



MASTERARBEIT | MASTER'S THESIS

Titel | Title

In vitro Untersuchungen zum Einfluss verschiedener
Ernährungsmuster auf die Darmbarrierefunktion

verfasst von | submitted by
Simon Debona BSc

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

Wien | Vienna, 2025

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

Mit dem Abschluss dieser Masterarbeit möchte ich all denjenigen danken, die mich auf diesem Weg unterstützt und begleitet, ja es überhaupt möglich gemacht haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Bergheim, deren fachliche Expertise und kontinuierliche Unterstützung maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Vielen Dank für Ihre Geduld trotz meiner schleißigen Zeitplanung und Ihre Unterstützung durch Feedback trotz Großteils chaotischer Entwürfe. Ein herzliches Dankeschön, dass Sie mich auch trotz verspäteter Anmeldung für das MNAP2-Modul und die anschließende Masterarbeit in Ihrer Arbeitsgruppe willkommen geheißen haben.

Ein großes Dankeschön geht auch an meine Betreuer:innen Anette Brandt und Max Wodak. Vielen Dank dass ihr immer ein offenes Ohr für Fragen hattet und mir bei der Durchführung der Laborarbeit und der Dokumentation geholfen habt. Eure Geduld, aber auch eure kontinuierliche Unterstützung (und wenn ich es gebraucht habe, der nötige Push 😊) waren sehr wichtig für mich.

Zudem möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe für Ihre herzliche Aufnahme, Ihre Unterstützung, das offene Ohr und die lockere Stimmung danken, die die Arbeit oft erleichtert haben. Danke Beate, Spela, Katja, Anja, Anar, Franzl, Raphi, Kerstin, Kathi, Nafeesah und Haktan!

Ein Riesendankeschön geht an meine Freund:innen und Laborkolleg:innen, die das Arbeiten im Labor und später im Schreibprozess immer ein Stückchen besser gemacht und Spaß reingebracht haben. Alessio, Feli, Nici, Amelie, Sanna, Anna-Christina, Elisa, Nicole, Marine und Beth, ich bin sehr dankbar, dass ich das mit euch durchleben durfte.

Ein großer Dank geht auch an meine Familie und Freunde, die gerade dann da waren, wenn es nicht so gut lief und ich mentale Unterstützung gebraucht habe. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!

Vielen Dank an alle, die dazu beigetragen haben, dass ich diese Arbeit fertigstellen konnte.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	i
1. Einleitung	1
1.1 Ernährungsmuster im Vergleich und Ernährungsempfehlungen.....	1
1.2 Die Darmbarriere – Struktur und Bedeutung	2
1.3 TLR4 Liganden als Indikatoren für Permeabilitätsveränderungen der intestinalen Barriere	5
1.4 In vitro Ansätze und modellhafte Untersuchungen	7
1.5 Zielsetzung der Arbeit	8
2. Materialien.....	9
2.1 Allgemeines	9
2.2 Gefriertrocknung	11
2.3 In vitro Verdau.....	11
2.4 In vitro Fermentation	12
2.5 Zellkultur	13
2.5.1 Messung des transepithelischen elektrischen Widerstands (TEER).....	14
2.5.2 Messung von “Toll like receptor 4” (TLR4)-Liganden	15
3. Methoden	16
3.1 Gefriertrocknung	16
3.2 In vitro Verdau-Protokoll	16
3.2.1 Orale Phase	19
3.2.2 Gastrische Phase	20
3.2.3 Intestinale Phase	20
3.3 In vitro Fermentation-Protokoll.....	23
3.4 In vitro-Analysen unter Verwendung des humanen Caco-2 Zellmodells	28
3.4.1 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands	30
3.4.2 Versuchsaufbau der Zellkulturversuche mit der Caco-2 Zelllinie	31
3.4.3 Messung von “Toll like receptor 4” (TLR4)-Liganden	35
3.5 Statistische Auswertung	36

4. Ergebnisse	37
4.1 Einfluss unterschiedlicher Ernährungsmuster auf die Permeation in Caco-2 Zellen.....	37
4.1.1 Einfluss der verschiedenen Diäten auf die Permeabilität ausdifferenzierter Caco-2 Zellen nach zweistündiger Inkubation, gemessen anhand des TEER-Werts und der LPS-Permeation	37
4.1.2 Einfluss der verschiedenen Diäten auf die Permeabilität ausdifferenzierter Caco-2 Zellen nach sechs- und 24-stündiger Inkubation, gemessen anhand des TEER-Werts und der LPS-Permeation.....	39
4.1.3 Relative Differenz der TLR4-Ligandenkonzentration nach zwei Stunden mit und ohne Zugabe von LPS.....	41
4.2 Einfluss unterschiedlicher Ernährungsmuster auf die Permeation in Caco-2 Zellen nach zweistündiger Inkubation mit den verschiedenen Diäten und anschließender Challenge mit LPS ..	42
4.2.1 Einfluss der verschiedenen Diäten auf die Permeabilität ausdifferenzierter Caco-2 Zellen nach zweistündiger Inkubation, gemessen anhand der LPS-Permeation	42
4.2.2 Einfluss der verschiedenen Diäten auf die Permeabilität ausdifferenzierter Caco-2 Zellen nach ein- und zweistündiger Inkubation mit LPS nach Abnahme der Diäten, gemessen anhand der LPS-Permeation.....	43
5. Diskussion	45
5.1 Erhöhte TLR4-Ligandenkonzentration bei gleichzeitiger Stabilisierung der Barrierefunktion	45
5.2 Methodische Limitationen und Stärken des gewählten Modells	47
6. Fazit und Ausblick.....	49
7. Zusammenfassung.....	50
Summary	52
Literaturverzeichnis.....	53
Anhang	59

Abkürzungsverzeichnis

AMPK.....	AMP-aktivierte Proteinkinase
ANOVA.....	Analysis Of Variance
Ca.....	Calcium
Caco-2.....	Darmkrebs-Zelllinie aus einem kolorektalen Adenokarzinom
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	Kalziumchlorid-Dihydrat
CD14.....	Cluster of Differentiation 14
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAMPs.....	Damage-Associated Molecular Patterns
DSMZ.....	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DGE.....	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DMEM.....	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DPBS.....	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA.....	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA.....	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraaceticacid
EtOH (C ₂ H ₆ O).....	Ethanol
F.....	Fruktose
FBDG.....	Food-Based Dietary Guidelines
FITC.....	Fluoresceinisothiocyanat
FRS.....	Fetales Rinderserum
GPI.....	Glykosylphosphatidylinositol
GPR41/GPR43.....	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren 41 und 43
HCl.....	Wasserstoffchlorid
HEK.....	Human Embryonic Kidney
HMGB1.....	High Mobility Group Box 1 Protein
HT-29.....	Darmkrebs-Zelllinie aus einem kolorektalen Adenokarzinom
IFN.....	Interferon
IL-1β.....	Interleukin 1 beta
IL-6.....	Interleukin 6
IRAK4.....	Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4
IRF3.....	Interferon-Regulatory Factor 3

IU.....	Internationale Einheiten
K.....	Kontrolle
KCl.....	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
LBP.....	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LPS.....	Lipopolysaccharide
Mg.....	Magnesium
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	Magnesiumchlorid-Hexahydrat
MW.....	Mittelwert
MyD88.....	myeloid differentiation primary response gene (88)
NaCl.....	Natriumchlorid
NAFLD.....	nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O.....	Natriumphosphat, monobasisch, Dihydrat
NaOH.....	Natriumhydroxid
Na ₂ S · H ₂ O.....	Natriumsulfidhydrat
NFκB.....	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
(NH ₄) ₂ CO ₃	Ammoniumcarbonat
O.....	omnivore Diät
PAMPs.....	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBS.....	Phosphate Buffered Saline
pIgR.....	poly-Immunglobulin-Rezeptor
PRR.....	Pattern Recognition Receptors
p50.....	Protein 50
p65.....	Protein 65
Reg3 Proteine.....	Regenerating islet-derived protein 3
RGE.....	Rabbit Gastric Extract
S.....	Standarddiät
SCFA.....	kurzkettige Fettsäuren
SEAP.....	Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase
SEM.....	Standardfehler
SGE.....	Schweizerische Gesellschaft für Ernährung

SGF.....	Simulierte gastrische Flüssigkeit
SIF.....	Simulierte intestinale Flüssigkeit
sIGA.....	sekretorisches Immunglobulin A
SSF.....	Simulierte Speichelflüssigkeit
TEER.....	Transepithelial Electrical Resistance
TIRAPs.....	TIR domain-containing adapter protein
TLR4.....	Toll-like receptor 4
TLR4/MD-2.....	Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor-2
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TRAF6.....	TNF receptor associated factor 6
TRIF.....	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
Trizol.....	TDS TRItidy G TM
U.....	Einheiten
V.....	vegane Diät
Vg.....	Vegane Diät
Veh.....	Vehikel
ÖGE.....	Österreichische Gesellschaft für Ernährung

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische und physische Barrieren im Dünndarm	3
Abbildung 2: Intestinale Barrieredysfunktionen durch Tight junction-Defekte, Apoptotische Lecks, Transzytose und Erosionen/Ulzerationen und deren Folgen	3
Abbildung 3: Der MyD88-(un-)abhängige TLR4-Signalweg.....	6
Abbildung 4: Vorbereitung der benötigten Lösungen für den Verdauungsvorgang.....	18
Abbildung 5: Arbeitsschritte der oralen Phase des Verdaus	19
Abbildung 6: Arbeitsschritte der gastrischen Phase des Verdaus.....	20
Abbildung 7: Arbeitsschritte der intestinalen Phase des Verdaus	22
Abbildung 8: Beenden des Verdaus durch Inaktivierung der Enzyme mittels Hitzeschock und Lagerung der verdauten Probenröhrchen bei -80°C	23
Abbildung 9: Vorbereitungen für die Fermentation der verdauten Proben	24
Abbildung 10: Arbeitsschritte zur Aufbereitung des Fermentationssubstrats und Herstellung des fäkalen Inoculum.....	26
Abbildung 11: Arbeitsschritte zur Durchführung und Beendigung der Fermentation, sowie der anschließenden Lagerung.....	27
Abbildung 12: Aliquotieren und Aufbereiten der verdauten und fermentierten Proben.....	28
Abbildung 13: Transwell-insert mit Caco-2 Zellmonolayer in 12-Well-Platte	30
Abbildung 14: Aufteilung der verschiedenen Behandlungsgruppen auf einer 12-Well-Platte für Zellkulturversuch 1.....	32
Abbildung 15: Aufteilung der verschiedenen Behandlungsgruppen auf einer 12-Well-Platte für Zellkulturversuch 2.....	34
Abbildung 16: Einfluss der unterschiedlichen Ernährungsmuster auf die Integrität der Zellbarriere in Caco-2 Zellen	37
Abbildung 17: Einfluss der unterschiedlichen Ernährungsmuster auf die Permeation von TLR4-Liganden in Caco-2 Zellen.....	38
Abbildung 18: Einfluss der unterschiedlichen Ernährungsmuster auf die Integrität der Zellbarriere in Caco-2 Zellen	39
Abbildung 19: Einfluss der unterschiedlichen Ernährungsmuster auf die Permeation von TLR4-Liganden in Caco-2 Zellen.....	39
Abbildung 20: Einfluss der unterschiedlichen Ernährungsmuster auf die Integrität der Zellbarriere in Caco-2 Zellen	40
Abbildung 21: Einfluss der unterschiedlichen Ernährungsmuster auf die Permeation von TLR4-Liganden in Caco-2 Zellen.....	40

Abbildung 22: Relativer Unterschied der TLR4-Ligandenkonzentration zwischen Behandlungsproben mit und ohne Zugabe von LPS in unterschiedlichen Ernährungsmustern im apikalen und im basolateralen Kompartiment des Transwellsystems.....	41
Abbildung 23: Einfluss der unterschiedlichen Ernährungsmuster auf die Permeation von TLR4-Liganden in Caco-2 Zellen.....	42
Abbildung 24: Einfluss der unterschiedlichen Ernährungsmuster auf die Permeation von TLR4-Liganden in Caco-2 Zellen.....	43
Abbildung 25: Einfluss der unterschiedlichen Ernährungsmuster auf die Permeation von TLR4-Liganden in Caco-2 Zellen.....	44

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der simulierten Speichel-, gastrischen- und intestinalen Verdaulichkeiten.....	17
Tabelle 2: Für die orale, gastrische und intestinale Phase des Verdau benötigte Mengen an Enzymen	18
Tabelle 3: Inhalt des Zellkulturmediums für die Kultivierung von Caco-2 Zellen	29
Tabelle 4: Volumina der zugegebenen Media und Behandlungsgruppen in Wells ohne LPS- Behandlung in Zellkulturversuch 1	32
Tabelle 5: Volumina der zugegebenen Media und Behandlungsgruppen in Wells mit LPS-Behandlung in Zellkulturversuch 1	33
Tabelle 6: Volumina der zugegebenen Media und Behandlungsgruppen in Wells mit anschließender LPS-Behandlung in Zellkulturversuch 2	34

1. Einleitung

1.1 Ernährungsmuster im Vergleich und Ernährungsempfehlungen

Für die Erhaltung der Gesundheit des Menschen spielt die Ernährung im öffentlichen Diskurs und in der Wissenschaft eine immer größere Rolle (1). Klar definierte Empfehlungen für eine gesundheitsförderliche Ernährung, wie sie etwa von den deutschsprachigen Fachgesellschaften (DGE, ÖGE und SGE bilden die D-A-CH-Fachgesellschaften für Ernährung) herausgegeben werden, basieren auf einem breiten wissenschaftlichen Konsens und entstehen in mehrjähriger Abstimmung (2,3). Dennoch herrscht in der individuellen Ernährung oft Unsicherheit, wenn es um die Umsetzung geht (4). Zudem ist die Wahl einer Mahlzeit und eines Ernährungsschemas ein vielschichtiger, komplexer Prozess für den neben den Empfehlungen der Fachgesellschaften auch individuelle Faktoren (Umweltfaktoren, Stresslevel, Konstitution etc.) und die Werbung für Lebensmittel eine Rolle spielen (5). Daraus resultiert eine unzureichende Umsetzung der Richtlinien der Fachinstitutionen. Insbesondere der Konsum von Gemüse, Hülsenfrüchten und Vollkornprodukten liegt deutlich unterhalb der empfohlenen Mengen wie Daten aus nationalen Verzehrsstudien und Modellierungen der neuen FBDG (Food-Based Dietary Guidelines) belegen. Der Konsum von Fleisch und Zucker ist dabei überproportional hoch (6). Diese Diskrepanz scheint in Zusammenhang mit Störungen der intestinalen Barrierefunktion zu stehen. So bewirkt eine ballaststoffarme, fettreiche Ernährung eine Erhöhung der Darmpermeabilität, die die Translokation von mikrobiellen Fragmenten (z.B. LPS) begünstigt und systematische Entzündungsprozesse initiieren kann (7,8). Eine gestörte Darmbarriere wird mit einigen chronischen Erkrankungen in Verbindung gebracht, darunter Reizdarmsyndrom, nicht-alkoholische Fettleber, Autoimmunerkrankungen und Depressionen (9,10). Die gesellschaftliche Relevanz einer intakten Darmbarriere wird durch die hohe Prävalenz solcher Erkrankungen unterstrichen. Etwa 8–20 % der Weltbevölkerung leiden z.B. am Reizdarmsyndrom (11).

Die vegane Ernährung erfährt aus verschiedenen Gründen zunehmendes Interesse innerhalb der Bevölkerung. Sowohl gesundheitliche und ethische als auch ökologische Aspekte spielen hier eine Rolle (12,13).

Die vegane Ernährung beinhaltet typischerweise einen hohen Anteil an Ballaststoffen, sekundären Pflanzenstoffen und Antioxidantien sowie einen geringen Gehalt an gesättigten Fettsäuren und enthält kein Cholesterin (14). Diese Nährstoffzusammensetzung wird mit einer Reihe positiver gesundheitlicher Effekte assoziiert, darunter ein verringertes Risiko für Typ-2-Diabetes, koronare

Herzkrankheiten und bestimmte Krebsformen (12). Gleichzeitig existieren jedoch auch potenzielle Risiken durch Nährstoffmängel (z.B. Vitamin B12, Eisen, Kalzium, Vitamin D, Jod, Zink, Omega-3-Fettsäuren und Selen), insbesondere bei unausgewogener Umsetzung (15,16).

Der Konsum von hochverarbeiteten veganen Ersatzprodukten, die teilweise erhöhte Mengen an Salz, Zucker und gesättigten Fettsäuren und gleichzeitig weniger essenzielle Nährstoffe (z.B. Proteine und Mikronährstoffe) enthalten, nimmt zu (17). Die zur Entstehung dieser Convenience-Produkte eingesetzten technologischen Verarbeitungsprozesse wie Fermentation, Erhitzung oder pH-Verschiebungen können zur Racemisierung von L-Aminosäuren führen und damit zur Bildung von D-Aminosäuren beitragen (18). Dies kann die Verwertbarkeit und die Ernährungsqualität der Proteine beeinträchtigen und in höheren Konzentrationen in Tierversuchen das Wachstum hemmen und Veränderungen in den Organen hervorrufen. Zwar wird die daraus resultierende gesundheitliche Relevanz für den Menschen grundsätzlich als gering eingestuft (19,20), doch bleibt die Langzeitwirkung solcher Produkte und deren Einfluss auf die Darmbarriere ein weitgehend unerforschtes Feld.

Omnivore Ernährungsformen, insbesondere wenn sie sich an den Empfehlungen der D-A-C-H-Gesellschaften orientieren, enthalten sowohl pflanzliche als auch tierische Lebensmittel in ausgewogener Form. Sie gelten ebenfalls als gesundheitsförderlich, v.a. wenn der Anteil an Obst, Gemüse, Vollkornprodukten und ungesättigten Fettsäuren hoch ist (21–23). Die genaue Zusammensetzung einer Ernährung, unabhängig von der genauen Bezeichnung, entscheidet über den physiologischen Effekt (23). Die vorliegende Arbeit untersucht die Wirkung solcher definierter Ernährungsmuster auf die Darmbarriere im Zellkulturmodell.

1.2 Die Darmbarriere – Struktur und Bedeutung

Die Darmbarriere ist ein hochkomplexes System, das aus verschiedenen Komponenten besteht: (a) einer physikalischen Barriere (Schleimschicht und Epithelzellen), (b) einer humoralen Komponente (z.B. Immunglobulin A und Defensine) sowie (c) immunologischen Zellen (z.B. Lymphozyten und dendritische Zellen) und (d) muskulären und (e) neurologischen Komponenten. Sie fungiert als regulative Schnittstelle zwischen dem intestinalen Lumen und dem Körperinneren, indem sie einerseits die Aufnahme essenzieller Nährstoffe und eine friedliche Koexistenz mit den intestinalen Symbionten ermöglicht, andererseits jedoch pathogene Mikroorganismen, Toxine und Antigene durch dosierte inflammatorische Reaktion und Verteidigung am Übertritt hindert (24–26).

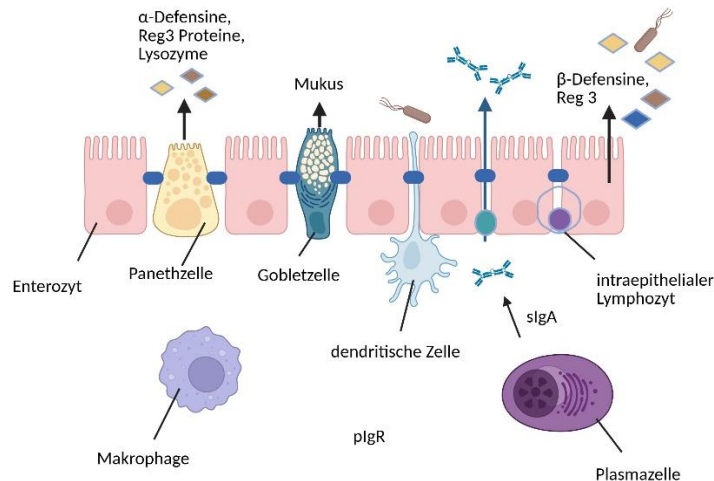


Abbildung 1 Chemische und physische Barrieren im Dünndarm (modifiziert nach (24)), Abkürzungen: sIgA = sekretorisches Immunglobulin A; plgR = poly-Immunglobulin-Rezeptor; Reg3 Proteine = Regenerating islet-derived protein 3. Erstellt mit BioRender.com.

Für die vorliegende Arbeit ist eine Abgrenzung der beiden Begriffe „Darmbarriere“ und „Darmpermeabilität“ hilfreich. Die Darmpermeabilität wird als eine funktionelle Eigenschaft der Darmbarriere an bestimmten Stellen definiert, die durch die Analyse der Flussraten von bestimmten, weitgehend inerten Molekülen gemessen werden kann (z.B. LPS), entweder über die gesamte Darmwand oder über einzelne Wandkomponenten. Die Darmpermeabilität hängt von einigen Faktoren ab und kann durch diese beeinflusst und verändert werden. Dazu zählen z.B. die Veränderung der Zusammensetzung der Darmmikrobiota, Veränderungen der mukosalen Schicht oder Schäden an den Epithelien. Diese Veränderungen können eine Translokation der luminal liegenden Stoffe in die inneren Schichten der Darmwand bewirken und somit die Darmbarriere beeinträchtigen (24). Dies wird u.a. durch Alter, Stress, Medikamente, mikrobielle Dysbiosen oder Ernährung beeinflusst (27).

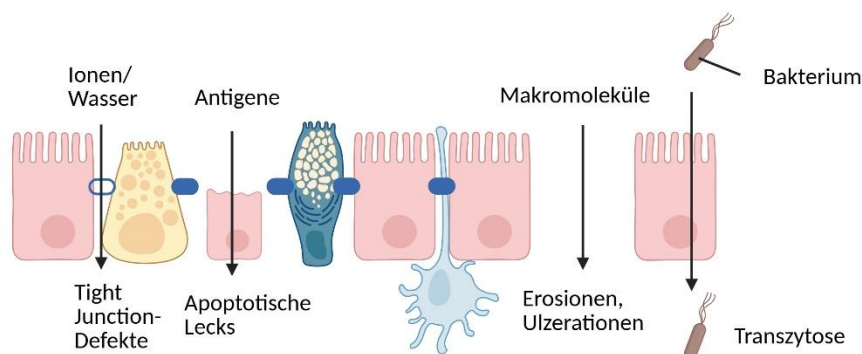


Abbildung 2 Intestinale Barrieredysfunktionen durch Tight junction-Defekte, Apoptotische Lecks, Transzytose und Erosionen/Ulzerationen und deren Folgen (Passage von Ionen, Wasser, Antigenen, Makromolekülen und Bakterien durch die Zellbarriere)(modifiziert nach (24). Erstellt mit BioRender.com.

Die Ernährung beeinflusst die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota sowie die metabolische Aktivität im Darm in besonderem Maße. Ballaststoffe und Omega-3-Fettsäuren sind wichtige Nahrungsbestandteile, die über Fermentationsprozesse die Produktion kurzkettiger Fettsäuren (SCFAs) wie Butyrat, Acetat und Propionat fördern. Diese können die Integrität der Darmbarriere modulieren, da sie die Tight-Junction-Proteine stabilisieren sowie epitheliale Energiestoffwechsel und entzündungshemmende Signalwege fördern (28–31).

