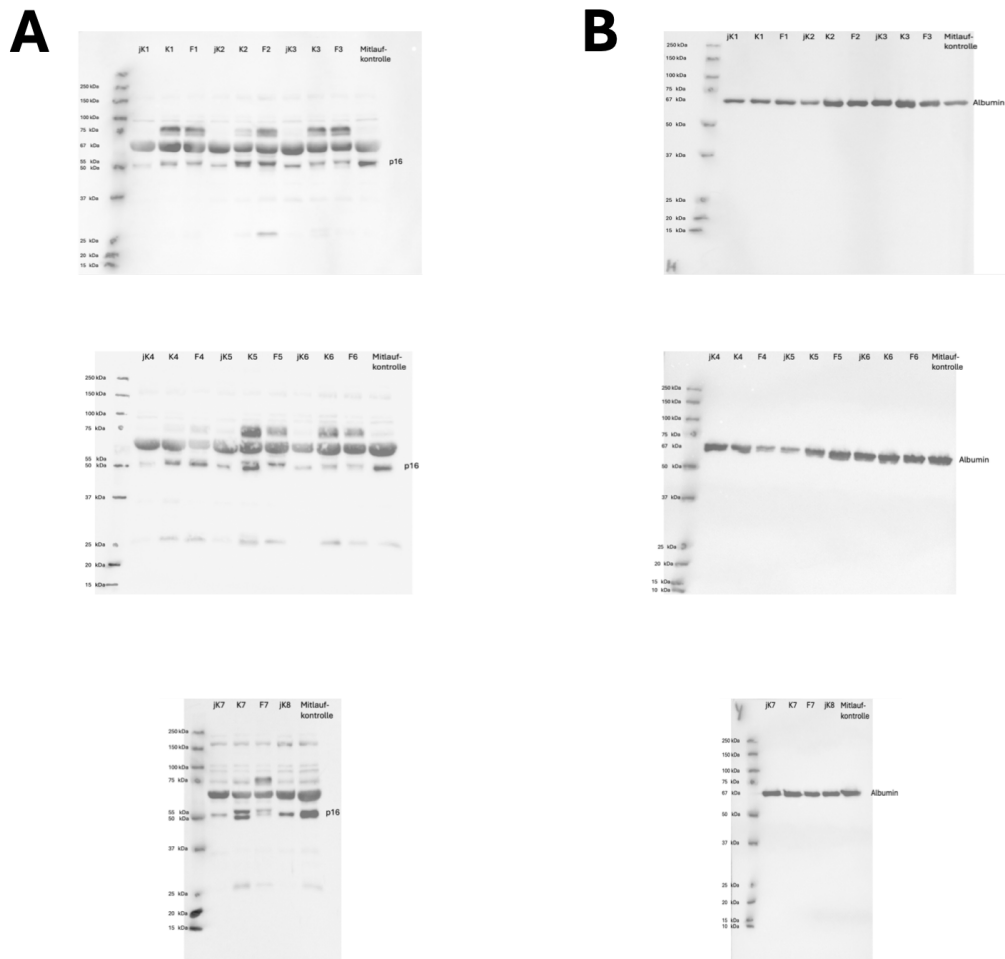


Abbildung 11: Die repräsentativen Bilder der Western Blots für die Bestimmung der p16- und Albuminkonzentration im Pfortaderplasma. **A** Die Detektion des Altersmarkers p16 im Plasma von 4 und 24 Mo. alten Kontrollmäusen und 24 Mo. alten fructosebehandelten Mäusen. Die eingestellte Proteinkonzentration beträgt 0,8 µg/µL. **B** Die Detektion von Albumin im Plasma von 4 und 24 Mo. alten Kontrollmäusen und 24 Mo. alten Interventionsmäusen. Die eingestellte Proteinkonzentration beträgt 0,05 µg/µL. jK – 4 Monate; K – 24 Monate; F – 24 Monate + Fructose; kDa – kilo Dalton (n = 7-8/Gruppe)