Butyrat z.B. aktiviert spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPR41/GPR43) auf Darmepithelien und verhindert über eine Unterdrückung der entzündungsfördernden Signalwege (wie NF- κ B) eine Barriere destabilisierung. Gleichzeitig hemmt es Histondeacetylasen auf epigenetischer Ebene, was die Expression antiinflammatorischer Zytokine fördert und damit einen Schutz gegen Schäden der Darmbarriere bietet (32).

Omega-3-Fettsäuren beeinflussen die Zusammensetzung des Mikrobioms zugunsten derer Bakterien, die kurzkettige Fettsäuren produzieren. Dazu zählen u.a. Roseburia und Bifidobakterien, sie tragen indirekt zur Stabilisierung der Darmbarriere bei (29,33).

Ernährungsformen mit einem hohen Fett- und Proteinanteil wirken sich nachteilig auf die Darmbarriere aus. Wesentlich dafür ist die verringerte Bildung kurzkettiger Fettsäuren, die zu einer erhöhten epithelialen Durchlässigkeit beiträgt. Durch ihren geringen Gehalt an Ballaststoffen beeinflussen sie die Zusammensetzung der Darmmikrobiota. Ein hoher Fettgehalt fördert das Wachstum von Bacteroides und potenziell krankheitserregenden Proteobakterien, während ballaststoffverarbeitende Bakterien wie Bifidobakterien und bestimmte Firmicutes in ihrer Entwicklung gehemmt werden (34,35). Diese Dysbiose führt zu einer verstärkten Freisetzung von LPS, das über den TLR4-Signalweg proinflammatorische Reaktionen auslöst. Der daraus resultierende Effekt, bekannt als „metabolische Endotoxämie“, kann eine systemische niedriggradige Entzündung hervorrufen, die mit metabolischen Erkrankungen wie Adipositas und Typ-2-Diabetes in Verbindung steht (36).

Ein hoher Proteingehalt in der Ernährung, insbesondere aus rotem Fleisch, kann ebenfalls problematisch sein. Durch die bakterielle Proteolyse entstehen Stoffwechselprodukte wie Ammoniak, Schwefelwasserstoff, Phenole und Indole, die die Integrität der Darmschleimhaut beeinträchtigen und zum Abbau der Mukosa führen. Diese Substanzen können zudem epitheliäre Schäden verursachen und die Barrierefunktion des Darms schwächen. Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass die verstärkte Bildung solcher Metabolite direkt mit einer erhöhten intestinalen Durchlässigkeit zusammenhängt und entzündungsfördernde Prozesse begünstigt (37).

Damit wird deutlich, dass die Qualität und Zusammensetzung der Ernährung einen entscheidenden Einfluss auf die Aufrechterhaltung der intestinalen Barrierefunktion hat und somit maßgeblich zur Prävention von Störungen der Darmgesundheit beitragen kann (38).

1.3 TLR4 Liganden als Indikatoren für Permeabilitätsveränderungen der intestinalen Barriere

TLR4 (Toll-like receptor 4) ist Teil der Familie der Toll-like-Rezeptoren, die ein zentraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind. TLR4 ist ein membranständiger Mustererkennungsrezeptor (Pattern Recognition Receptors, PRR) und erkennt konservative molekulare Strukturen, sogenannte „Pathogen-Associated Molecular Patterns“ (PAMPs). Diese sind typisch für Mikroorganismen. Die Erkennung dieser Strukturen ermöglichen es dem Organismus frühzeitig eine Immunantwort einzuleiten. TLR4 ist der am ausführlichsten charakterisierte Rezeptor für das Registrieren von LPS, einem Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien (39).

Die Bindung von LPS an TLR4 ist nicht ohne das Zusammenspiel mit weiteren Molekülen möglich. Zunächst gehen LPS und das lösliche Lipopolysaccharid-bindende Protein (LBP) eine Bindung ein und wird von LBP an CD14 (Cluster of Differentiation 14) weitergegeben, das es im nächsten Schritt dann auf das TLR4/MD-2-(myeloid differentiation factor-2) Komplexprotein überträgt. Dabei wird eine Konformitätsänderung ausgelöst, die zur Initiierung der Signalübertragung führt. Für die Aktivierung von TLR4 existieren zwei unterschiedliche Signalwege: der TRIF-abhängige und der MyD88-abhängige Pfad. Der MyD88-abhängige Pfad führt primär zur Aktivierung von NF- κ B und im Anschluss zur Produktion proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-1 β und IL-6) (40), während der TRIF-abhängige Signalweg die Aktivierung von IRF3 und antiviraler Typ-I-Interferone bewirkt. Somit ist TLR4 ein Schlüsselrezeptor für die Regulation von entzündlichen und antiviralen Immunantworten. In jüngeren wissenschaftlichen Publikationen stellte sich heraus, dass das Scaffold-Protein IRAK4 eine wichtige Rolle bei der Integration beider Signalwege übernimmt, da es für die Aktivierung der Ubiquitin-Ligase TRAF6 eine entscheidende Funktion einnimmt (41).

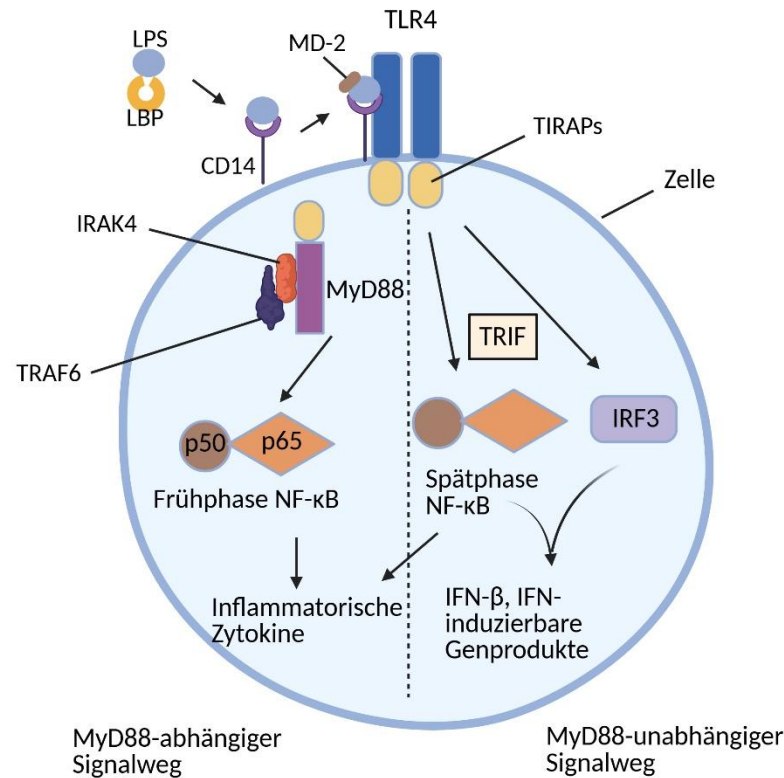


Abbildung 3 Der MyD88-(un-)abhängige TLR4-Signalweg (modifiziert nach (39,40)), Abkürzungen: LBP = Lipopolysaccharid-bindendes Protein, LPS = Lipopolysaccharid, MD-2 = myeloid differentiation factor-2, TIRAPs = TIR domain-containing adapter protein, CD14 = Cluster of Differentiation 14, IRAK4 = interleukin-1 receptor-associated kinases 4, TRAF6 = TNF receptor-associated factor 6, TRIF = TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β , TLR4 = Toll-like receptor 4, MyD88 = myeloid differentiation primary response protein 88, p50 = Protein50, p65 = Protein65, IRF3 = interferon-regulatory factor 3, NF- κ B = nuclear factor- κ B, IFN = interferon. Erstellt mit BioRender.com.

Neben LPS können auch endogene Liganden TLR4 aktivieren. Dazu zählen High Mobility Group Box 1 Protein (HMGB1), oxidiertes LDL, Hyaluronsäurefragmente, Fibronectin oder Hitzeschockproteine. Sie gehören zur Gruppe der „Damage-Associated Molecular Patterns“ (DAMPs) und entstehen infolge von Gewebeschäden, Zellstress oder entzündlichen Prozessen. Die Aktivität der DAMPs kann als funktioneller Marker für die Barriereintegrität gesehen werden. Somit fungiert TLR4 neben seiner Funktion als Sensor für bakterielle Infektionen auch als Brücke zwischen mechanischem oder metabolischem Stress und der immunologischen Antwort (42).

Diese Mechanismen haben einen erheblichen Einfluss auf die Darmbarriere. Zum einen kann eine erhöhte TLR4-Aktivität eine erhöhte exogene Last durch bakterielle Endotoxine aufzeigen, zum anderen auch auf endogene Stresssignale hinweisen, die durch diätinduzierte Prozesse oder Veränderungen in der Mukosaintegrität entstehen. Eine erhöhte TLR4-Aktivität ist im Kontext von Ernährungsinterventionen demnach nicht ausschließlich auf mikrobielle Belastungen

zurückzuführen, sondern auch auf Anpassungen im Stoffwechsel und auf die Produktion körpereigener Liganden von TLR4. Das macht TLR4 zu einem gewichtigen funktionellen Marker für die Beurteilung der Integrität und Belastung der intestinalen Barriere (43).

Im für diese Arbeit verwendeten Caco-2-Zellkulturmodell ist davon auszugehen, dass TLR4 überwiegend durch exogene Liganden (LPS und andere diätassoziierte Komponenten) stimuliert wird. Dies liegt an einer geringeren TLR4-Reaktivität im Grundzustand, in dem die Zellen eine niedrige Expression von TLR4 und MD-2 aufweisen. Endogenen Stresssignalen (DAMPs) kommt demnach in diesem Modell eine eher untergeordnete Rolle bei der Beeinflussung der Barrierepermeabilität zu (44).

1.4 In vitro Ansätze und modellhafte Untersuchungen

Mit einer Vielzahl von Modellsystemen wird seit mehreren Jahrzehnten die intestinale Barrierefunktion untersucht. Die Untersuchungen unterscheiden sich dabei hinsichtlich Komplexität, physiologischer Nähe und technischer Handhabbarkeit. Bereits in den 1970er-Jahren wurden erste experimentelle Ansätze in Form von Caco-2- oder HT-29-Zellen entwickelt, die grundlegende Barriere- und Transportfunktionen des Darmepithels in vitro simulieren sollten (45,46). Die Caco-2-Zelllinie wurde ursprünglich aus einem menschlichen Kolonkarzinom gewonnen. Nach einer Differenzierungszeit bilden sie Tight Junctions aus und entwickeln ein polarisierendes Epithel, das morphologische und funktionelle Eigenschaften des Dünndarmepithels aufweist (47). Da sie die selektive Permeabilität des intestinalen Epithels abbilden können, gelten Caco-2-Zellen weiterhin als Standard in der Barriereforschung, auch in verbesserten, aktuellen Co-Kultur-Modellen (48).

Um bestimmte Aspekte der intestinalen Barriere differenzierter zu erfassen, wurden parallel dazu alternative Modelle entwickelt. Ein Verfahren, das v.a. für die Analyse elektrophysiologischer Charakteristika und die Absorption bestimmter Stoffe genutzt wird, ist die ex vivo Untersuchung isolierter Darmabschnitte in Ussing-Kammern (49). Ein weiteres ex vivo-Modell stellen Organoidkulturen dar, die aus adulten intestinalen Stammzellen gezüchtet werden und mehrere Zelltypen des intestinalen Epithels enthalten (50). Sie haben in den letzten Jahren erheblich an Bedeutung gewonnen, weil sie im Vergleich zu klassischen Zelllinien die dreidimensionale Architektur und Zelldiversität des Darms besser modellieren können und die Untersuchung zellulärer Interaktionen in einem nativen Gewebeumfeld ermöglichen (51,52). Auch Organ-on-a-Chip-Technologien haben in den letzten Jahren vermehrt Aufmerksamkeit erhalten. Diese erreichen wie die Organoidkulturen eine höhere physiologische Relevanz und können neben den epithelialen auch vaskuläre und immunologische Komponenten miteinbeziehen. Hierdurch lassen sich mechanische Belastungen oder Immunzellmigration als dynamische Aspekte simulieren (53).

Eine weitere Möglichkeit die Interaktion von Nervensystem, Mikrobiota und Mukosa zu untersuchen sind ex vivo Organmodelle im Rahmen von Gewebekulturen. Yissachar et al. (2017) liefern mit ihrem intestinalen Organ-Kultursystem ein Beispiel. Es bildet eine Schnittstelle zwischen Mikroben und Immunzellen in einem intakten Gewebeverband ab. Diese Systeme haben zwar eine aufwendigere Methodik, bieten jedoch eine sehr realitätsnahe Modellierung (54).

Neben zellulären und organotypischen Modellen gibt es tierexperimentelle Ansätze, die die intestinale Barriere im Kontext des gesamten Organismus erforschen. Sie sind zwar wegen interspezifischer Abweichungen in der Anwendbarkeit beschränkt, können jedoch Ernährungseinflüsse, Mikrobiota und Immunantworten integriert erfassen (55).

Die Palette an Modellsystemen reicht von simplen Zellkulturmodellen bis hin zu komplexen humanen Organoiden, wobei jedes Modell spezifische Vor- und Nachteile mit sich bringt. In vitro Ansätze wie Caco-2-Zellen bieten standardisierte, reproduzierbare Systeme, um gezielt Fragestellungen zu adressieren, während tierexperimentelle und ex vivo Versuche eine hohe Komplexität abbilden können, jedoch kosten- und ressourcenintensiver sind und ethische Fragestellungen mit sich bringen. Durch eine Kombination der verschiedenen Modelle lassen sich die vielschichtigen Prozesse der Darmbarrierefunktion zunehmend besser verstehen (52).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es ein in vitro Modell zu entwickeln um einerseits den Einfluss verschiedener Ernährungsmuster (hier: eine gesunde omnivore, eine gesunde vegane und eine ‚westliche‘ Standarddiät) auf die Funktion der Darmbarriere zu untersuchen. Ein weiteres Augenmerk lag auf der Frage, ob bestimmte Ernährungsmuster protektive Effekte auf die Integrität der epithelialen Zellschicht entfalten können.

Im Vordergrund stand daher die Adaptation eines Laborprotokolls, mithilfe dessen Verdau und Fermentation von homogenisierten Speisen simuliert werden kann. Gemeinsam mit der anschließenden Inkubation von ausdifferenzierten Caco-2-Zellmonolayern sollten potenzielle Unterschiede in der Barrierefunktion sichtbar gemacht werden. Dafür wurden der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) und die TLR4-Ligandenkonzentration in verschiedenen Zeitintervallen gemessen.

2. Materialien

2.1 Allgemeines

Lösungen/Chemikalien

Ethanol (EtOH) $\geq 99,8\%$ vergällt (C₂H₆O)

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Natriumhydroxid (NaOH)

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Wasserstoffchlorid (HCl)

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte

Becherglas

Laborbestand

Destilliertes Wasser

Laborbestand

Edelstahlspatel

Laborbestand

Eisbereiter (FM-120KE-50-HC)

Hoshizaki Europe B.V. – HQ, Amsterdam,
Niederlande

Feinwaage

VWR International GmbH, Darmstadt,
Deutschland

Glastrichter

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Kochutensilien

Laborbestand

Labortücher – Kimtech

Kimberly-Clark GmbH, Koblenz, Deutschland

Laborstift

VWR International GmbH, Darmstadt,
Deutschland

Magnetrührer (PCE-MSR 100/MR 3001 K)

PCE Deutschland GmbH, Meschede,
Deutschland

Magnetrührstäbchen ROTILABO®

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Mikroreaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)

Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht,
Deutschland

pH Meter Orion (420A/CG840)

Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA

Pipettenspitzen, 1000 µl, 200 µl,

Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht,

100 µl, 20 µl, 10 µl

Deutschland

Reaktionsgefäßständer -ROTILABO®

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Reinstwasser (Milli-Q [®])	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Research Plus [®] Pipetten (2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Rotiprotect [®] Nitril-Handschuhe	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Röhrchengestell	Laborbestand
Schere	Laborbestand
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
StarGuard [®] Nitril-Handschuhe	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
Stoppuhr	Laborbestand
Thermomix [®]	Vorwerk Deutschland Stiftung & Co.KG, Wuppertal, Deutschland
TipOne Filterspitzen	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland
Vortex Laborschüttler	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland
Vortex REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	Köttermann GmbH, Uetze, Deutschland
Wiegeschalen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifugen (5804R/5427R)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifugen (Z 216 MK/Z 446 K)	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland
Zentrifugenröhren, 15ml, 50ml (Falcon)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Software	
EBISpro	Version 2011, Deutschland
GraphPad Prism 7	GraphPad Software, Inc., Boston, USA
Microsoft Office 365	Microsoft Corporation, Redmond, USA

Zotero

Corporation for Digital Scholarship, Virginia,
USA

2.2 Gefriertrocknung

Verbrauchsmaterialien und Geräte

Gefriertrockner

Labconco, Kansas City, USA

Zellkulturschalen

TPP Techno Plastic Products AG,
Trasadingen, Schweiz

2.3 In vitro Verdau

Chemikalien/Lösungen

Alpha-Amylase aus Humanspeichel
(A1031-1KU)

Sigma-Aldrich, Inc., Saint Louis, USA

Ammoniumcarbonat ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$)

Carl ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Galle (Rind, B3883-25G)

Sigma-Aldrich, Inc., Saint Louis, USA

Gastrische Lipase und Pepsin

(RGE15-100 mg)

Lipolytech SASU, Marseille, Frankreich

Kaliumchlorid (KCl)

Carl ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)

Sigma-Aldrich, Inc., Saint Louis, USA

Kalziumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$)

Carl ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$)

Carl ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Natriumchlorid (NaCl)

Carl ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)

Carl ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Pankreatin (P7545-25G)

Sigma-Aldrich, Inc., Saint Louis, USA

Verbrauchsmaterialien und Geräte

CO₂-Inkubator (MCO-170A/C-PE)

Kipp-/Rollenmischer RS-TR-Serie
(Modell RS-TR 05)

pH Meter Orion (420A/CG840)

Wasserbad

Panasonic Biomedical Sales Europe, Etten-
Leur, Niederlande

Phoenix Instrument GmbH, Garbsen,
Deutschland

Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Köttermann GmbH, Uetze, Deutschland

2.4 In vitro Fermentation

Chemikalien/Lösungen

Glycerol ROTIPURAN® ≥99,5 %

L-Cystein (97 %)

Natriumphosphat, monobasisch, Dihydrat
(NaH₂PO₄ · 2H₂O)

Natriumsulfidhydrat (Na₂S · H₂O)

Pepton

Resazurin Natriumsalz

Carl ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Carl ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA

Sigma-Aldrich, Inc., Saint Louis, USA

Carl ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Sigma-Aldrich, Inc., Saint Louis, USA

Verbrauchsmaterialien und Geräte

CO₂-Inkubator (MCO-170A/C-PE)

Kipp-/Rollenmischer RS-TR-Serie
(Modell RS-TR 05)

pH Meter Orion (420A/CG840)

Standautoklav HV-Serie (85 L)

Sterilbank Mars Safety Class 2 (Scanlaf)

Stuhlprobenbehälter

Vortex REAX 2000

Panasonic Biomedical Sales Europe, Etten-
Leur, Niederlande

Phoenix Instrument GmbH, Garbsen,
Deutschland

Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
HMC Europe GmbH, Tüßling, Deutschland

LaboGene ApS, Lyngø Dänemark

Sarstedt Aktiengesellschaft & Co KG
Nümbrecht, Deutschland

Heidolph Instruments GmbH & Co. KG,
Schwabach, Deutschland

Zentrifugen (5804R/5427R)

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

2.5 Zellkultur

Zelllinie

Caco-2 Zellen (DSMZ Nr.: ACC 169)

Leibniz-Institut, Braunschweig, Deutschland

Chemikalien/Lösungen

D-Fruktose

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)
(4,5 g/L Glukose, mit L-Glutamin & Na-Pyruvat)

PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)
ohne Ca & Mg (1x)

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

Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)

N,N,N',N'-tetraaceticacid (EGTA)

PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

Fetales Rinderserum (FRS) (Cat No: S0115,
Lot No: 1241W)

PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Laborbestand

Lipopolysaccharide (1,5 µg/mL)

MEM non-essential Amino Acids (100x)

PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)

Carl ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Penicillin/Streptomycin

PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

TRitidy G™ (Trizol)

AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

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

PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

Verbrauchsmaterialien und Geräte

CO₂-Inkubator (MCO-170A/C-PE)

Panasonic Biomedical Sales Europe, Etten-
Leur, Niederlande

Deckgläser

Carl ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Handzähler

Laborbestand

Inverses Mikroskop mit Phasenkontrast

(ID02)	Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland
Laboport [®] Mini-Laborpumpe	DLAB SCIENTIFIC CO., LTD., Peking, China
Neubauer Zählkammer	Superior, Marienfeld, Deutschland
Omnifix Luer Lock Solo (Einmalspritzen 10ml/Spritzen zum filtrieren)	B. Braun Austria GmbH, Maria Enzersdorf, Österreich
Pasteurpipetten	Carl ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pipettierhilfe	DLAB Scientific Inc., Beijing, China
Sterilbank Mars Safety Class 2 (Scanlaf)	LaboGene ApS, Lynge Dänemark
Syringe Filter, 0,22 µm (Rotilabo [®] - Spritzenfilter, 0,22µm Porengröße)	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
Wasserbad	Köttermann, Hänigsen, Deutschland
Zellkultureinsatz Multiwell™ 12 Well (353090)	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co KG Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm ³ , 75 cm ³)	Sarstedt Aktiengesellschaft und Co KG, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatte 12 Well	Sarstedt Aktiengesellschaft und Co KG, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugen (5804R/5427R)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.5.1 Messung des transepithelischen elektrischen Widerstands (TEER)

Verbrauchsmaterialien und Geräte

Millicell [®] ERS Elektrode	Millipore Corporation, Bedford, MA, USA
Millicell [®] ERS Messgerät	Millipore Corporation, Bedford, MA, USA

Chemikalien/Lösungen

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) ohne Ca & Mg (1x)	Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA
--	-------------------------------------

2.5.2 Messung von “Toll like receptor 4” (TLR4)-Liganden

Chemikalien/Lösungen

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)

ohne Ca & Mg (1x)

HEK-Blue™ Detection

Reinstwasser (Milli-Q®)

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

InvivoGen S.A.S., Toulouse, Frankreich

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Verbrauchsmaterialien und Geräte

96-Well-Mikroplatte

CO₂-Inkubator (MCO-170A/C-PE)

iMark™ Mikrotiterplatten-Absorptions-
messgerät

Inverses Mikroskop mit Phasenkontrast
(ID02)

Neubauer Zählkammer

Vortex REAX 2000

VWR International GmbH, Darmstadt,
Deutschland

Panasonic Biomedical Sales Europe, Etten-
Leur, Niederlande

Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA

Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland

Superior, Marienfeld, Deutschland

Heidolph Instruments GmbH & Co. KG,
Schwabach, Deutschland

3. Methoden

Die in der vorliegenden Arbeit als omnivor und vegan bezeichneten Speisen entsprechen in ihrer Zusammensetzung den Empfehlungen der Fachgesellschaften für Ernährung (DGE, ÖGE, SGE) für den Erhalt des Normalgewichts. Die Zubereitung der Gerichte erfolgte in der Küche des Departments für Ernährungswissenschaften der Universität Wien (Josef-Holaubek-Platz 2 (UZA II), Althanstraße 14, 1090 Wien) nach zuvor durch einen Koch (im Einklang mit der Software EBISpro, Version 2011) erstellten Rezepten, die aktuell auch in einer Humanstudie eingesetzt werden (die Zusammensetzung der Speisen ist im Anhang nachlesbar). Im Anschluss an die Zubereitung wurden die fertig gekochten Mahlzeiten mittels Haushaltsmixer zerkleinert, in 50 mL Falcons abgefüllt und bei -20 °C tiefgefroren. Die zerkleinerten, gefrorenen Speisen wurden im nächsten Schritt bei -48 °C gefriergetrocknet und danach abermals im Mixer pulverisiert und in 5 g Proben aliquotiert. Diese Speiseproben konnten nun für den Verdau und anschließend verdaut für die weiteren Verfahren verwendet werden und waren für alle in dieser Arbeit inkludierten Versuche bzw. Messwerte identisch.

3.1 Gefriertrocknung

Zur Gefriertrocknung wurde ein FreeZone Gefriertrockner (Labconco, USA) verwendet. Zuvor wurden die Mahlzeiten der omnivoren -, veganen - und Standarddiät gegart, mit einem Haushaltsmixer homogenisiert und bei -20 °C vorgefroren. Anschließend erfolgte die Lyophilisation bei einer Kollektortemperatur von -48 °C und unter Vakuumbedingungen über einen Zeitraum von 48 Stunden, um eine vollständige Trocknung der Proben zu gewährleisten. Nach der Gefriertrocknung wurden die Proben zu einem Pulver zerkleinert und je 5 g in ein Reaktionsgefäß abgefüllt und bei -20 °C bis zur Verwendung im in vitro Verdau gelagert.

3.2 In vitro Verdau-Protokoll

Basierend auf dem Protokoll von Brodkorb et al. (56) wurden die gefriergetrockneten Speisen zunächst in vitro verdaut. Für den in vitro Verdau wurden zuerst Lösungen für die Elektrolyte und die simulierten Verdauungsflüssigkeiten hergestellt, da sie gut lagerbar sind. Dafür wurden die Elektrolyte in einem bestimmten Verhältnis mit Reinstwasser (Milli-Q System, © Millipore) versetzt, um eine definierte Konzentration der Salze zu erreichen (siehe Tabelle 1). Im vorliegenden Protokoll wurden drei verschiedene Verdauungslösungen verwendet, um die vorbereiteten Speisen zu verdauen. Sie wurden durch Mischen der oben erwähnten Elektrolyte und das Einstellen des im Protokoll definierten pH-

Wertes entsprechend der Fachliteratur hergestellt. Die dafür verwendeten Elektrolyte, ihre Konzentrationen, sowie die Zusammensetzung der Verdauungsflüssigkeiten kann Tabelle 1 entnommen werden.

Tabelle 1 Zusammensetzung der simulierten Speichel-, gastrischen- und intestinalen Verdauungsflüssigkeiten

			Simulierte Speichel- flüssigkeit (SSF)	Simulierte gastrische Flüssigkeit (SGF)	Simulierte intestinale Flüssigkeit (SIF)
			<i>pH7</i>	<i>pH3</i>	<i>pH7</i>
	<u>g/L</u>	<u>mol/L</u>	<u>mL</u>	<u>mL</u>	<u>mL</u>
KCl	37,3	0,5	15,1	6,9	6,8
KH ₂ PO ₄	68	0,5	3,7	0,9	0,8
NaHCO ₃	84	1	6,8	12,5	42,5
NaCl	117	2	-	11,8	9,6
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30,5	0,15	0,5	0,4	1,1
(NH ₄) ₂ CO ₃	48	0,5	0,06	0,5	-
HCl		1	0,09	1,3	0,7
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	44,1	0,3	0,025	0,005	0,04

Die Lagerung der Stocklösungen und der simulierten Verdauungsflüssigkeiten erfolgte bei -20 °C (Haltbarkeit: 1 Jahr nach Herstellung bei entsprechender Lagerung). Die für den Verdau verwendeten Enzyme wurden aufgrund ihrer Reaktivität erst kurz vor Versuchsstart vorbereitet. Die später in den Verdauungsflüssigkeiten enthaltenen Enzyme sind Amylase (SSF), gastrische Lipase (SGF), Pepsin (SGF), Pankreatin (SIF) und Galle (SIF) (siehe Tabelle 2).

Für jede Diät wurde ein 50 mL Falcon vorbereitet. Die in dieser Arbeit untersuchten Diätgruppen waren: omnivore Ernährung, vegane Ernährung und eine ‚westliche‘ Standarddiät, die die Ernährungsgewohnheiten des größten Teils der österreichischen Bevölkerung widerspiegeln sollte. Zudem wurde ein Vehikel vorbereitet, welches den Verdau ohne Speisen (stattdessen mit der aliquoten Menge Wasser), jedoch mit allen Enzymen und der Galle durchlief, um den Effekt der Enzyme und Verdauungslösungen auf die Zellkultur zu beobachten.

Ablauf des Verdauungsprozesses

Im Verdauungsprozess wurden zuallererst die simulierten Verdauungsflüssigkeiten bei 37 °C im Wasserbad erwärmt. Im nächsten Schritt wurden alle Enzym- und Gallenlösungen zeitlich so nah wie möglich am Start der ersten Inkubation hergestellt und auf Eis gelagert. Pankreatin und Galle wurden im Gegensatz zu den anderen Enzymen in der simulierten intestinalen Flüssigkeit in Lösung gegeben.

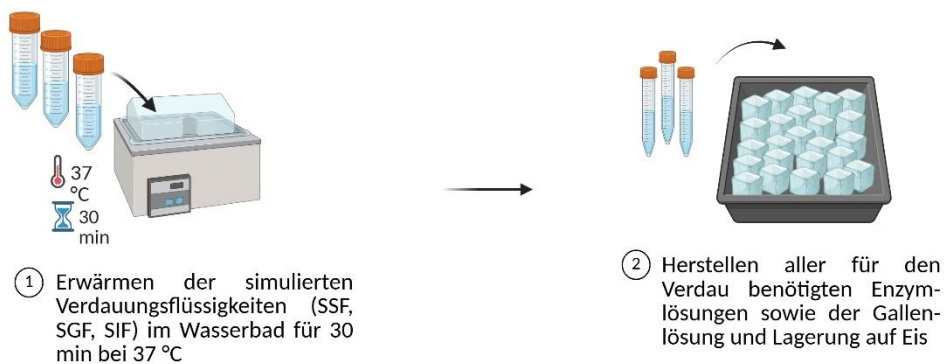


Abbildung 4 Vorbereitung der benötigten Lösungen für den Verdauungsvorgang. SSF = simulierte Speichelflüssigkeit, SGF = simulierte gastrische Flüssigkeit, SIF = simulierte intestinale Flüssigkeit. Erstellt mit BioRender.com

Um die pH Adjustierungen während der einzelnen Verdauungsphasen (Inkubation mit den drei verschiedenen Verdauungslösungen SSF, SGF und SIF und die Anpassungen an die jeweils festgelegten pH-Milieus) effizienter zu gestalten, wurde ein weiteres Reaktionsgefäß vorbereitet, worin sich das zerkleinerte Essen, Enzyme und Galle für die gesamte Verdauungsphase befanden. Dieses Reaktionsgefäß durchlief zeitverzögert vor dem Verdau den Verdau, wobei die Mengen an zugegebener NaOH und HCl gemessen und notiert wurden, die benötigt wurden, um den definierten pH-Wert zu erreichen. Diese Mengen dienten zur Orientierung für die benötigten Mengen an Basen und Säuren für die gastrische und intestinale Phase beim Verdau (56).

Das Quantum an Enzymen, die für einen einzelnen Verdaudurchlauf verbraucht wurden, hing von der Menge an zu verdauenden Speisen ab. Für diese Arbeit wurden 5 g gefriergetrocknete Speisen pro Interventionsgruppe in den Verdau eingeschleust. Die Menge an Enzymen, die hierfür nötig war, ist in Tabelle 2 nachlesbar.

Tabelle 2 Für die orale, gastrische und intestinale Phase des Verdau benötigte Mengen an Enzymen

Amylase	Gastrische Lipase + Pepsin (RGE)	Pankreatin	Galle
6 mg	320 mg	2,67 g	2,4 g

3.2.1 Orale Phase

Für die Orale Phase des Verdaus wurden die gefriergetrockneten Speisen zunächst mit der dreifachen Menge Reinstwasser verdünnt (g/vol) und anschließend mit simulierter Speichelflüssigkeit (SSF) im Gewichtsverhältnis 1:1 (z.B. 5 g Speise mit 5 g SSF) vermisch, um eine pastenartige Konsistenz, ähnlich wie die von Tomatenmark oder Senf, am Ende der oralen Phase zu erhalten. Falls die Konsistenz des Bolus dicker war als eine solche Paste, wurde Wasser hinzugefügt, um die angestrebte Konsistenz zu erhalten. Im nächsten Schritt wurde Calciumchloriddihydrat in einer Konzentration hinzugegeben, um eine Konzentration von 1,5 mM in SSF zu erreichen. Danach wurde Speichelamylase zuerst mit Wasser vermengt, um eine Aktivität von 75 IU/mL in der finalen Verdauungsflüssigkeit zu erreichen und anschließend hinzugegeben. Dann wurde das restliche Wasser beigemengt, um eine 1-fache Konzentration der SSF zu erreichen und das Falcon in einem Inkubator bei 37°C für 2 Minuten inkubiert (56).

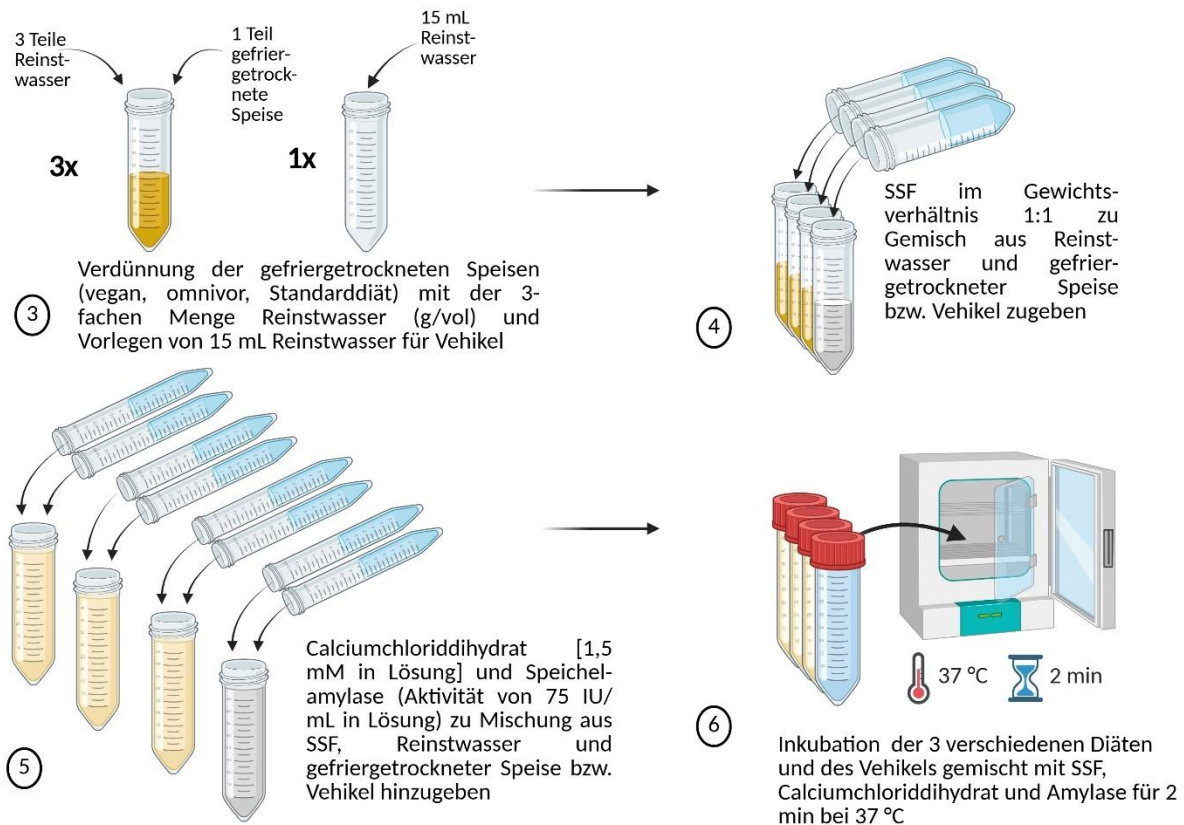


Abbildung 5 Arbeitsschritte der oralen Phase des Verdaus. SSF = simulierte Speichelflüssigkeit, IU = internationale Einheiten.

Erstellt mit BioRender.com

3.2.2 Gastrische Phase

Nach Ablauf der Inkubationszeit der oralen Phase beginnt die gastrische Phase des Verdauungsprozesses. Zum Start wurde der orale Bolus nach dem Entnehmen aus dem Inkubationsschrank mit der simulierten gastrischen Flüssigkeit (SGF) im Volumenverhältnis 1:1 gemischt und der pH-Wert auf 3,0 eingestellt.

Anschließend wurde die Calciumchloriddihydrat-Lösung hinzugegeben, um eine Konzentration von 0,15 mM in SGF zu erreichen, ebenso wie die in Wasser vorbereitete gastrische Lipase-Lösung. Dabei wurde eine Enzymaktivität von 60 U/mL in der Verdauungsflüssigkeit und weiterhin ein pH-Wert von 3,0 anvisiert. Danach wurde Wasser hinzugefügt, um eine einfache Konzentration von SGF zu erhalten und die Proben bei 37°C für 2 h inkubiert, ab dem Zeitpunkt, zu dem das Pepsin zugegeben wurde. Dabei wurden die Proben durchgehend auf einem Wippschüttler in Bewegung gehalten (56).

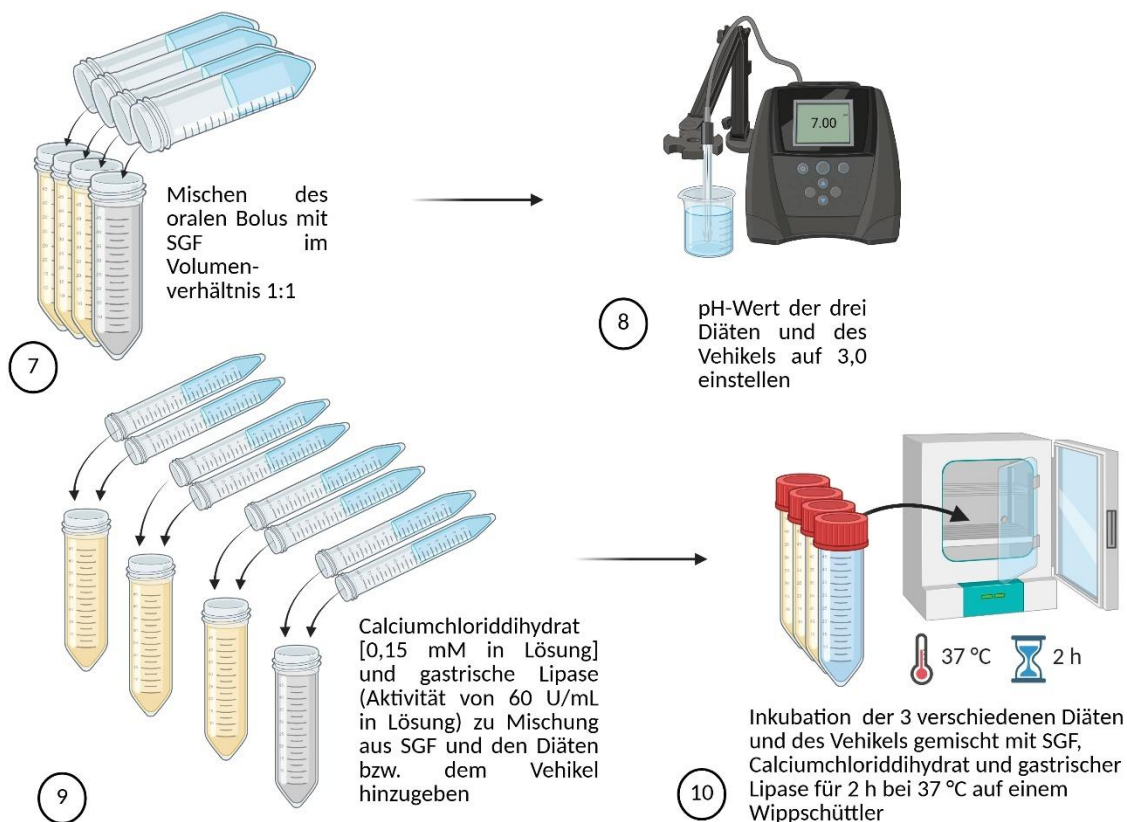


Abbildung 6 Arbeitsschritte der gastrischen Phase des Verdauens. SGF = simulierte gastrische Flüssigkeit, U = Einheiten. Erstellt mit BioRender.com

3.2.3 Intestinale Phase

Nach der Inkubationszeit der gastrischen Phase wurden die simulierte intestinale Flüssigkeit (SIF) und der Speisebrei aus dem Magen im Volumenverhältnis 1:1 gemischt und der pH-Wert auf 7,0 eingestellt.

Die Gallelösung wurde dann zum SIF/Magenbrei-Mix hinzugegeben, wobei eine finale Konzentration von 10 mM erreicht werden sollte. Die Lösung rotierte anschließend auf einem Wippschüttler bei 37°C für mindestens 30 min., sodass sich die Galle gut löst. Danach wurde die Calciumchloriddihydratlösung bei einer angestrebten Konzentration von 0,6 mM in SIF hinzugefügt und die Pankreatin Suspension in SIF ebenfalls zugegeben und dabei eine Trypsinaktivität von 100 U/mL angestrebt. Dann wurde der pH-Wert nochmals auf 7,0 eingestellt. Im nächsten Schritt wurde Wasser hinzugefügt, um eine einfache Konzentration von SIF zu erhalten und die Proben bei 37°C auf einem Wippschüttler für 2 h inkubiert, um den Verdauungsmix ausreichend zu durchmischen. Hierfür wurde die Zeit erst genommen, sobald Pankreatin hinzugegeben wurde. Der Verdau wurde durch einen fünfminütigen Hitzeschock bei 100 °C beendet und die Falcons danach bei -80 °C tiefgefroren (56).

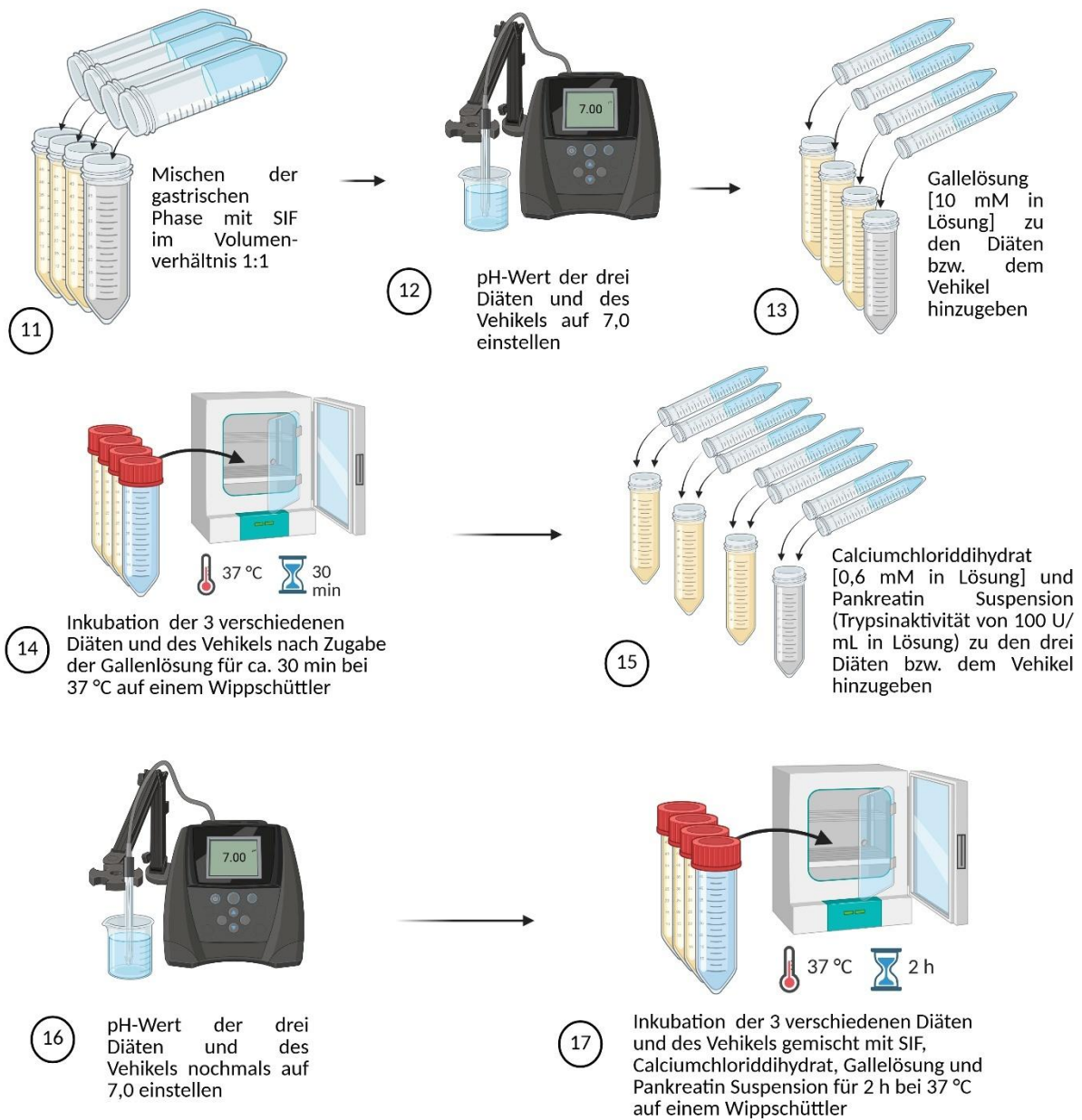


Abbildung 7 Arbeitsschritte der intestinalen Phase des Verdaus. SIF = simulierte intestinale Flüssigkeit, U = Einheiten. Erstellt mit BioRender.com

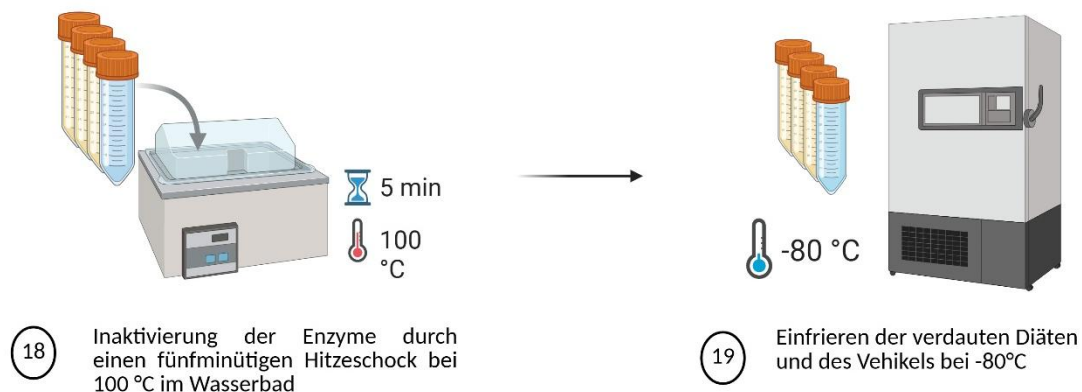


Abbildung 8 Beenden des Verdaus durch Inaktivierung der Enzyme mittels Hitzeschock und Lagerung der verdauten Probenröhrchen bei -80°C. Erstellt mit BioRender.com

3.3 In vitro Fermentation-Protokoll

Bevor mit der Fermentation der verdauten Speisen begonnen wurde, wurde der Stuhl von gesunden Proband*innen unter sterilen Bedingungen gesammelt. Nach der Probennahme wurde die Stuhlprobe mit einer Glycerol:Wasser Lösung (20 % vol/vol) im Verhältnis 1:1 gemixt und bei -80 °C gelagert. Zudem wurden am Tag vor der Fermentation alle Reagenzien vorbereitet und autoklaviert, mit Ausnahme von L-Cystein, da es hitzesensibel ist. Es wurde nach dem Autoklavieren hinzugefügt. Vorzubereitende Reagenzien für die Fermentation waren der Phosphatpuffer, die Peptonlösung, die Resazurinlösung und die reduktive Lösung. Im Folgenden ist die Herstellung der Reagenzien genauer beschrieben (57):

- Der Phosphatpuffer wurde als eine 0,1 molare Lösung mit einem pH-Wert von 7,0 hergestellt. Dabei wurde das Natriumphosphat monobasische Dihydrat in weniger Volumen des Reinstwasser gelöst, als das finale Volumen vorsieht und anschließend mit Reinstwasser auf das finale Volumen aufgefüllt. Der Phosphatpuffer kann bis zu einen Monat bei Raumtemperatur gelagert werden. Vor dem Gebrauch sollte der pH gecheckt und ggf. eingestellt werden.
- Die Peptonlösung wurde mit 1,5 %-iger Konzentration von Pepton in Reinstwasser (1,5 g Pepton auf 100 mL Wasser) bei einem pH-Wert von 7,0 hergestellt.
- Die Resazurinlösung wurde in 0,1 %-iger Konzentration (wt/vol) vorbereitet. Dafür wurde 1 mg Resazurin eingewogen und in 1 mL Reinstwasser gelöst. Pro 100 mL Fermentationsmedium wurden 125 µL Resazurinlösung benötigt.

- Für die reduktive Lösung wurden 31,2 mg L-Cystein und 31,2 mg Natriumsulfit in 200 μ L 1 M NaOH gelöst und auf 5 mL Gesamtvolumen mit Reinstwasser aufgefüllt.

Das Autoklavieren aller Utensilien, die bei der Fermentation genutzt wurden, erfolgte einen Tag vor dem Experiment und die Utensilien wurden anschließend in Folie gewickelt gelagert. Die Volumina, die durch das Autoklavieren verloren gingen, wurden durch Reinstwasser ersetzt.

Nach dem Autoklavieren der für die Fermentation benötigten Substanzen, konnte aus den oben in ihrer Herstellung stichpunktartig beschriebenen Lösungen das Fermentationsmedium hergestellt werden. Für 100 mL Fermentationsmedium wurden 100 mL Peptonlösung, 5 mL reduktive Lösung und 125 μ L Resazurinlösung unter sterilen Bedingungen miteinander vermengt (57).

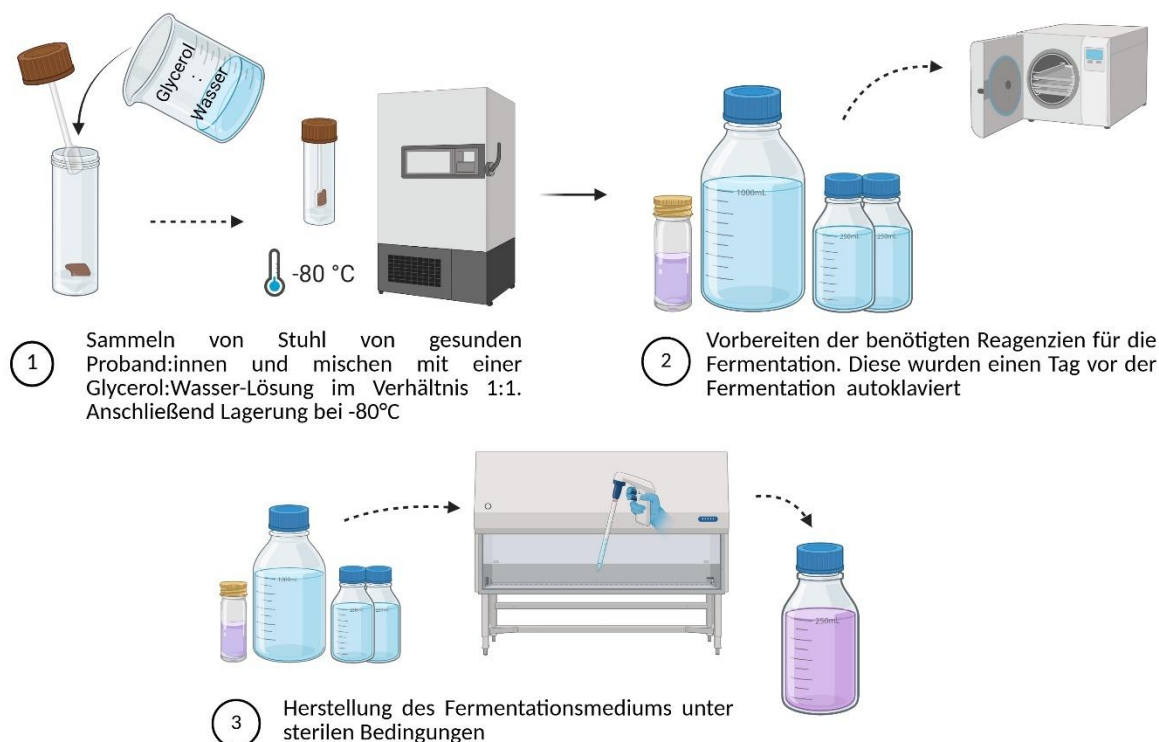


Abbildung 9 Vorbereitungen für die Fermentation der verdauten Proben. Erstellt mit BioRender.com

Nachdem alle Utensilien vorbereitet wurden, konnte das Fermentationssubstrat angelegt werden. Zuvor wurden die Verdauprodukte bei 4000 g und 4 °C für 10 min. zentrifugiert. 0,5 g fester Überrest aus der Zentrifugation wurden in 50 mL Falcons eingewogen und mit einem Edelstahlspatel homogenisiert. Zusätzlich wurden 10 % (vol/vol) vom Überstand des in vitro Verdaus hinzugefügt. Dies hat den Hintergrund, dass bei der menschlichen Verdauung durchschnittlich ca. 10 % des theoretisch

vom Dünndarm aufnehmbaren Darminhalts nicht aufgenommen werden und den Dickdarm erreichen (57).

Anschließend wurde die Stuhlprobe von Schritt 1 verwendet, um das Inoculum bei 32 % (wt/vol) Fäzes/Phosphatpuffer, einer Konzentration von 0,1 M und einem pH von 7,0 herzustellen. Die Stuhlproben wurden nach dem Auftauen aerob bei 4000 g für 10 min. bei 4 °C zentrifugiert, um das Glycerol zu entfernen. Hierfür wurde der Überstand verworfen und das Pellet behalten. Das fäkale Pellet wurde dann in Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,0) bei einer Konzentration von 32 % Fäkalpellet: Phosphatpuffer (wt/vol) resuspendiert und direkt danach durch vortexen für 1 min. gründlich homogenisiert. Weiters wurde die fäkale Suspension bei 550 g für 5 min. bei Raumtemperatur zentrifugiert, um größere Partikel loszuwerden. Der Überstand der Zentrifugation stellte das fäkale Inoculum dar, das direkt nach dem Zentrifugieren vorsichtig in ein anderes Gefäß überführt wurde, sodass die größeren Partikel/Ablagerungen im zentrifugierten Röhrchen verbleiben. Das fäkale Inoculum wurde anschließend zu jedem Fermentationsröhrchen in Relation von 20 % (vol/vol) zum Fermentationsmedium und der zu testenden Substratprobe zugegeben. Unter aseptischen

Bedingungen wurden folglich 7,5 mL des Fermentationsmediums und 2 mL fäkales Inoculum zu jedem Fermentationsröhrchen zugegeben, das die eingewogene Probe und den Überstand enthielt (57).

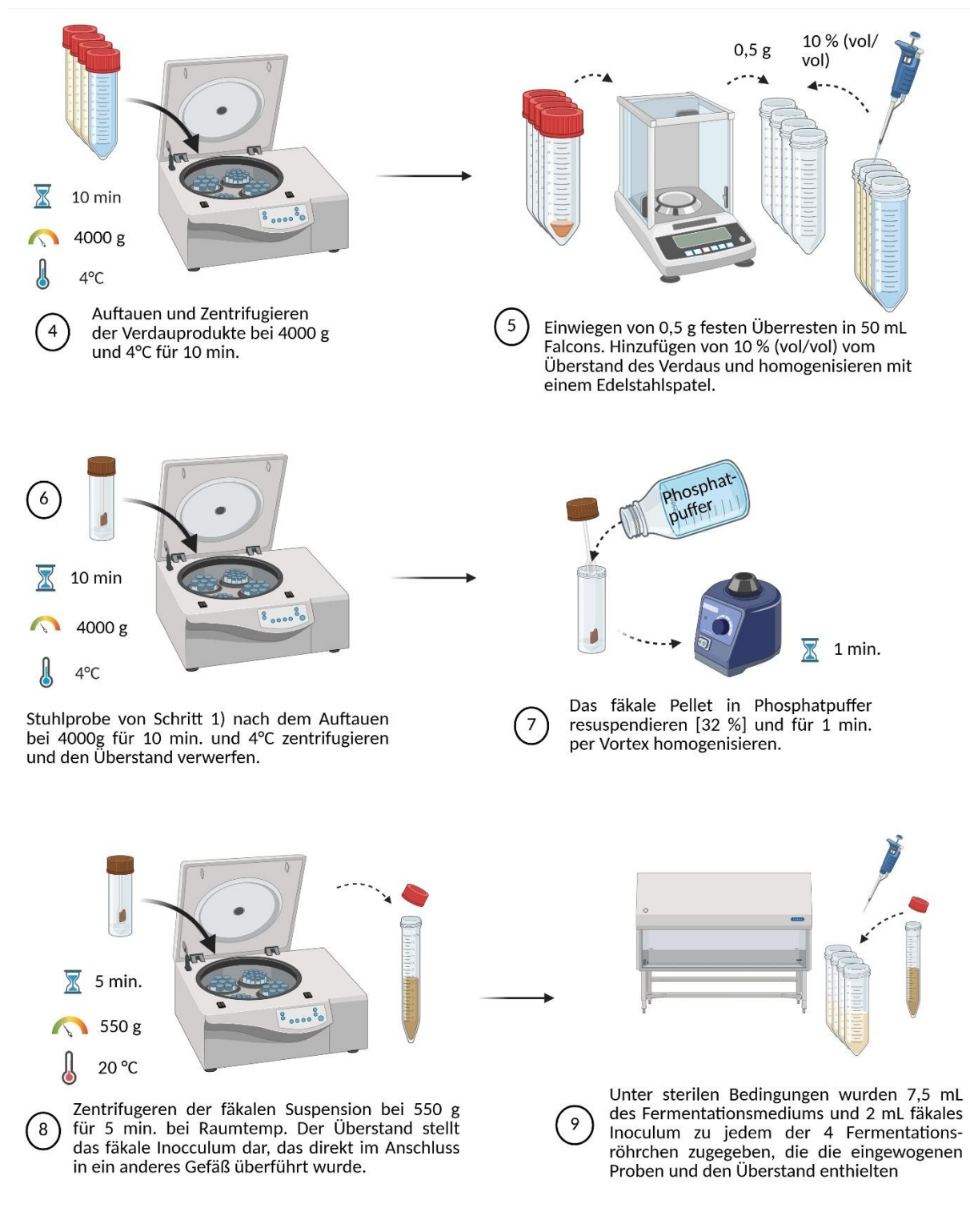


Abbildung 10 Arbeitsschritte zur Aufbereitung des Fermentationssubstrats und Herstellung des fäkalen Inoculum. Erstellt mit BioRender.com

Im anschließenden Fermentationsschritt wurden die Tubes für 20 h bei 37 °C bei einer Oszillation von 20 rpm inkubiert (Pérez-Burillo et al., 2021). Um die Fermentation zu stoppen, wurden alle Proben für 15 min. auf Eis gekühlt und danach bei 4200 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut bei 4200 g und 4 °C für 15 min. zentrifugiert und im Anschluss der Überstand abermals abgenommen und bei -80 °C tiefgefroren (Stein et al., 2011).

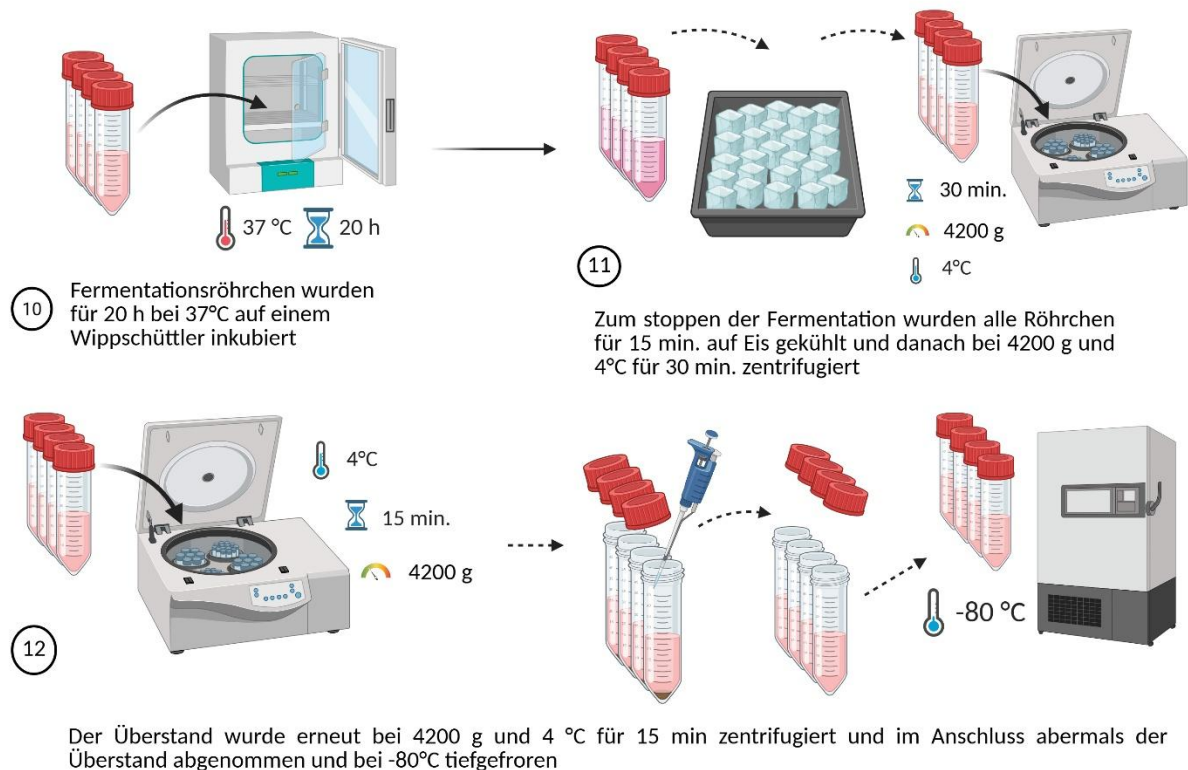


Abbildung 11 Arbeitsschritte zur Durchführung und Beendigung der Fermentation, sowie der anschließenden Lagerung.

Erstellt mit BioRender.com

Für die darauffolgenden Versuche war es essenziell den Inhalt des Falcons zuerst gründlich zu durchmischen, um sicherzugehen, dass Bakterienstämme oder interessante Stoffe sich während der Zeit auf Eis nicht abgesetzt haben. Zuletzt wurden die aliquotierten Proben vor dem Auftragen auf die Zellkultur sterilisiert. Dafür wurden sie schnell aufgetaut, in 2 mL Tubes aliquotiert und bei 16 000 g/RCF und 4°C für 5 min. zentrifugiert. Um die Sterilität zu gewährleisten, wurden die Proben zuletzt

bei einer Porengröße von 0,22 μm filtriert und in der Zellkultur verwendet bzw. bei -80°C tiefgefroren (Pérez-Burillo et al., 2021).

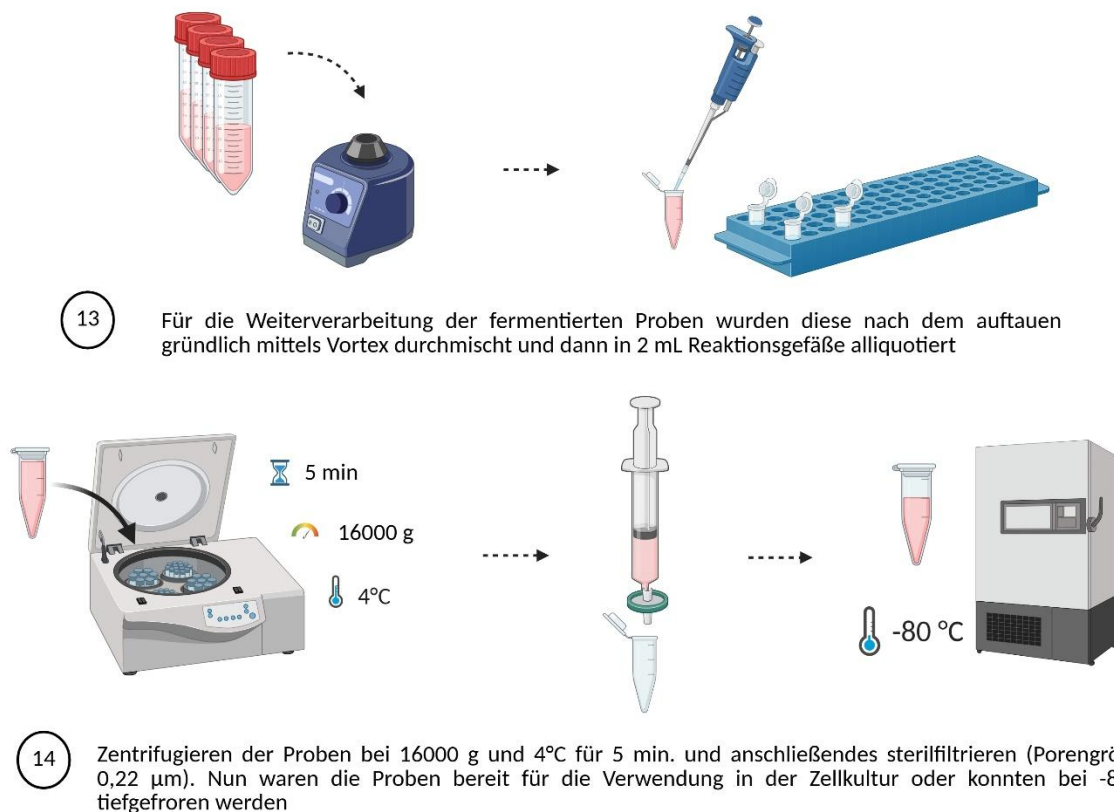


Abbildung 12 Aliquotieren und Aufbereiten der verdauten und fermentierten Proben. Erstellt mit BioRender.com

3.4 In vitro-Analysen unter Verwendung des humanen Caco-2 Zellmodells

In den Zellkulturversuchen kam die humane, epithelähnliche und adhärent wachsende Kolonzelllinie Caco-2 (DSMZ Nr.: ACC 169) zum Einsatz. Sie wurde 1974 aus einem primären Kolontumor eines 72-jährigen Mannes isoliert und dient aufgrund ihrer charakteristischen funktionellen, morphologischen und phänotypischen Merkmale als etabliertes Modell für Dünndarm-Enterozyten (46,58). Nach dem Entnehmen aus der Kryolagerung wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank in eine 75 cm^3 Zellkulturflasche überführt und dort bis zur etwa 70-80 %-igen Konfluenz (ca. 70-80 % des Flaschenbodens durch Zellmonolayer bedeckt) kultiviert. Die Caco-2 Zellen wurden in einem Inkubator bei feuchtem Klima mit 5 % CO_2 -Konzentration gelagert und mithilfe von DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)-Zellkulturmedium versorgt, welches zu 10 % mit fetalem Rinderserum, zu 1 % mit einem Gemisch aus Penicillin und Streptomycin

und zu 1 % mit nicht essenziellen Aminosäuren versehen wurde (genaue Mengenangaben siehe Tabelle 3).

Tabelle 3 Inhalt des Zellkulturmediums für die Kultivierung von Caco-2 Zellen

Menge	Medium
440 mL	DMEM (4,5 g/L Glukose, mit L-Glutamin & Na-Pyruvat)
50 mL	Fetales Rinderserum
5 mL	Penicilin/Streptomycin
5 mL	Nicht essenzielle Aminosäuren

Sobald die Zellen in der Zellkulturflasche die 70-80 %-ige Konfluenz erreicht hatten, wurden sie „gesplittet“ und in eine neue Zellkulturflasche pipettiert, worin sie wiederum bis zur 70-80 %-igen Konfluenz kultiviert wurden. Dafür wurden zunächst die verwendeten Lösungen Trypsin/EDTA, DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) und DMEM bei 37°C für 20 Minuten im Wasserbad erwärmt und die Sterilbank mit Ethanol gereinigt. Nach Ablauf der 20 Minuten wurden die Zellen zuerst mit DPBS, einer salzhaltigen Pufferlösung, gewaschen. Hierfür wurde das verbrauchte Medium aus der Zellkulturflasche der zu splittenden Zellen abgesaugt, 5 mL DPBS hinzugefügt, die Zellen für 5 Minuten mit dem Puffer inkubiert und anschließend der Puffer abgenommen. Im Anschluss wurde 1,5 mL Trypsin/EDTA in die Flasche pipettiert und für 2 Minuten gewartet, das Trypsin/EDTA wieder verworfen, erneut mit 1,5 mL Trypsin versehen und für 10-12 Minuten im Inkubator bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden 5 mL DMEM, das Kultivierungsmedium, hinzugefügt, um das Trypsin zu deaktivieren und die Suspension in ein Falcon-Röhrchen überführt, das dann bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert wurde. Der Überstand aus der Zentrifugation wurde verworfen, das Zellpellet in 5 mL frischem DMEM resuspendiert und anschließend die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für eine frische 75 cm³-Flasche wurde eine Zelldichte von $24,3 \times 10^4$ Zellen pro Flasche festgelegt und die dafür erforderliche Menge Zellsuspension in 10 mL frischem DMEM ausgesät. Das Kultivierungsmedium wurde daraufhin alle zwei bis drei Tage gewechselt. Zusätzlich wurden aus den Zellkulturflaschen bei diesem Vorgang Zellen entnommen und in Transwell-inserts (Porengröße: 0,4 µm) auf 12-Well-Platten überführt und dort bei einer Zelldichte von $0,7 \times 10^5$ Zellen pro Transwell-insert für 12 Tage bis zur vollen Ausdifferenzierung mithilfe von DMEM-Nährmedium (1,5 mL basolateral; 0,5 mL apikal) kultiviert und anschließend mit den sterilfiltrierten Proben des Verdaus inkubiert.

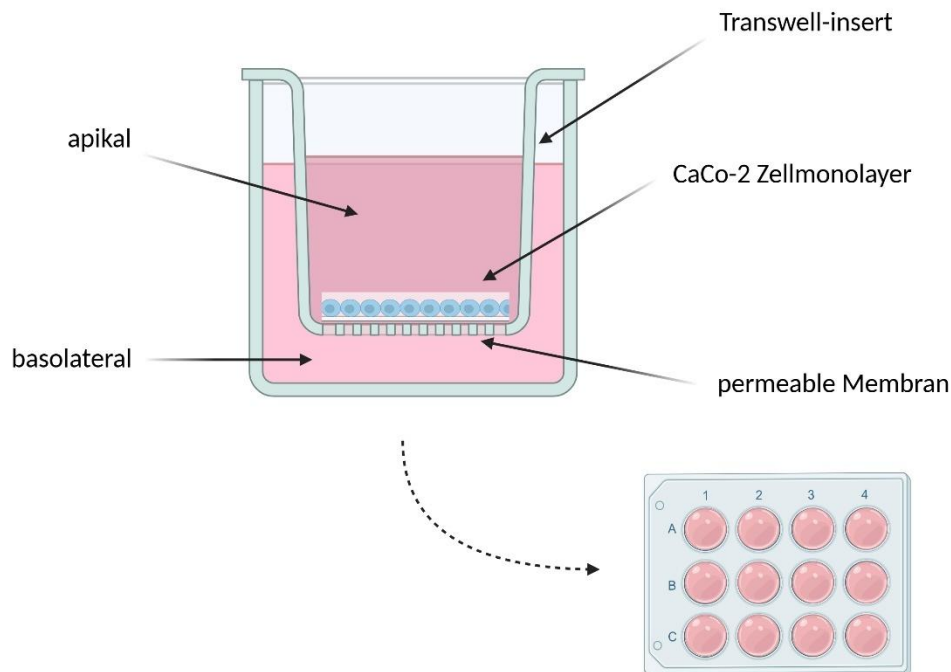


Abbildung 13 Transwell-insert mit CaCo-2 Zellmonolayer in 12-Well-Platte. Erstellt mit BioRender.com (modifiziert nach (59).

Hierfür wurde der Versuch auf zwei 12-Well-Platten aufgeteilt. Die Barrierefunktion der ausdifferenzierten Zellmonolayer wurde mittels Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) bewertet.

3.4.1 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands

Der transepithelische elektrische Widerstand (TEER) ist ein quantitatives Verfahren zur Messung der Integrität der Tight-Junction-Dynamik in Zellkulturmodellen von endothelialen und epithelialen Monolayern. Der TEER-Wert ist ein aussagekräftiger Indikator für die Integrität der zellulären Barrieren. TEER-Messungen können in Echtzeit ohne Zellschädigung durchgeführt werden und beruhen im Allgemeinen auf der Messung des ohmschen Widerstands (60).

Der transepithelische elektrische Widerstand wurde zwischen dem apikalen und dem basolateralen Kompartiment der Transwellssysteme gemessen, um zu erkennen, wie sich die Integrität der zellulären Barrieren im Zeitverlauf entwickelt. Dafür wurde während der Inkubation mittels Messelektrode der ohmsche Widerstand der CaCo-2 Zellbarriere gemessen und ausgewertet. Die Werte wurden in Form der prozentuellen Veränderung des ohmschen Widerstandes gegenüber dem Zeitpunkt der ersten Messung bezogen auf die Fläche des Transwell-Inserts dargestellt (Ω/cm^2). Zur Errechnung der

Permeabilität wurde die Optische Dichte des Unterstands (mit Abzug des Leerwerts) durch die Optische Dichte des Überstands (mit Abzug des Leerwerts) dividiert und mit 100 multipliziert, um einen Prozentwert zu erhalten.

Die Messelektrode des Geräts wurde vor Gebrauch equilibriert, indem die Elektrode für 2 min in Ethanol sterilisiert und im Anschluss 15 min lang in der Messlösung bei 37 °C equilibriert wurde. Vor jeder Messung wurde der Blank (Transwell-Inserts mit Nährmedium, ohne Zellen) bestimmt und danach die Behandlungsgruppen in den 12-Well-Platten in Dreifachbestimmung gemessen. Die erfassten TEER-Werte, die um den Widerstand des Blanks als Hintergrundwert angepasst wurden, wurden auf die Oberfläche des Zellmonolayers ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) bezogen und als Anteil des TEER-Werts vor der Behandlung angegeben.

3.4.2 Versuchsaufbau der Zellkulturversuche mit der Caco-2 Zelllinie

Der Versuchsaufbau wurde innerhalb der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Bergheim entwickelt und - unter Berücksichtigung der zwischenzeitlichen Ergebnisse - hinsichtlich bestimmter Parameter wie Inkubationszeit, Plattengröße, Behandlung mit Lipopolysacchariden (LPS) und Zeitpunkt der Messung des TEER-Werts immer wieder neu evaluiert. Letztendlich hat sich ein Aufbau durchgesetzt, der eine separate Behandlung zweier 12-Well-Platten vorsieht. Im Folgenden werden diese zwei separaten Platten als ‚Zellkulturversuch 1‘ und ‚Zellkulturversuch 2‘ bezeichnet. In beiden Zellkulturversuchen wurden die Zellen in je zwei Wells mit derselben Behandlungsgruppe behandelt. Die verschiedenen Behandlungsgruppen waren die Kontrolle (K), das Vehikel (Veh.), Fruktose (F), die omnivore Diät (O), die vegane Diät (Vg) und die Standarddiät (S). Fruktose diente im Versuch als Positivkontrolle, zeigte jedoch stark streuende Ergebnisse und wurde deshalb letztlich in den Abbildungen nicht berücksichtigt.

Im Zellkulturversuch 1 wurden die Proben wie folgt auf der Platte arrangiert:

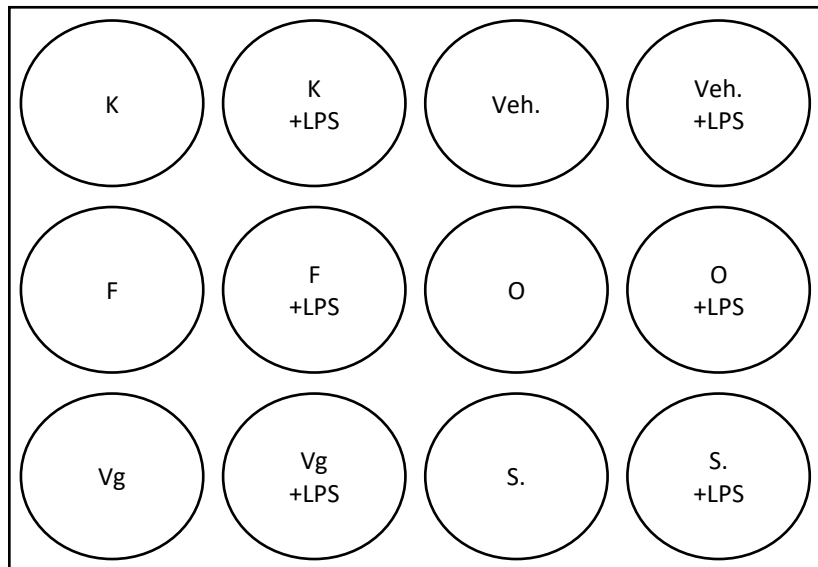


Abbildung 14 Aufteilung der verschiedenen Behandlungsgruppen auf einer 12-Well-Platte für Zellkulturversuch 1. K = Kontrolle, Veh. = Vehikel, F = Fruktose, O = Omnivore Diät, Vg = Vegane Diät, S = Standarddiät, LPS = Lipopolysaccharide.

Es erfolgte für jede Behandlungsgruppe eine Behandlung ohne und eine mit LPS. Die Volumina der zugegebenen Media und Proben sind in den folgenden Tabellen 4 und 5 dargestellt:

Tabelle 4 Volumina der zugegebenen Media und Behandlungsgruppen in Wells ohne LPS-Behandlung in Zellkulturversuch 1 (in μL)

Ohne LPS		
Bedingung	Volumen Nährmedium [μL]	Volumen Behandlungsgruppe [μL]
Kontrolle	540	/
Vehikel	490	50
Fruktose	515	25 (aus 0,5 M)
Omnivore Diät	490	50
Vegane Diät	490	50
Standarddiät	490	50

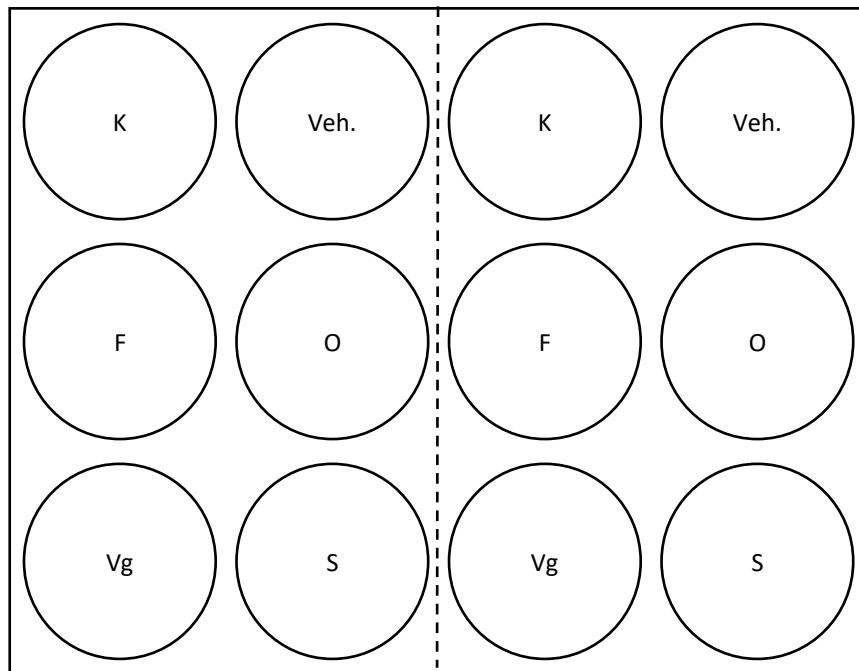
Tabelle 5 Volumina der zugegebenen Media und Behandlungsgruppen in Wells mit LPS-Behandlung in Zellkulturversuch 1 (in μL)

Mit LPS			
Bedingung	Volumen Nährmedium [μL]	Volumen Behandlungsgruppe [μL]	Volumen LPS [μL] (aus 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ausgangskonzentration)
Kontrolle	524,7	/	15,3
Vehikel	474,7	50	15,3
Fruktose	499,7	25	15,3
Omnivore Diät	474,7	50	15,3
Vegane Diät	474,7	50	15,3
Standarddiät	474,7	50	15,3

Für Zellkulturversuch 1 wurden zu verschiedenen Zeitpunkten für jede Intervention je 40 μL Proben aus dem Über- und Unterstand entnommen. Zur Quantifizierung der TLR4-abhängigen Ligandenkonzentration in den Über- und Unterständen wurde ein zellbasiertes Testsystem mit HEK293-Reporterzellen eingesetzt. Dies erfolgte vor der Behandlung mit der Behandlungsgruppe, direkt nach Zugabe der Probe, direkt nach der Zugabe von LPS, nach zweistündiger Inkubation, nach sechsstündiger Inkubation und nach 24-stündiger Inkubation. Parallel dazu wurden in den Transwell-inserts ohne LPS zu jedem der oben genannten Zeitpunkte (mit Ausnahme des Zeitpunkts zu dem LPS zugegeben wurde) die TEER-Werte mit einer Messelektrode gemessen und notiert.

Für Zellkulturversuch 2 wurden die Proben wie folgt auf der Platte aufgeteilt:

Abbildung 15 Aufteilung der verschiedenen Behandlungsgruppen auf einer 12-Well-Platte für Zellkulturversuch 2. K = Kontrolle, Veh. = Vehikel, F = Fruktose, O = Omnivore Diät, Vg = Vegane Diät, S = Standarddiät.



Für diesen Zellkulturversuch wurde die verwendete 12-Well-Platte wie oben abgebildet in der Mitte zwischen den Wells A2 und A3, B2 und B3 und C2 und C3 in zwei gleichmäßige Hälften geteilt. Die beiden Seiten wurden unabhängig voneinander behandelt.

Auf einer der beiden Seiten wurde wie in Zellkulturversuch 1 zu bestimmten Zeitpunkten je 40 μL des Über- und Unterstandes des Transwell-inserts für eine anschließende Bestimmung der TLR4-Ligandenkonzentration mittels HEK293-Reporterzellen abgenommen. Die Volumina der zugegebenen Flüssigkeiten finden sich in der folgenden Tabelle 6:

Tabelle 6 Volumina der zugegebenen Media und Behandlungsgruppen in Wells mit anschließender LPS-Behandlung in Zellkulturversuch 2 (in μL)

Einzel-Inkubation mit Behandlungsgruppen und anschließend LPS		
Bedingung	Volumen Nährmedium [μL]	Volumen Behandlungsgruppe [μL]
Kontrolle	540	/
Vehikel	490	50
Fruktose	515	25 (aus 0,5 M)

Omnivore Diät	490	50
Vegane Diät	490	50
Standarddiät	490	50

Die Abfolge der Behandlung von Zellkulturversuch 2 unterscheidet sich von der des Zellkulturversuchs 1. Nach der Inkubation der Zellen mit den Behandlungsgruppen für zwei Stunden wurde auf einer der beiden Plattenhälften der komplette Über- und Unterstand der Inserts entnommen und die Zellen anschließend zuerst mit 523 μL Zellkulturmedium und anschließend 16,7 μL LPS versetzt und für weitere zwei Stunden inkubiert. Die Probennahme für die Messung der TLR4-Ligandenkonzentration erfolgte vor der Behandlung mit der Behandlungsgruppe, direkt nach Zugabe der jeweiligen Behandlungsgruppe und nach 2 h Inkubation. Nach der erneuten Zugabe von Zellmedium, direkt nach der Zugabe von LPS, nach einer Stunde, sowie nach 2 Stunden Inkubation mit LPS sind die weiteren Entnahmezeitpunkte. Die TEER-Wert Messung erfolgte vor der Behandlung, direkt nach Probenzugabe und nach zweistündiger Inkubation.

Auf der anderen Plattenhälfte wurde das Gesamtvolumen auf 500 μL aufgefüllt (450 μL Nährmedium + 50 μL Behandlungsgruppe, K=500 μL Nährmedium, F=475 μL Nährmedium + 25 μL Fruktoselösung), für zwei Stunden inkubiert und nach 2 h in Trizol abgenommen. Eine TEER-Wert-Messung erfolgte vor Zugabe der Intervention und nach 2 h Inkubation.

3.4.3 Messung von “Toll like receptor 4” (TLR4)-Liganden

Die Messung der TLR4-Ligandenkonzentration in den Über- und Unterständen der 12-Well-Platten erfolgte mittels HEK-Blue™ Detection. Dies ist ein Zellkulturmedium zur schnellen und unkomplizierten Detektion der SEAP (Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase)-Expression. SEAP ist ein weit verbreitet verwendetes Reporterenzym und stellt eine trunkierte Form der plazentaren alkalischen Phosphatase dar, einem GPI-verankerten Protein. Die von den Zellen in das Medium sezernierte SEAP führt bei Aktivität zu einer violett/blauen Verfärbung des Mediums. Die Messung erfolgte nicht-invasiv, ohne Zellaufschluss (61).

Zur Vorbereitung der HEK-Blue™ Detection wurde der Inhalt eines Beutels in 50 ml für Zellkultur geeignetem Reinstwasser gelöst, intensiv vortexiert, drei Stunden bei 37 °C temperiert und anschließend durch einen 0,2 μm Vakuumfilter steril filtriert. Das rekonstituierte Medium wurde entweder bei 37 °C aufbewahrt oder bei 2–8 °C für bis zu zwei Wochen gelagert (61).

Für die SEAP-Detektion wurden HEK-Zellen mittels PBS abgelöst, gezählt und in HEK-Blue™ Detection auf die gewünschte Konzentration eingestellt. In 96-Well-Platten wurden jeweils 20 µl der jeweiligen Behandlungsgruppe sowie 180 µl der Zell-Suspension gegeben und mithilfe der Pipette homogenisiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂. Die SEAP-Aktivität wurde durch Messung der optischen Dichte bei 655 nm mittels Spektrophotometer bestimmt (61).

3.5 Statistische Auswertung

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten sind als Mittelwerte (MW) ± Standardfehler der Mittelwerte (SEMs) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Programms „GraphPad Prism 7“ (GraphPad Prism Software, USA). Hierfür wurden zunächst die Ausreißer mithilfe des Grubb's Test aussortiert. Der D'Agostino & Pearson Test, der Shapiro-Wilk Test, sowie der Kolmogorov–Smirnov Test wurden verwendet, um zu testen, ob die Daten eine Normalverteilung zeigten und anschließend mithilfe der one-way ANOVA oder dem Kruskal-Walis Test gepaart mit einem Dunn's Test für Mehrfachvergleiche auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen untersucht. Bezüglich des Signifikanzniveaus wurde $p \leq 0,05$ festgelegt. Die Abbildungen zur Präsentation der Ergebnisse wurden ebenso in „GraphPad Prism 7“ erstellt.

4. Ergebnisse

Um festzustellen, ob die verschiedenen Diäten einen Einfluss auf die Permeabilität des Caco-2 Zellrasen haben, wurde zunächst der TEER-Wert erfasst. Außerdem wurde in den Über- und Unterständen der Transwell-inserts die LPS-Ligandenkonzentration zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen und damit die Permeabilität der ausdifferenzierten Caco-2 Zellen unter den fünf verschiedenen Bedingungen Kontrolle (K), Vehikel (Veh.), Standarddiät (S), vegane Diät (Vg) und omnivore Diät (O) bestimmt. Die Messungen wurden im zeitlichen Verlauf durchgeführt. Hierbei wurden die Liganden zu unterschiedlichen Zeitpunkten zugesetzt und die Zellen unterschiedlich lange exponiert.

4.1 Einfluss unterschiedlicher Ernährungsmuster auf die Permeation in Caco-2 Zellen

Für die folgenden Ergebnisse wurde der Versuchsaufbau von Zellkulturversuch 1 umgesetzt. Eine 12-Well-Platte wurde vorbereitet, mit den Behandlungsbedingungen und einer 1,5 µg/mL LPS-Lösung für 24 Stunden inkubiert.

4.1.1 Einfluss der verschiedenen Diäten auf die Permeabilität ausdifferenzierter Caco-2 Zellen nach zweistündiger Inkubation, gemessen anhand des TEER-Werts und der LPS-Permeation

Um zu untersuchen, ob die verschiedenen Diäten einen Einfluss auf die Dichtigkeit des Zellrasens hatten, wurde zunächst der TEER-Wert im zeitlichen Verlauf der Exposition gemessen.

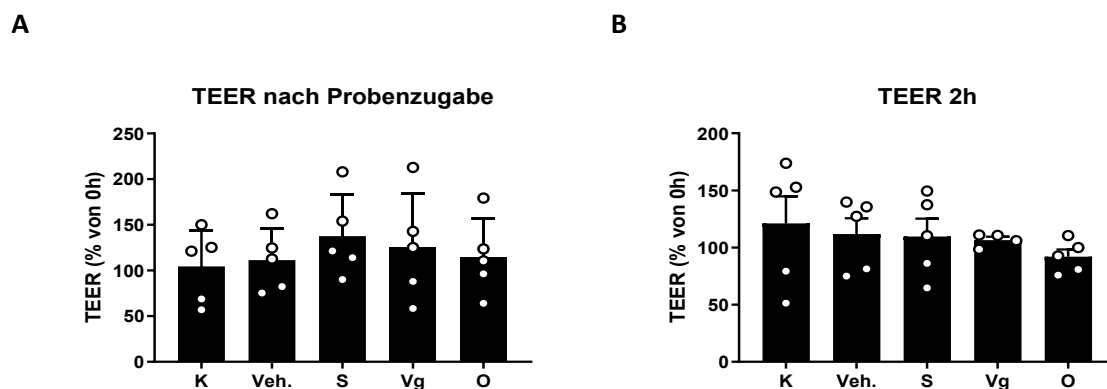


Abbildung 16 Einfluss der unterschiedlichen Ernährungsmuster auf die Integrität der Zellbarriere in Caco-2 Zellen: Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) in einem Transwellsystem, in dem sich apikal ausdifferenzierte Caco-2-Zellen befanden, die kurz zuvor (A) und für zwei Stunden (B) mit einer verdauten und fermentierten Standard-, omnivoren – bzw. veganen Diät inkubiert wurden. Werte sind dargestellt in MW $\pm$ SEM. n = 4-5. Abkürzungen: MW – Mittelwert; SEM – Standardfehler; K – Kontrolle; Veh. – Vehikel; S – Standarddiät; Vg – Vegane Diät; O – Omnivore Diät

Für die TEER-Werte (Abbildung 16) waren sowohl direkt nach der Zugabe der Behandlungsbedingungen als auch nach zweistündiger Inkubation keine Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen messbar. Jedoch streuten die Werte in einzelnen Versuchsbedingungen sehr.

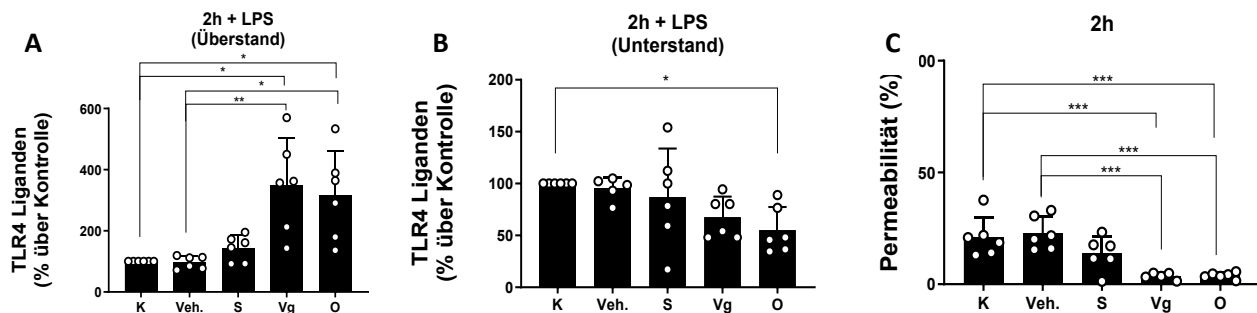


Abbildung 17 Einfluss der unterschiedlichen Ernährungsmuster auf die Permeation von TLR4-Liganden in Caco-2 Zellen: (A) Konzentration von TLR4-Liganden im apikalen Kompartiment des Transwellsystems, (B) Konzentration von TLR4-Liganden im basolateralen Kompartiment des Transwellsystems, (C) Relative Permeation in % von TLR4-Liganden durch eine Zellschicht innerhalb eines Transwellsystems, in dem sich apikal ausdifferenzierte Caco-2-Zellen befanden, die für 2 Stunden mit einer verdauten und fermentierten Standard-, omnivoren – bzw. veganen Diät und einer 1,5 µg/mL LPS-Lösung inkubiert wurden. Werte sind dargestellt in MW ± SEM. n = 5-7. * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$. Abkürzungen: MW – Mittelwert; SEM – Standardfehler; K – Kontrolle; Veh. – Vehikel; S – Standarddiät; Vg – Vegane Diät; O – Omnivore Diät; TLR4 – Toll-like-Rezeptor 4; LPS – Lipopolysaccharide.

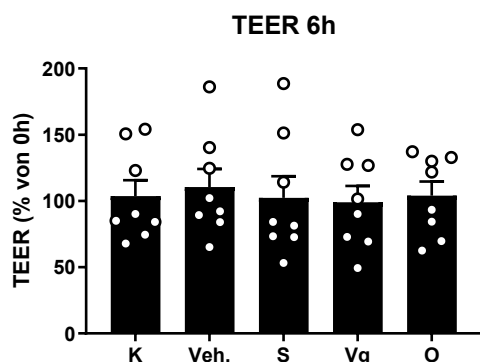
Um zu untersuchen, ob die Konzentration an bakteriellem Endotoxin (in Form von TLR4-Liganden) in den verschiedenen Diäten gleich hoch war und wie sich diese nach Zugabe von LPS (1,5 µg/ml) insgesamt entwickelt, wurde die LPS-Konzentration mittels des HEK-TLR4-Zell-Assays gemessen.

Im Überstand waren signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) sowohl zwischen der Kontrolle und der veganen –, als auch der Kontrolle und der omnivoren Diät messbar. Die TLR4 Ligandenkonzentration war hierbei bei der veganen Diät um ca. 250 % und bei der omnivoren Diät ca. 215 % höher als in der Kontrolle, die lediglich aus Nährmedium und LPS bestand. Auch im Vergleich zwischen Vehikel und der veganen ($p \leq 0,01$) – sowie der omnivoren Diät ($p \leq 0,05$) war die TLR4-Ligandenkonzentration in den Diätgruppen um ca. 255 % und 220 % deutlich erhöht.

Im Unterstand zeigte sich nach zweistündiger Inkubation mit den jeweiligen Diäten ein signifikanter Unterschied in der LPS-Konzentration zwischen der Kontrolle und der omnivoren Diät ($p \leq 0,05$). Die Konzentration lag dabei ca. 45 % niedriger, verglichen mit der Kontrolle.

Die relative Permeabilität der Caco-2-Zellen, die mit der Kontrolle bzw. dem Vehikel inkubiert wurden, lagen jeweils bei ca. 20 % ($p \leq 0,001$). Im Gegensatz dazu lag die relative Permeabilität der TLR4 Liganden für die vegane und omnivore Diät bei ca. vier Prozent ($p \leq 0,001$).

4.1.2 Einfluss der verschiedenen Diäten auf die Permeabilität ausdifferenzierter *Caco-2* Zellen nach sechs- und 24-stündiger Inkubation, gemessen anhand des TEER-Werts und der LPS-Permeation



Für die TEER-Werte waren auch nach sechsständiger Inkubation keine Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen messbar. Wie zuvor direkt nach Inkubationsbeginn, sowie nach zwei Stunden Inkubation streuten die Werte in einigen Versuchsbedingungen sehr.

Abbildung 18 Einfluss der unterschiedlichen Ernährungsmuster auf die Integrität der Zellbarriere in *Caco-2* Zellen: Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) in einem Transwellssystem, in dem sich apikal ausdifferenzierte *Caco-2*-Zellen befanden, die für sechs Stunden mit einer verdauten und fermentierten Standard-, omnivoren – bzw. veganen Diät inkubiert wurden. Werte sind dargestellt in MW $\pm$ SEM. $n = 8$. **Abkürzungen:** MW – Mittelwert; SEM – Standardfehler; K – Kontrolle; Veh. – Vehikel; S – Standarddiät; Vg – Vegane Diät; O – Omnivore Diät.

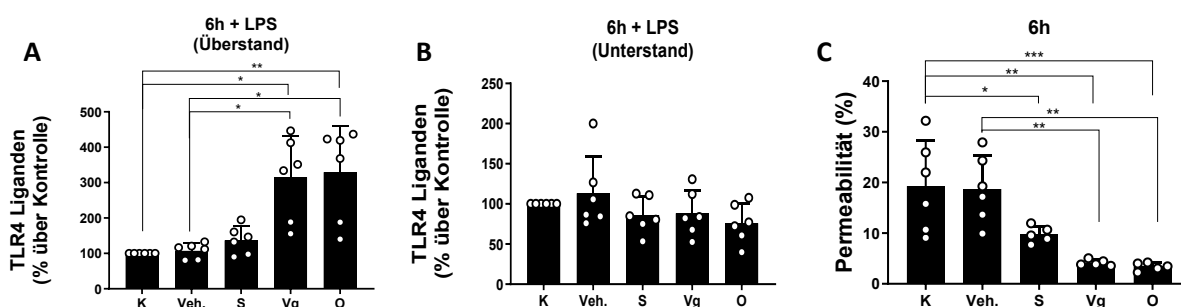


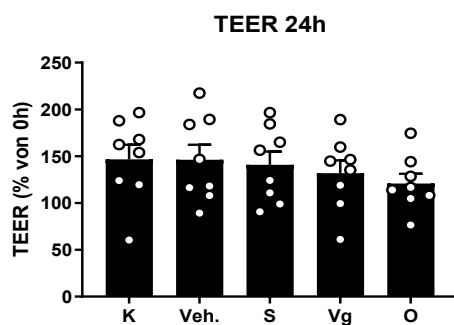
Abbildung 19 Einfluss der unterschiedlichen Ernährungsmuster auf die Permeation von TLR4-Liganden in *Caco-2* Zellen: (A) Konzentration von TLR4-Liganden im apikalen Kompartiment des Transwellsystems, (B) Konzentration von TLR4-Liganden im basolateralen Kompartiment des Transwellsystems, (C) Relative Permeation in % von TLR4-Liganden durch eine Zellschicht innerhalb eines Transwellsystems, in dem sich apikal ausdifferenzierte *Caco-2*-Zellen befanden, die für 6 Stunden mit einer verdauten und fermentierten Standard-, omnivoren – bzw. veganen Diät und einer 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS-Lösung inkubiert wurden. Werte sind dargestellt in MW $\pm$ SEM. $n = 5-6$. * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$. **Abkürzungen:** MW – Mittelwert; SEM – Standardfehler; K – Kontrolle; Veh. – Vehikel; S – Standarddiät; Vg – Vegane Diät; O – Omnivore Diät; TLR4 – Toll-like-Rezeptor 4; LPS – Lipopolysaccharide.

Nach sechsständiger Inkubation war die LPS-Konzentration in der veganen und omnivoren Diät weiterhin signifikant um etwa 200 % höher als in der Kontrolle und der Vehikel Gruppe. Auch der

Unterschied in der TLR4 Ligandenkonzentration zwischen ($p \leq 0,05$ bzw. $p \leq 0,01$ für den Unterschied zwischen Kontrolle und omnivorer Diät).

Im Gegensatz dazu fanden sich im Unterstand der Transwell-Inserts nach sechs Stunden keine Unterschiede in der TLR4 Ligandenkonzentration.

Die relative Permeabilität berechnet aus der LPS-Konzentration im Über- und Unterstand der Transwell-Inserts war in der Kontrollgruppe und der Vehikelgruppe signifikant höher als in der mit der veganen - und omnivoren Diät inkubierten Zellen. Auch zwischen der Kontrollgruppe und den mit der Standarddiät inkubierten Zellen konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.



Für die TEER-Werte waren auch nach 24-stündiger Inkubation keine Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen messbar. Wie für die vorherigen TEER-Messungen streuten auch hier die Werte in einigen Versuchsbedingungen sehr.

Abbildung 20 Einfluss der unterschiedlichen Ernährungsmuster auf die Integrität der Zellbarriere in *Caco-2* Zellen: Messung des transepithelischen elektrischen Widerstandes (TEER) in einem Transwell-System, in dem sich apikal ausdifferenzierte *Caco-2*-Zellen befanden, die für 24 Stunden mit einer verdauten und fermentierten Standard-, omnivoren – bzw. veganen Diät inkubiert wurden. Werte sind dargestellt in MW $\pm$ SEM. $n = 8$. Abkürzungen: MW – Mittelwert; SEM – Standardfehler; K – Kontrolle; Veh. – Vehikel; S – Standarddiät; Vg – Vegane Diät; O – Omnivore Diät

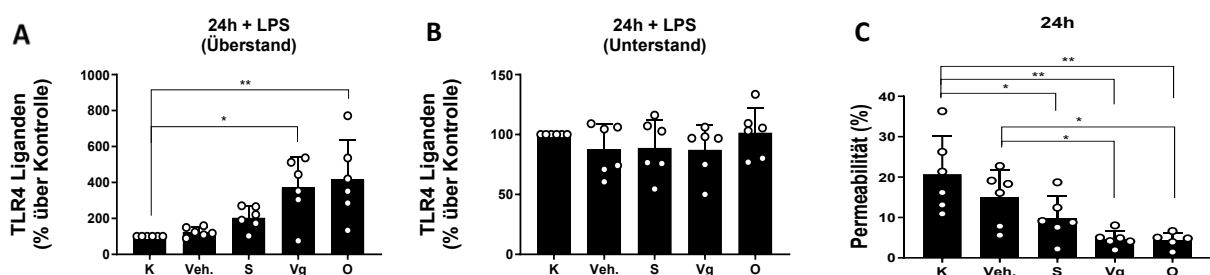


Abbildung 21 Einfluss der unterschiedlichen Ernährungsmuster auf die Permeation von TLR4-Liganden in *Caco-2* Zellen: (A) Konzentration von TLR4-Liganden im apikalen Kompartiment des Transwell-Systems, (B) Konzentration von TLR4-Liganden im basolateralen Kompartiment des Transwell-Systems, (C) Relative Permeation in % von TLR4-Liganden durch eine Zellschicht innerhalb eines Transwell-Systems, in dem sich apikal ausdifferenzierte *Caco-2*-Zellen befanden, die für 24 Stunden mit einer verdauten und fermentierten Standard-, omnivoren – bzw. veganen Diät und einer 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS-Lösung inkubiert wurden. Werte sind dargestellt in MW $\pm$ SEM. $n = 5-6$. * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$. Abkürzungen: MW – Mittelwert; SEM – Standardfehler; K – Kontrolle; Veh. – Vehikel; S – Standarddiät; Vg – Vegane Diät; O – Omnivore Diät; TLR4 – Toll-like-Rezeptor 4; LPS – Lipopolysaccharide.

Wie in Abbildung 21 zu sehen, war auch nach 24-stündiger Inkubation in den Überständen der beiden Diätgruppen "vegane"- und omnivore Diät eine deutlich höhere TLR4 Ligandenkonzentration messbar im Vergleich zur Kontrolle.

In den Unterständen der verschiedenen Behandlungen waren keine Unterschiede quantifizierbar.

Die relative Permeabilität war in allen drei Diätgruppen (S, Vg, O) eindeutig geringer als in der Kontrollgruppe. Im Vergleich zur Vehikelgruppe zeigten jedoch nur die vegane - und die omnivore Diät einen eindeutig niedrigeren Wert.

4.1.3 Relative Differenz der TLR4-Ligandenkonzentration nach zwei Stunden mit und ohne Zugabe von LPS

In Abbildung 22 ist dargestellt wie jeweils die LPS-Konzentration in den Über- und Unterständen der Transwell-inserts nach zweistündiger Inkubation der CaCo2-Zellen mit den jeweiligen Behandlungsgruppen verglichen wurde. Hierbei wurde die Konzentration, die in dem Versuch, in dem LPS zugesetzt wurde mit dem ohne LPS-Zugabe verrechnet. Hierdurch sollte festgestellt werden wie viel TLR4 Ligandenkonzentration in den jeweiligen Diäten auch ohne Zugabe von LPS vorhanden ist. Wenn negative Werte abgebildet sind, bedeutet dies, dass in den Diäten ohne Zugabe von LPS eine höhere TLR4 Ligandenkonzentration gemessen wurde.

In den Überständen der omnivoren Diät war– im Gegensatz zur Kontrolle - auch ohne Zugabe von LPS eine besonders hohe TLR4 Ligandenkonzentration messbar ($p \leq 0,05$).

Für die Unterstände lässt sich kein Unterschied feststellen.

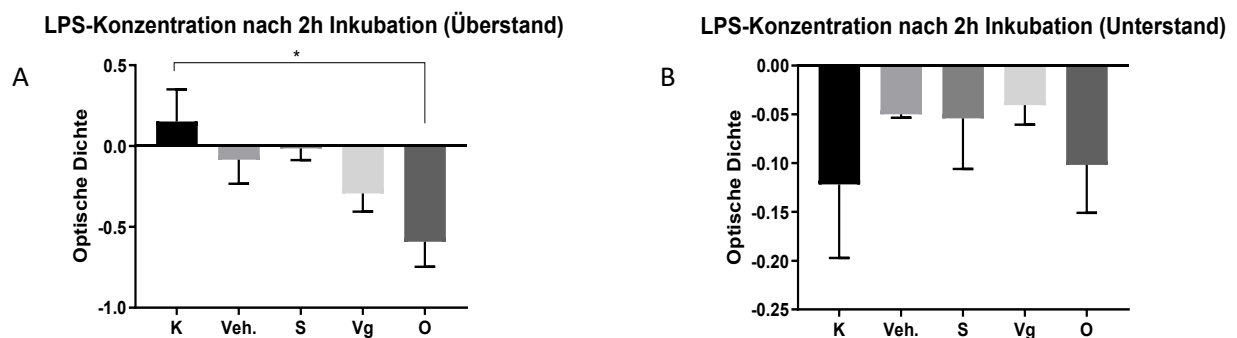


Abbildung 22 Relativer Unterschied der TLR4-Ligandenkonzentration zwischen Behandlungsproben mit und ohne Zugabe von LPS in unterschiedlichen Ernährungsmustern im apikalen (A) und im basolateralen (B) Kompartiment des Transwell-systems. Werte sind dargestellt in MW ± SEM aus 3-5 Versuchen. * = $p \leq 0,05$. Abkürzungen: MW – Mittelwert; SEM – Standardfehler; K – Kontrolle; Veh. – Vehikel; S – Standarddiät; Vg – Vegane Diät; O – Omnivore Diät; TLR4 – Toll-like-Rezeptor 4; LPS – Lipopolysaccharide.

4.2 Einfluss unterschiedlicher Ernährungsmuster auf die Permeation in Caco-2 Zellen nach zweistündiger Inkubation mit den verschiedenen Diäten und anschließender Challenge mit LPS

Für die folgenden Ergebnisse wurde der Versuchsaufbau von Zellkulturversuch 2 umgesetzt. Eine 12-Well-Platte wurde vorbereitet und zunächst für zwei Stunden mit den verschiedenen Behandlungsbedingungen inkubiert. Diese wurden anschließend vollständig abgenommen. Die Zellen wurden danach für zwei Stunden mit einer 1,5 µg/mL LPS-Lösung kultiviert.

4.2.1 Einfluss der verschiedenen Diäten auf die Permeabilität ausdifferenzierter Caco-2 Zellen nach zweistündiger Inkubation, gemessen anhand der LPS-Permeation

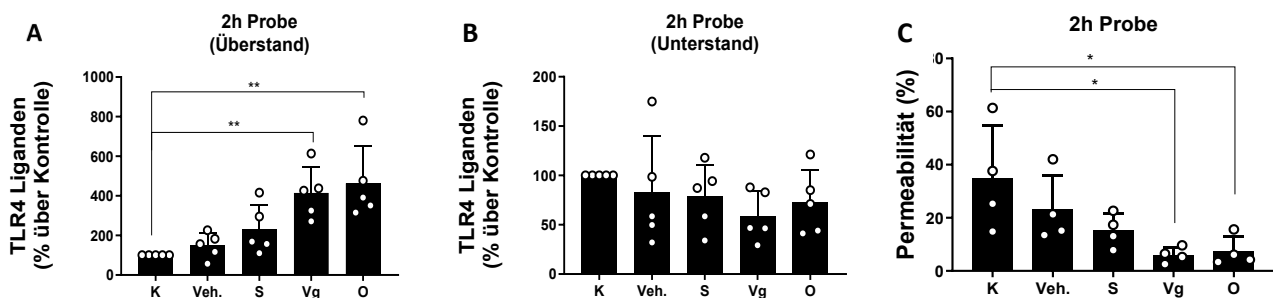


Abbildung 23 Einfluss der unterschiedlichen Ernährungsmuster auf die Permeation von TLR4-Liganden in Caco-2 Zellen: (A) Konzentration von TLR4-Liganden im apikalen Kompartiment des Transwellsystems, (B) Konzentration von TLR4-Liganden im basolateralen Kompartiment des Transwellsystems, (C) Relative Permeation in % von TLR4-Liganden durch eine Zellschicht innerhalb eines Transwellsystems, in dem sich apikal ausdifferenzierte Caco-2-Zellen befanden, die für 2 Stunden mit einer verdauten und fermentierten Standard-, omnivoren – bzw. veganen Diät inkubiert wurden. Werte sind dargestellt in MW ± SEM. n = 5-7. * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$. **Abkürzungen:** MW – Mittelwert; SEM – Standardfehler; K – Kontrolle; Veh. – Vehikel; S – Standarddiät; Vg – Vegane Diät; O – Omnivore Diät; TLR4 – Toll-like-Rezeptor 4; LPS – Lipopolysaccharide.

Im Überstand waren sowohl die Messwerte der veganen Diät als auch die der omnivoren Diät bezüglich der LPS-Konzentration signifikant verschieden zur Kontrolle (jeweils $p \leq 0,01$). Im Überstand der Transwell-inserts, die mit der veganen Diät inkubiert wurden war die LPS-Konzentration um etwa 315 % höher als in der Kontrolle. Die Erhöhung der LPS-Konzentration in den Überständen der omnivoren Diät lag bei ca 360 % im Vergleich zur Kontrolle.

Nach zweistündiger Inkubation mit den verschiedenen Diäten ohne LPS waren im Unterstand keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der TLR4 Ligandenkonzentration zu erkennen.

Hinsichtlich der relativen Permeabilität zeigten sich Unterschiede zwischen den Diätgruppen vegane und omnivore Diät im Vergleich zur Kontrolle ($p \leq 0,05$). Der Durchlässigkeitswert der Caco-2-Zellschicht der Kontrolle lag bei etwa 35 % (vegane Diät ca. 6 %, omnivore Diät etwa 7 %).

4.2.2 Einfluss der verschiedenen Diäten auf die Permeabilität ausdifferenzierter Caco-2 Zellen nach ein- und zweistündiger Inkubation mit LPS nach Abnahme der Diäten, gemessen anhand der LPS-Permeation

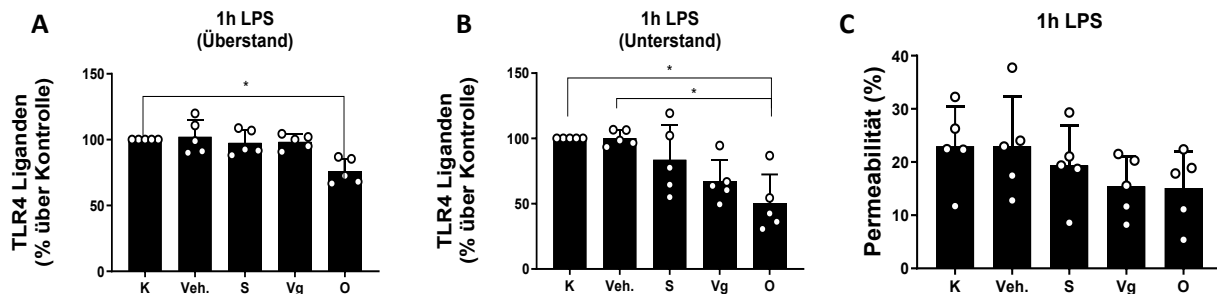


Abbildung 24 Einfluss der unterschiedlichen Ernährungsmuster auf die Permeation von TLR4-Liganden in Caco-2 Zellen: (A) Konzentration von TLR4-Liganden im apikalen Kompartiment des Transwellsystems, (B) Konzentration von TLR4-Liganden im basolateralen Kompartiment des Transwellsystems, (C) Relative Permeation in % von TLR4-Liganden durch eine Zellschicht innerhalb eines Transwellsystems, in dem sich apikal ausdifferenzierte Caco-2-Zellen befanden, die für 2 Stunden mit einer verdauten und fermentierten Standard-, omnivoren – bzw. veganen Diät und anschließend für eine Stunde mit einer 1,5 µg/mL LPS-Lösung inkubiert wurden. Werte sind dargestellt in MW ± SEM. n = 5. * = $p \leq 0,05$. **Abkürzungen:** MW – Mittelwert; SEM – Standardfehler; K – Kontrolle; Veh. – Vehikel; S – Standarddiät; Vg – Vegane Diät; O – Omnivore Diät; TLR4 – Toll-like-Rezeptor 4; LPS – Lipopolysaccharide.

Nach Abnahme der Überstände mit den jeweiligen Behandlungsbedingungen und einstündiger LPS-Inkubation zeigten sich folgende Ergebnisse.

Die LPS-Konzentration im Überstand des Transwell-inserts der omnivoren Diät war im Vergleich zur Kontrolle um ca. 25 % reduziert ($p \leq 0,05$).

Im Unterstand der Transwell-inserts der Diätgruppen ‚vegane‘ und ‚omnivore‘ war die LPS-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle und dem Vehikel bis zu 50 % niedriger (jeweils $p \leq 0,05$).

Bei der relativen Permeabilität der Zellschicht nach einstündiger LPS-Inkubation zeigten sich keine Unterschiede.

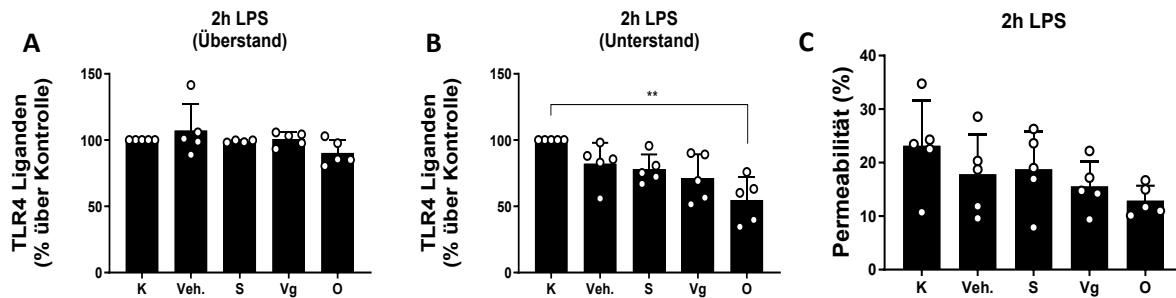


Abbildung 25 Einfluss der unterschiedlichen Ernährungsmuster auf die Permeation von TLR4-Liganden in Caco-2 Zellen: (A) Konzentration von TLR4-Liganden im apikalen Kompartiment des Transwellsystems, (B) Konzentration von TLR4-Liganden im basolateralen Kompartiment des Transwellsystems, (C) Relative Permeation in % von TLR4-Liganden durch eine Zellschicht innerhalb eines Transwellsystems, in dem sich apikal ausdifferenzierte Caco-2-Zellen befanden, die für 2 Stunden mit einer verdauten und fermentierten Standard-, omnivoren – bzw. veganen Diät und anschließend für zwei Stunden mit einer 1,5 µg/mL LPS-Lösung inkubiert wurden. Werte sind dargestellt in MW ± SEM. n = 4-5. ** = $p \leq 0,01$. Abkürzungen: MW – Mittelwert; SEM – Standardfehler; K – Kontrolle; Veh. – Vehikel; S – Standarddiät; Vg – Vegane Diät; O – Omnivore Diät; TLR4 – Toll-like-Rezeptor 4; LPS – Lipopolysaccharide.

Nach zweistündiger Inkubation mit 1,5 µg/mL LPS-Lösung zeigten sich in den Messwerten für die LPS-Konzentration im Überstand keine Unterschiede.

Die LPS-Konzentration in den Unterständen der omnivoren Diät war im Vergleich zur Kontrolle um etwa 45 % reduziert ($p \leq 0,01$).

In der relativen Permeabilität fanden sich keine statistisch auffälligen Unterschiede.

Für alle Messungen der TLR4-Ligandenkonzentration war die Wiederfindung von LPS in den Proben innerhalb der einzelnen Versuche konstant.

5. Diskussion

Neben makro- und mikronährstoffspezifischen Aspekten rückt insbesondere die Wirkung unterschiedlicher Ernährungsmuster auf die Funktion des Darms stärker in den Fokus der Forschung. Im Zentrum dieser Entwicklung steht die Integrität der intestinalen Barriere (62), diese stellt eine zentrale Schnittstelle zur Umwelt dar und übernimmt eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase. Eine funktionierende intestinale Barriere kontrolliert die Aufnahme von Nährstoffen und schützt gleichzeitig vor dem Eindringen von Pathogenen oder Toxinen. Veränderungen in dieser Schutzfunktion, sei es durch Ernährung, Lebensstil oder Erkrankungen, können weitreichende Auswirkungen auf die Gesundheit haben (25,32).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Effekte bestimmter Diätformen auf die Permeabilität der Darmbarriere und somit indirekt auf den gesundheitlichen Wert dieser Diäten gemessen. Dafür wurden verschiedene Methoden etabliert, miteinander kombiniert und daraufhin mit unterschiedlichen Diäten getestet. Als methodische Grundlage dienten das INFOGEST-Protokoll zur in vitro Verdauung (56) sowie Arbeiten zur in vitro Fermentation von Pérez-Burillo et al. (57), ergänzt durch die Inkubation der verdauten Proben in einer Caco-2-Zellkultur, wobei die TLR4-Ligandenkonzentration unter Zugabe von LPS sowie die Zellbarrierefunktion über TEER-Messungen erfasst wurden.

5.1 Erhöhte TLR4-Ligandenkonzentration bei gleichzeitiger Stabilisierung der Barrierefunktion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die TLR4-Ligandenkonzentration im Überstand nach Inkubation mit verdauten und fermentierten veganen sowie omnivoren Diäten signifikant höher war als in den Kontrollen. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die Diätproben selbst relevante Mengen an TLR4-aktivierenden Molekülen enthalten. Bereits die Messungen der relativen Differenz der TLR4-Ligandenkonzentration nach zwei Stunden Inkubation mit und ohne Zugabe von LPS verdeutlichten, dass in den Diätgruppen ohne zusätzliche LPS-Gabe eine Grundlast an Liganden vorhanden war, während in den Kontroll- und Vehikelgruppen deutlich niedrigere Werte gemessen wurden. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt bei der veganen und omnivoren Diät.

Die erhöhte TLR4-Ligandenkonzentration lässt sich auf verschiedene Ursachen zurückführen. Einerseits sind pflanzliche Nahrungsbestandteile wie Ballaststoffe, insbesondere unlösliche Fraktionen, in der Lage, bakterielles Wachstum während der Fermentation zu fördern und damit die Bildung von LPS und anderen TLR4-Liganden durch das Absterben der Bakterien zu begünstigen (63).

Auch Bestandteile pflanzlicher Zellwände, wie Arabinoxylane oder β -Glucane, können durch mikrobielle Fermentation indirekt die Menge an immunaktiven Molekülen erhöhen (64).

Ein weiterer methodischer Faktor, der zur Erklärung der Ergebnisse beitragen könnte, ist die Nutzung von Verdauungsenzymen. Pankreatin ist häufig mit geringen Mengen an bakteriellen Lipopolysacchariden kontaminiert, die die Messungen beeinflussen können (65).

Besonders auffällig war die Diskrepanz zwischen erhöhter TLR4-Ligandenkonzentrationen im Überstand und einer gleichzeitig verringerten Permeabilität der Zellmonolayer. Dies deutet darauf hin, dass bestimmte Nahrungsbestandteile protektiv auf die Barriere wirken können, selbst wenn die Zellen einer höheren Ligandenlast ausgesetzt sind. Kurzkettige Fettsäuren, insbesondere Butyrat, spielen eine zentrale Rolle bei der Stabilisierung der Darmbarriere. Butyrat erhöht über die Aktivierung von AMPK die TEER-Werte und reduziert die parazelluläre Permeabilität (66). Darüber hinaus weisen Studien darauf hin, dass Polyphenole protektiv auf den Abbau von Tight-Junction-Proteinen wirken (67).

Diese Befunde stimmen mit weiteren Studien überein, die positive Effekte pflanzlicher bioaktiver Substanzen auf die Darmbarriere beschreiben. Marino et al. (68) konnten nachweisen, dass Blaubeerpulver nicht nur die TEER-Werte in Caco-2-Modellen erhöhte, sondern auch die Expression von Tight-Junction-Proteinen verstärkte und entzündliche Marker reduzierte. Ähnliche Ergebnisse liegen für andere Polyphenolquellen wie Traubenkernextrakte oder Grüntee-Polyphenole vor, die sowohl antioxidative Effekte entfalten als auch die Barrierefunktion schützen (69). Diese Mechanismen könnten eine Erklärung dafür sein, dass die omnivoren und veganen Diäten trotz erhöhter Ligandenlast im Überstand teilweise eine geringere Permeabilität aufwiesen.

Ein weiterer relevanter Aspekt ist die Art der Fermentation. Die Aktivität der Mikrobiota bestimmt maßgeblich, welche Metabolite im Verdauungsprozess entstehen und wie diese auf die Barriere wirken. Unterschiedliche Ernährungsmuster erzeugen charakteristische mikrobielle Metabolitenprofile, die entweder protektiv oder schädigend wirken können (70). Während kurzkettige Fettsäuren wie Butyrat die Barriere stabilisieren, können andere bakterielle Produkte, darunter sekundäre Gallensäuren, die Integrität schwächen (71).

Die TEER-Messungen selbst lieferten in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, waren jedoch von hoher Variabilität geprägt. Dieses Phänomen ist in der Literatur häufig beschrieben. Schon geringe Abweichungen in Zellpassagezahl, Mediumzusammensetzung oder Handhabung können TEER-Werte stark beeinflussen (72). Eine Interpretation der TEER-Daten ist aufgrund der Streuung der Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit faktisch nicht möglich.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Modell zur Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Diäten auf die Darmbarriere geeignet sein könnte. Jedoch sind hier weitere Untersuchungen nötig. Zudem konnte gezeigt werden, dass die omnivore und vegane Diät sich in Ihrer Grundlast an TLR4-Liganden von der Kontroll- und der Vehikelgruppe unterscheiden. Auch die Permeabilität der Caco-2-Zellbarriere war in den Diätgruppen (einschließlich der Standarddiät nach sechs- und 24-stündiger Inkubation) im Vergleich zur Kontrolle und dem Vehikel verringert. Die Diäten wiesen untereinander keine Unterschiede in der TLR4-Ligandenkonzentration und der Permeabilität des Zell-Monolayers auf. Es scheint, als wäre nicht die Bezeichnung einer Ernährung als vegan oder omnivor entscheidend für die Barrierefunktion, sondern vielmehr die spezifische Zusammensetzung der Diät und die daraus entstehenden Metabolite. Während eine höhere TLR4-Ligandenkonzentration im Überstand für eine größere immunologische Herausforderung spricht, können gleichzeitig vorhandene protektive Nahrungsbestandteile wie Ballaststoffe, kurzkettige Fettsäuren oder Polyphenole die Barriere stabilisieren und damit eine schützende Wirkung entfalten.

5.2 Methodische Limitationen und Stärken des gewählten Modells

Limitationen

Die vorliegende Arbeit weist einige methodische Einschränkungen auf, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen. Besonders die TEER-Messungen zeigten eine hohe Variabilität und erlaubten keine konsistenten Aussagen. Dieses Problem ist in der Literatur gut dokumentiert, da selbst bei standardisierten Caco-2-Assays Unterschiede in Passagezahl, Mediumzusammensetzung und Messbedingungen zu erheblichen Schwankungen führen können (72). Vor dem Hintergrund wurden zusätzlich TLR4-Liganden gemessen, wobei sich hier als Schwierigkeit herausstellte, dass sie auch in den Lebensmitteln und deshalb in den Diäten vorkommen.

Eine weitere Limitation ist die beschränkte Auswahl an Endpunkten. Die Analysen konzentrierten sich auf TEER-Werte und die TLR4-Ligandenkonzentration, während zusätzliche Marker wie die Expression von Tight-Junction-Proteinen oder die Bildung kurzkettiger Fettsäuren nicht berücksichtigt wurden. Diese Parameter können zusätzliche Hinweise auf die zugrunde liegenden Mechanismen liefern (73,74).

Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob die im Modell angesetzte Fermentationsdauer verändert werden sollte. Während das verwendete Protokoll von Pérez-Burillo et al. (57) eine Inkubation von 20 Stunden vorsieht, beträgt die tatsächliche Passagezeit des Speisebreis durch den Dünndarm nach aktuellen Erkenntnissen höchstens drei Stunden (75). Diese Diskrepanz könnte ein Anlass sein, die

verwendete Fermentationsdauer zu verkürzen, um die Inkubationszeit näher an die in vivo Situation anzupassen.

Stärken

Trotz dieser Einschränkungen weist das in dieser Arbeit eingesetzte Modell mehrere Stärken auf. Der kombinierte Ansatz aus INFOGEST-Verdauung (56), in vitro Fermentation (57) und anschließender Anwendung auf Caco-2-Transwell-Systeme stellt eine moderne Methodik dar, die den Einfluss verschiedener Ernährungsmuster auf die Darmbarriere vergleichsweise realitätsnah abbilden kann. Der Aufbau entspricht aktuellen Empfehlungen, die dafür plädieren, Lebensmittelwirkungen über kombinierte Verdauungs- und Absorptionskaskaden zu untersuchen, um ein integratives Bild von Ernährungseinflüssen zu gewinnen (76).

Eine wesentliche Stärke liegt in der Nutzung eines international anerkannten und standardisierten Verdauungsprotokolls. Das INFOGEST-Modell ist auf Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit ausgelegt, sodass sich die Daten in einen größeren wissenschaftlichen Kontext einordnen lassen und eine Abgleichbarkeit mit anderen Studien möglich ist (56). Die zusätzliche Fermentation stellt eine wichtige methodische Erweiterung dar, da sie die mikrobielle Aktivität berücksichtigt. Damit können neben den Effekten der primären Verdauung auch die Veränderungen durch mikrobielle Metabolite einbezogen werden, was die Differenzierung ernährungsbedingter Unterschiede verbessert (65). Durch die gute Praktikabilität eines Zellkulturmodells kann zudem auf ein Tiermodell verzichtet werden.

Ein weiterer Vorteil besteht in der Verwendung kompletter Diäten statt isolierter Nährstoffe. Dieser Ansatz ermöglicht es, verschiedene Lebensmittelbestandteile gleichzeitig zu betrachten und deren gemeinsame Wirkung auf die Barriere zu erfassen. Damit wird eine höhere Nähe zur Ernährungspraxis erreicht, was die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf ernährungswissenschaftliche Fragestellungen verbessert (77). Die Untersuchung verdeutlicht, dass Unterschiede in Ligandenlast und Barriereeffekten zwischen den Ernährungsmustern durch dieses lebensmittelnähe Vorgehen gut abgebildet werden können.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Modell trotz seiner methodischen Einschränkungen eine robuste und praxisnahe Methode darstellt. Es kombiniert standardisierte und international anerkannte Protokolle, integriert mikrobielle und zelluläre Ebenen und erlaubt die differenzierte Untersuchung von Ernährungsmustern. Damit liefert es eine wertvolle Grundlage für die weitere Erforschung der Zusammenhänge zwischen Ernährung und Darmbarriere, auch wenn zusätzliche Marker und eine methodische Feinjustierung die Aussagekraft in Zukunft weiter erhöhen könnten.

6. Fazit und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein in vitro-Modell zu etablieren, das die Effekte verschiedener Ernährungsmuster auf die Darmbarrierefunktion abbilden kann. Wenngleich die Ergebnisse darauf hinweisen, dass es Unterschiede zwischen den untersuchten Ernährungsmustern in diesem Modell gibt, wurden auch einige Schwierigkeiten und Verbesserungsmöglichkeiten ausgemacht. Die Messung der TEER-Werte ist für diese Methode nicht geeignet, als Alternative könnte ein parazellulärer Flux-Assay mit FITC-Dextran verwendet werden. Um robustere und reproduzierbare Aussagen tätigen zu können sollten außerdem die Verdauungs- und Fermentationsprotokolle sowie die Zellkulturbedingungen stärker standardisiert werden. Zudem sind größere Stichprobenumfänge und ggf. interlaboratorische Vergleiche Optionen, um die Reproduzierbarkeit zu erhöhen.

Darüber hinaus könnte das Modell durch die Messung weiterer Parameter wie kurzkettiger Fettsäuren aus der Fermentation erweitert werden. Diese Metabolite gelten als zentrale Mediatoren der Ernährungseffekte auf die Darmbarriere und würden eine präzisere Verknüpfung zwischen diätbedingten Veränderungen und funktionellen Konsequenzen erlauben. Auch eine Erhöhung der Probenzahl und Wiederholung der Experimente in unabhängigen Ansätzen wären notwendig, um die statistische Aussagekraft zu steigern. Für die in vitro-Fermentation könnte es in zukünftigen Studien interessant sein, die Fermentationszeit systematisch zu variieren, um eine realitätsnähere Abbildung zu erreichen.

Für die Zukunft erscheint zudem die Weiterentwicklung des Modells in Richtung komplexerer Systeme sinnvoll. Ko-Kulturen mit mukusproduzierenden Zelllinien oder der Einsatz dynamischer Systeme wie Organ-on-Chip-Technologien könnten die physiologische Relevanz verbessern und eine realitätsnähere Abbildung des Darmmilieus ermöglichen.

Insgesamt konnte mit der Arbeit ein erster Ansatz geschaffen werden, um die Effekte ganzer Ernährungsmuster in vitro vergleichbar zu machen. Um die Übertragbarkeit auf ernährungswissenschaftliche Fragestellungen zu erhöhen, sollten jedoch die methodischen Grundlagen weiter optimiert und zusätzliche Messgrößen integriert werden.

7. Zusammenfassung

Vorangegangene Untersuchungen konnten zeigen, dass eine Ernährung nach den Empfehlungen der Fachgesellschaften bereits innerhalb weniger Tage zu einer Reduktion der Endotoxinkonzentration im Blut führt, was auf eine verbesserte Funktion der Darmbarriere hinweist. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen verfolgte die vorliegende Arbeit das Ziel, diesen Zusammenhang in einem in vitro Modell zu etablieren, das für die Untersuchung der molekularen Mechanismen der Interaktion von Ernährungsmustern und der Darmbarriere geeignet ist. Zudem sollte geklärt werden, ob bestimmte Ernährungsmuster protektive Effekte auf die Integrität der epithelialen Zellschicht entfalten können.

Zunächst wurden Lebensmittelproben einer gesunden, auf den Empfehlungen der D-A-CH-Fachgesellschaften für Ernährung basierenden, omnivoren und veganen Ernährung sowie einer ‚westlichen‘ omnivoren Diät hergestellt. Diese wurden dann unter der Verwendung des INFOGEST-Protokolls zur in vitro Verdauung verdaut und durch eine anschließende Fermentation nach etablierten Methoden ergänzt. Die so aufbereiteten Proben wurden in einem Caco-2-Transwell-System eingesetzt, um die Integrität der intestinalen Barriere zu simulieren und Effekte der unterschiedlichen Diäten vergleichend zu analysieren. Die Caco-2-Zellen wurden für zwei, sechs und 24 Stunden mit den unterschiedlichen Diäten inkubiert und auf einer separaten 12-Well-Platte (nach zweistündiger Inkubation mit den Diäten) für ein und zwei Stunden mit bakteriellem Endotoxin behandelt. Dabei wurden zwei zentrale Parameter untersucht: zum einen die Durchlässigkeit des konfluenten Zellrasens für bakterielles Endotoxin im Über- und Unterstand der Zellkulturen und zum anderen die Barrierefunktion anhand der transepithelialen elektrischen Widerstandsmessung (TEER).

Die Ergebnisse zeigten, dass die verdauten und fermentierten Proben der veganen und omnivoren Diät eine deutlich erhöhte „Toll-like-receptor 4“ (TLR4)-Ligandenkonzentration in den apikalen Kompartimenten der Transwellssysteme aufwiesen, während dies für die Standarddiät nicht nachweisbar war. Diese Messungen deuten darauf hin, dass die untersuchten Ernährungsmuster selbst relevante Mengen an TLR4-Liganden enthalten, die unabhängig von zusätzlichem bakteriellem Endotoxin nachweisbar sind. In den basolateralen Kompartimenten der Transwellssysteme zeigte sich hingegen teilweise eine geringe Ligandenkonzentration. Besonders auffällig war, dass die relative Permeabilität der Zellen bei veganer und omnivorer Diät trotz erhöhter Ligandenlast im Überstand nicht anstieg, sondern sogar in den meisten Fällen reduziert war.

Die TEER-Werte zeigten insgesamt keine konsistenten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Die hohe Variabilität und fehlende Signifikanz stimmen mit Messungen anderer Arbeitsgruppen überein, die auf methodische Limitationen dieser Messung hinweisen.

Ziel der Arbeit war es ein Modell zu etablieren und zu testen. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass das hier verwendete Modell, bestehend aus standardisierter Verdauung, Fermentation und Caco-2-Barriere, eine differenzierte Untersuchung von Diäten ermöglicht.

Summary

Previous studies have demonstrated that a diet based on the recommendations of nutrition societies can reduce endotoxin concentrations in the blood within just a few days, indicating an improvement in intestinal barrier function. Building on these findings, the present study aimed to establish an in vitro model suitable for investigating the molecular mechanisms underlying the interaction between dietary patterns and the intestinal barrier. In addition, it should be clarified whether certain dietary patterns can have protective effects on the integrity of the epithelial cell layer.

Food samples reflecting a balanced omnivorous and vegan diet based on the recommendations of the German-speaking nutrition societies (D-A-CH), as well as a “Western”-type omnivorous diet, were prepared. These samples were subjected to in vitro digestion using the INFOGEST protocol and subsequently fermented according to established methods. The processed samples were then applied in a Caco-2 Transwell system to simulate intestinal barrier integrity and to enable comparative analysis of the different diets. Caco-2 cells were incubated with the dietary samples for two, six, and 24 hours, and separately exposed to bacterial endotoxin on 12-well plates (following a two-hour incubation with the diets) for one and two hours. Two central parameters were examined: first, the permeability of the confluent cell layer to bacterial endotoxin in the apical and basolateral compartments of the cultures, and second, barrier function assessed via transepithelial electrical resistance (TEER).

The results showed that digested and fermented samples of the vegan and omnivorous diets exhibited markedly increased concentrations of “Toll-like receptor 4” (TLR4) ligands in the apical compartments of the Transwell systems, whereas this was not observed for the standard diet. These measurements suggest that the investigated dietary patterns themselves contain relevant amounts of TLR4 ligands, detectable independently of additional bacterial endotoxin. In contrast, the basolateral compartments showed only low ligand concentrations. Notably, the relative permeability of cells exposed to the vegan and omnivorous diets did not increase despite higher apical ligand levels. In some cases, it was even reduced.

TEER values did not show consistent differences between the treatment groups. High variability and lack of statistical significance were consistent with findings from other research groups, highlighting methodological limitations of this measurement.

The aim of this work was to establish and test a model. Overall, the results demonstrate that the applied combination of standardized digestion, fermentation, and Caco-2 barrier assays provides a suitable framework for the differentiated investigation of dietary effects on intestinal barrier function.

Literaturverzeichnis

1. Neufeld LM, Ho E, Obeid R, Tzoulis C, Green M, Huber LG, u. a. Advancing nutrition science to meet evolving global health needs. *Eur J Nutr.* 2023;62(Suppl 1):1–16.
2. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. DGE. [zitiert 28. August 2025]. Leitlinien. Verfügbar unter: <http://www.dge.de/wissenschaft/dge-leitlinien/>
3. Hauner H, Bechthold A, Boeing H, Brönstrup A, Buyken A, Leschik-Bonnet E, u. a. Evidence-Based Guideline of the German Nutrition Society: Carbohydrate Intake and Prevention of Nutrition-Related Diseases. *Ann Nutr Metab.* 23. Januar 2012;60(Suppl. 1):1–58.
4. Vijaykumar S, McNeill A, Simpson J. Associations between conflicting nutrition information, nutrition confusion and backlash among consumers in the UK. *Public Health Nutr.* April 2021;24(5):914–23.
5. Leng G, Adan RAH, Belot M, Brunstrom JM, Graaf K de, Dickson SL, u. a. The determinants of food choice. *Proc Nutr Soc.* August 2017;76(3):316–27.
6. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. DGE. 2024 [zitiert 28. August 2025]. 16. Dreiländertagung der DGE, ÖGE und SGE. Verfügbar unter: <http://www.dge.de/veranstaltungen/tagungen/16-dreilaendertagung-der-dge-oege-und-sge/tagungsbericht/>
7. Albrecht A, Rakoczy T, Bittel M, Weyrauch S, Öznur Ö, Rauschenberger V, u. a. Einfluss lebensmittelausgelöster und bestehender Darmbarrierestörungen bei chronischen Darmerkrankungen. In: *Zeitschrift für Phytotherapie* [Internet]. Georg Thieme Verlag; 2023 [zitiert 28. August 2025]. S. YRW16. Verfügbar unter: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-0043-1769577>
8. Die Immunbarriere: Einfluss von Lebensmittelkomponenten auf die Darmbarriere | SpringerLink [Internet]. [zitiert 28. August 2025]. Verfügbar unter: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-59119-2_2
9. Bittel M, Weyrauch S, Groh ML, Langhorst J. Fokus Darmbarrierestörungen bei Reizdarmsyndrom unter Nutzung der konfokalen Laserendomikroskopie – Multimodales integratives Therapiekonzept verbessert Barriereintegrität und klinische Beschwerden – Ergebnisse einer explorativen, prospektiven Beobachtungsstudie. In: *Zeitschrift für Gastroenterologie* [Internet]. Georg Thieme Verlag KG; 2024 [zitiert 28. August 2025]. S. FV 22. Verfügbar unter: <https://www.thieme-connect.de/products/ejournals/html/10.1055/s-0044-1789645>
10. Pereira MT, Malik M, Nostro JA, Mahler GJ, Musselman LP. Effect of dietary additives on intestinal permeability in both *Drosophila* and a human cell co-culture. *Dis Model Mech.* 28. November 2018;11(12):dmm034520.
11. Kamiya T, Shime A, Fukuta H. The Epidemiology of Irritable Bowel Syndrome. In: Kamiya T, Fukudo S, Herausgeber. *Irritable Bowel Syndrome* [Internet]. Singapore: Springer Nature; 2024 [zitiert 28. August 2025]. S. 13–21. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/978-981-97-8410-3_2
12. Łuszczki E, Boakye F, Zielińska M, Dereń K, Bartosiewicz A, Oleksy Ł, u. a. Vegan diet: nutritional components, implementation, and effects on adults' health. *Front Nutr* [Internet]. 9. November

- 2023 [zitiert 17. Mai 2025];10. Verfügbar unter:
<https://www.frontiersin.org/journals/nutrition/articles/10.3389/fnut.2023.1294497/full>
13. Storz MA. What makes a plant-based diet? a review of current concepts and proposal for a standardized plant-based dietary intervention checklist. *Eur J Clin Nutr.* Juni 2022;76(6):789–800.
 14. Melina V, Craig W, Levin S. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Vegetarian Diets. *J Acad Nutr Diet.* 1. Dezember 2016;116(12):1970–80.
 15. Bakaloudi DR, Halloran A, Rippin HL, Oikonomidou AC, Dardavesis TI, Williams J, u. a. Intake and adequacy of the vegan diet. A systematic review of the evidence. *Clin Nutr.* 1. Mai 2021;40(5):3503–21.
 16. Malhotra A, Lakade A. Analytical Review on Nutritional Deficiencies in Vegan Diets: Risks, Prevention, and Optimal Strategies. *J Am Nutr Assoc.* 18. August 2025;44(6):545–55.
 17. Vellinga RE, Rippin HL, Gonzales BG, Temme EHM, Farrand C, Halloran A, u. a. Nutritional composition of ultra-processed plant-based foods in the out-of-home environment: a multi-country survey with plant-based burgers. *Br J Nutr.* 27. Oktober 2023;131(10):1691–8.
 18. Marcone GL, Rosini E, Crespi E, Pollegioni L. D-amino acids in foods. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1. Januar 2020;104(2):555–74.
 19. Friedman M. Chemistry, Nutrition, and Microbiology of d-Amino Acids. *J Agric Food Chem.* 1. September 1999;47(9):3457–79.
 20. Friedman M. Origin, Microbiology, Nutrition, and Pharmacology of D-Amino Acids. *Chem Biodivers.* 2010;7(6):1491–530.
 21. Aune D. Plant Foods, Antioxidant Biomarkers, and the Risk of Cardiovascular Disease, Cancer, and Mortality: A Review of the Evidence. *Adv Nutr.* November 2019;10(Suppl 4):S404–21.
 22. DGE [Internet]. [zitiert 13. August 2025]. Gut essen und trinken – die DGE-Empfehlungen. Verfügbar unter: <http://www.dge.de/gesunde-ernaehrung/gut-essen-und-trinken/dge-empfehlungen/>
 23. Mayra S, Ugarte N, Johnston CS. Health Biomarkers in Adults Are More Closely Linked to Diet Quality Attributes Than to Plant-Based Diet Categorization. *Nutrients.* Juni 2019;11(6):1427.
 24. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke JD, Serino M, u. a. Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol.* 18. November 2014;14(1):189.
 25. Liang L, Saunders C, Sanossian N. Food, gut barrier dysfunction, and related diseases: A new target for future individualized disease prevention and management. *Food Sci Nutr.* 7. März 2023;11(4):1671–704.
 26. Matar A, Damianos JA, Jencks KJ, Camilleri M. Intestinal Barrier Impairment, Preservation, and Repair: An Update. *Nutrients.* Januar 2024;16(20):3494.
 27. Khoshbin K, Camilleri M. Effects of dietary components on intestinal permeability in health and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1. November 2020;319(5):G589–608.

28. Fu Y, Lyu J, Wang S. The role of intestinal microbes on intestinal barrier function and host immunity from a metabolite perspective. *Front Immunol.* 9. Oktober 2023;14:1277102.
29. Nogal A, Valdes AM, Menni C. The role of short-chain fatty acids in the interplay between gut microbiota and diet in cardio-metabolic health. *Gut Microbes.* 25. März 2021;13(1):1897212.
30. Seethaler B, Nguyen NK, Basrai M, Kiechle M, Walter J, Delzenne NM, u. a. Short-chain fatty acids are key mediators of the favorable effects of the Mediterranean diet on intestinal barrier integrity: data from the randomized controlled LIBRE trial. *Am J Clin Nutr.* 1. Oktober 2022;116(4):928–42.
31. Zhang D, Jian YP, Zhang YN, Li Y, Gu LT, Sun HH, u. a. Short-chain fatty acids in diseases. *Cell Commun Signal.* 18. August 2023;21(1):212.
32. Zhang Y, Zhu X, Yu X, Novák P, Gui Q, Yin K. Enhancing intestinal barrier efficiency: A novel metabolic diseases therapy. *Front Nutr [Internet].* 2. März 2023 [zitiert 27. August 2025];10. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/journals/nutrition/articles/10.3389/fnut.2023.1120168/full>
33. Kumar V, Rohilla A, Ahire JJ. Omega-3 fatty acids and the gut microbiome: a new frontier in cardiovascular disease prevention. *Discov Med.* 25. Februar 2025;2(1):53.
34. Malesza IJ, Malesza M, Walkowiak J, Mussin N, Walkowiak D, Aringazina R, u. a. High-Fat, Western-Style Diet, Systemic Inflammation, and Gut Microbiota: A Narrative Review. *Cells.* 14. November 2021;10(11):3164.
35. Sun CY, Zheng ZL, Chen CW, Lu BW, Liu D. Targeting Gut Microbiota With Natural Polysaccharides: Effective Interventions Against High-Fat Diet-Induced Metabolic Diseases. *Front Microbiol [Internet].* 15. März 2022 [zitiert 29. August 2025];13. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2022.859206/full>
36. Cani PD, Van Hul M, Lefort C, Depommier C, Rastelli M, Everard A. Microbial regulation of organismal energy homeostasis. *Nat Metab.* Januar 2019;1(1):34–46.
37. Zhang C, Yin A, Li H, Wang R, Wu G, Shen J, u. a. Dietary Modulation of Gut Microbiota Contributes to Alleviation of Both Genetic and Simple Obesity in Children. *eBioMedicine.* 1. August 2015;2(8):968–84.
38. Ekawidyan KR, Abdullah M. Diet, nutrition and intestinal permeability: A mini review. *Asia Pac J Clin Nutr.* 1. März 2023;32(1):8–12.
39. Luo R, Yao Y, Chen Z, Sun X. An examination of the LPS-TLR4 immune response through the analysis of molecular structures and protein–protein interactions. *Cell Commun Signal.* 18. März 2025;23(1):142.
40. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* Juli 2004;4(7):499–511.
41. Pereira M, Durso DF, Bryant CE, Kurt-Jones EA, Silverman N, Golenbock DT, u. a. The IRAK4 scaffold integrates TLR4-driven TRIF and MYD88 signaling pathways. *Cell Rep.* 16. August 2022;40(7):111225.
42. Gong T, Liu L, Jiang W, Zhou R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol.* Februar 2020;20(2):95–112.

43. Zhan L, Zheng J, Meng J, Fu D, Pang L, Ji C. Toll-like receptor 4 deficiency alleviates lipopolysaccharide-induced intestinal barrier dysfunction. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother*. November 2022;155:113778.
44. Suzuki M, Hisamatsu T, Podolsky DK. Gamma Interferon Augments the Intracellular Pathway for Lipopolysaccharide (LPS) Recognition in Human Intestinal Epithelial Cells through Coordinated Up-Regulation of LPS Uptake and Expression of the Intracellular Toll-Like Receptor 4-MD-2 Complex. *Infect Immun*. Juni 2003;71(6):3503–11.
45. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability. 1989;96(3).
46. Rousset M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: Two *in vitro* models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie*. 1. September 1986;68(9):1035–40.
47. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stamatii A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol*. 1. Januar 2005;21(1):1–26.
48. Darling NJ, Mobbs CL, González-Hau AL, Freer M, Przyborski S. Bioengineering Novel *in vitro* Co-culture Models That Represent the Human Intestinal Mucosa With Improved Caco-2 Structure and Barrier Function. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 31. August 2020 [zitiert 3. September 2025];8. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/journals/bioengineering-and-biotechnology/articles/10.3389/fbioe.2020.00992/full>
49. Clarke LL. A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol*. Juni 2009;296(6):G1151–66.
50. Noel G, Baetz NW, Staab JF, Donowitz M, Kovbasnjuk O, Pasetti MF, u. a. A primary human macrophage-enteroid co-culture model to investigate mucosal gut physiology and host-pathogen interactions. *Sci Rep*. 27. März 2017;7(1):45270.
51. Foulke-Abel J, In J, Kovbasnjuk O, Zachos NC, Ettayebi K, Blutt SE, u. a. Human enteroids as an *ex-vivo* model of host-pathogen interactions in the gastrointestinal tract. *Exp Biol Med* Maywood NJ. September 2014;239(9):1124–34.
52. Puschhof J, Pleguezuelos-Manzano C, Martinez-Silgado A, Akkerman N, Saftien A, Boot C, u. a. Intestinal organoid cocultures with microbes. *Nat Protoc*. Oktober 2021;16(10):4633–49.
53. Shin W, Kim HJ. Intestinal barrier dysfunction orchestrates the onset of inflammatory host–microbiome cross-talk in a human gut inflammation-on-a-chip. *Proc Natl Acad Sci*. 6. November 2018;115(45):E10539–47.
54. Yissachar N, Zhou Y, Ung L, Lai NY, Mohan JF, Ehrlicher A, u. a. An Intestinal Organ Culture System Uncovers a Role for the Nervous System in Microbe-Immune Crosstalk. *Cell*. 9. März 2017;168(6):1135–1148.e12.
55. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*. November 2009;9(11):799–809.
56. Brodkorb A, Egger L, Alminger M, Alvito P, Assunção R, Ballance S, u. a. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat Protoc*. April 2019;14(4):991–1014.

57. Pérez-Burillo S, Molino S, Navajas-Porras B, Valverde-Moya ÁJ, Hinojosa-Nogueira D, López-Maldonado A, u. a. An in vitro batch fermentation protocol for studying the contribution of food to gut microbiota composition and functionality. *Nat Protoc.* Juli 2021;16(7):3186–209.
58. Hiebl V, Schachner D, Ladurner A, Heiss EH, Stangl H, Dirsch VM. Caco-2 Cells for Measuring Intestinal Cholesterol Transport - Possibilities and Limitations. *Biol Proced Online.* 11. April 2020;22(1):7.
59. Baumann A, Freutsmiedl V, Jelleschitz J, Staltner R, Brandt A, Schachner D, u. a. Honokiol, a Neolignan from *Magnolia officinalis*, Attenuated Fructose-Induced Hepatic Fat Accumulation by Improving Intestinal Barrier Function in Mice. *J Nutr.* 1. April 2025;155(4):1173–82.
60. Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom.* April 2015;20(2):107–26.
61. InvivoGen. HEK-Blue™ Detection: Cell culture medium for SEAP detection [Product data sheet] [Internet]. [zitiert 5. September 2025]. Verfügbar unter: https://www.invivogen.com/sites/default/files/invivogen/products/files/hek_blue_detection.pdf
62. Incze O, Bacsur P, Resál T, Keresztes C, Molnár T. The Influence of Nutrition on Intestinal Permeability and the Microbiome in Health and Disease. *Front Nutr* [Internet]. 25. April 2022 [zitiert 3. September 2025];9. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/journals/nutrition/articles/10.3389/fnut.2022.718710/full>
63. Makki K, Deehan EC, Walter J, Bäckhed F. The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. *Cell Host Microbe.* 13. Juni 2018;23(6):705–15.
64. So D, Whelan K, Rossi M, Morrison M, Holtmann G, Kelly JT, u. a. Dietary fiber intervention on gut microbiota composition in healthy adults: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 1. Juni 2018;107(6):965–83.
65. Kondrashina A, Arranz E, Cilla A, Faria MA, Santos-Hernández M, Miralles B, u. a. Coupling in vitro food digestion with in vitro epithelial absorption; recommendations for biocompatibility. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 13. Oktober 2024;64(26):9618–36.
66. Salvi PS, Cowles RA. Butyrate and the Intestinal Epithelium: Modulation of Proliferation and Inflammation in Homeostasis and Disease. *Cells.* Juli 2021;10(7):1775.
67. Zhu J, Dou J, Wu C, Fan G, Li T, Shen D. Intestinal Barrier Protective Study of Jujube Peel Polyphenols/Zein Complexes by a Combined Caco-2 Cell and *Caenorhabditis elegans* Model: A Perspective of Proteomics. *J Agric Food Chem.* 5. Juli 2023;71(26):10097–106.
68. Marino M, Venturi S, Rendine M, Porrini M, Gardana C, Klimis-Zacas D, u. a. Wild blueberry (*V. angustifolium*) improves TNF α -induced cell barrier permeability through claudin-1 and oxidative stress modulation in Caco-2 cells. *Food Funct.* 2023;14(16):7387–99.
69. Wang X, Qi Y, Zheng H. Dietary Polyphenol, Gut Microbiota, and Health Benefits. *Antioxidants.* Juni 2022;11(6):1212.
70. Conlon MA, Bird AR. The Impact of Diet and Lifestyle on Gut Microbiota and Human Health. *Nutrients.* Januar 2015;7(1):17–44.

71. Sinha SR, Haileselassie Y, Nguyen LP, Tropini C, Wang M, Becker LS, u. a. Dysbiosis-Induced Secondary Bile Acid Deficiency Promotes Intestinal Inflammation. *Cell Host Microbe*. 8. April 2020;27(4):659-670.e5.
72. Kus M, Ibragimow I, Piotrowska-Kempisty H. Caco-2 Cell Line Standardization with Pharmaceutical Requirements and In Vitro Model Suitability for Permeability Assays. *Pharmaceutics*. November 2023;15(11):2523.
73. Dalile B, Van Oudenhove L, Vervliet B, Verbeke K. The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. August 2019;16(8):461–78.
74. Wang HB, Wang PY, Wang X, Wan YL, Liu YC. Butyrate Enhances Intestinal Epithelial Barrier Function via Up-Regulation of Tight Junction Protein Claudin-1 Transcription. *Dig Dis Sci*. 1. Dezember 2012;57(12):3126–35.
75. Braden B, Schröder O. Bestimmung von Magenentleerung und Dünndarmtransit. In: Stein J, Wehrmann T, Herausgeber. *Funktionsdiagnostik in der Gastroenterologie: Medizinische Standards* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2020 [zitiert 26. August 2025]. S. 61–76. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/978-3-662-59133-8_5
76. Zhou H, Tan Y, McClements DJ. Applications of the INFOGEST In Vitro Digestion Model to Foods: A Review. *Annu Rev Food Sci Technol*. 27. März 2023;14(Volume 14, 2023):135–56.
77. Ji H, Hu J, Zuo S, Zhang S, Li M, Nie S. In vitro gastrointestinal digestion and fermentation models and their applications in food carbohydrates. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 4. Juli 2022;62(19):5349–71.

Anhang

Zusammensetzung der omnivoren-, veganen- und Standarddiät

Für jedes der drei verschiedenen Ernährungsmuster, die in der Zellkultur eingesetzt wurden, wurden je zwei volle Tage Ernährung geplant, zubereitet und gefriergetrocknet. Die Speisen und Getränke bestanden aus folgenden Zutaten:

Omnivore Diät, Tag 1

Frühstück

Haferflocken (80 g, 283.6 kcal), Kuhmilch Trinkmilch 3.5% Fett (100 g, 65.0 kcal), Joghurt < 1% Fett (20 g, 7.4 kcal), Cashewnuss geröstet (10 g, 59.5 kcal), Blütenhonig (30 g, 92.0 kcal), Weintrauben (50 g, 34.8 kcal), Rosinen (50 g, 152.0 kcal), Banane (150 g, 134.4 kcal), Apfel (100 g, 60.9 kcal), Mineralwasser prickelnd (500 g, 0.0 kcal)

Zwischenanalyse: Energie 889.6 kcal

Mittagessen

Kartoffeln geschält (210 g, 148.1 kcal), Karotte (60 g, 19.9 kcal), Pastinake (60 g, 32.8 kcal), Porree (20 g, 5.3 kcal), Zuckermais (50 g, 46.5 kcal), Schwein Schinken gekocht (30 g, 44.5 kcal), Rapsöl (21 g, 185.7 kcal), Kräutermischung (3 g, 1.4 kcal), Rucola (20 g, 5.9 kcal), Essig (2 g, 0.4 kcal), Kürbiskernöl (16 g, 141.5 kcal), Apfel (30 g, 18.3 kcal), Kürbiskern (10 g, 56.5 kcal), Speisesalz (1 g, 0.0 kcal), Mineralwasser prickelnd (500 g, 0.0 kcal)

Zwischenanalyse: Energie 706.7 kcal

Zwischenmahlzeit

Orange (150 g, 64.9 kcal), Dattel getrocknet (95 g, 264.5 kcal), Mineralwasser prickelnd (500 g, 0.0 kcal)

Zwischenanalyse: Energie 329.4 kcal

Abendessen

Vollkornbrot (80 g, 158.3 kcal), Margarine (15 g, 99.8 kcal), Liptauer Original mild (25 g, 48.8 kcal), Brie mind. 50% Fett i. Tr. (30 g, 102.5 kcal), Preiselbeere Konfitüre (20 g, 53.8 kcal), Mandarine (100 g, 50.2 kcal), Weintrauben (50 g, 34.8 kcal), Apfel (70 g, 42.7 kcal), Mineralwasser prickelnd (500 g, 0.0 kcal)

Zwischenanalyse: Energie 590.9 kcal

Omnivore Diät, Tag 2**Frühstück**

Roggen Vollkornmehl (75 g, 225.3 kcal), Kuhmilch Trinkmilch 3.5% Fett (180 g, 117.0 kcal), Mineralwasser prickelnd (5 g, 0.0 kcal), Agavendicksaft (20 g, 14.7 kcal), Speisesalz (1 g, 0.0 kcal), Rapsöl (12 g, 106.1 kcal), Karamellgebäck-Brottaufstrich Creme VEGAN (25 g, 146.8 kcal), Preiselbeere Konfitüre (27 g, 72.7 kcal), Liptauer Original mild (40 g, 78.0 kcal), Orange (180 g, 77.9 kcal), Mineralwasser prickelnd (500 g, 0.0 kcal)

Zwischenanalyse: Energie 838.5 kcal

Mittagessen

Brathähnchen Brustfilet (30 g, 30.5 kcal), Rapsöl (20 g, 176.9 kcal), Karotte (120 g, 39.9 kcal), Paprikaschoten (120 g, 23.5 kcal), Pastinake (100 g, 54.7 kcal), Kokosmilch (180 g, 18.1 kcal), Reis parboiled (85 g, 298.6 kcal), Trinkwasser (170 g, 0.0 kcal), Speisesalz (1 g, 0.0 kcal), Cashewnuss geröstet (15 g, 89.2 kcal), Kräutermischung (3 g, 1.4 kcal), Mineralwasser prickelnd (500 g, 0.0 kcal)

Zwischenanalyse: Energie 732.8 kcal

Zwischenmahlzeit

Banane (200 g, 179.3 kcal), Dattel getrocknet (100 g, 278.4 kcal), Mineralwasser prickelnd (500 g, 0.0 kcal)

Zwischenanalyse: Energie 457.7 kcal

Abendessen

Weißbrot-Weizenbrot (60 g, 145.6 kcal), Vollkornbrot (80 g, 158.3 kcal), Tomate rot (100 g, 17.4 kcal), Porree (12 g, 3.2 kcal), Knoblauch (3 g, 4.3 kcal), Essig (1 g, 0.2 kcal), Rapsöl (12 g, 106.1 kcal), Rucola (25 g, 7.4 kcal), Gurke (50 g, 6.1 kcal), Mineralwasser prickelnd (500 g, 0.0 kcal)

Zwischenanalyse: Energie 448.5 kcal

Vegane Diät, Tag 1

Frühstück

Haferflocken (100 g, 354.4 kcal), Hafer Drink (110 g, 45.2 kcal), Veganer Naturjoghurt (20 g, 15.1 kcal), Cashewnuss geröstet (5 g, 29.7 kcal), Agavendicksaft (10 g, 7.3 kcal), Weintrauben (55 g, 38.3 kcal), Rosinen (50 g, 152.0 kcal), Banane (150 g, 134.4 kcal), Apfel (100 g, 60.9 kcal), Mineralwasser prickelnd (500 g, 0.0 kcal)

Zwischenanalyse: Energie 837.4 kcal

Mittagessen

Kartoffeln geschält (250 g, 176.3 kcal), Karotte (40 g, 13.3 kcal), Pastinake (75 g, 41.0 kcal), Porree (20 g, 5.3 kcal), Zuckermais (40 g, 37.2 kcal), Speck vegan (95 g, 88.1 kcal), Rapsöl (25 g, 221.1 kcal), Kräutermischung (5 g, 2.3 kcal), Rucola (25 g, 7.4 kcal), Essig (1 g, 0.2 kcal), Kürbiskernöl (22 g, 194.6 kcal), Apfel (100 g, 60.9 kcal), Kürbiskerne (5 g, 28.3 kcal), Speisesalz (1 g, 0.0 kcal), Mineralwasser prickelnd (600 g, 0.0 kcal)

Zwischenanalyse: Energie 875.8 kcal

Zwischenmahlzeit

Orange (200 g, 86.5 kcal), Dattel getrocknet (50 g, 139.2 kcal), Mineralwasser prickelnd (750 g, 0.0 kcal)

Zwischenanalyse: Energie 225.7 kcal

Abendessen

Vollkornbrot (75 g, 148.4 kcal), Margarine vegan (15 g, 34.1 kcal), Liptauer Art Aufstrich vegan (20 g, 44.5 kcal), Brie Weichkäse vegan (35 g, 111.7 kcal), Preiselbeere Konfitüre (25 g, 67.3 kcal), Mandarine

(80 g, 40.2 kcal), Weintrauben (80 g, 55.6 kcal), Apfel (100 g, 60.9 kcal), Mineralwasser prickelnd (500 g, 0.0 kcal)

Zwischenanalyse: Energie 562.6 kcal

Vegane Diät, Tag 2

Frühstück

Roggen Vollkornmehl (90 g, 270.4 kcal), Hafer Drink (125 g, 51.4 kcal), Mineralwasser prickelnd (10 g, 0.0 kcal), Agavendicksaft (20 g, 14.7 kcal), Speisesalz (1 g, 0.0 kcal), Rapsöl (12 g, 106.1 kcal), Karamellgebäck-Brot aufstrich Creme vegan (20 g, 117.4 kcal), Preiselbeere Konfitüre (25 g, 67.3 kcal), Liptauer Art Aufstrich vegan (30 g, 66.7 kcal), Orange (200 g, 86.5 kcal), Mineralwasser prickelnd (500 g, 0.0 kcal)

Zwischenanalyse: Energie 780.5 kcal

Mittagessen

Huhn Filetstückchen vegan (65 g, 81.6 kcal), Rapsöl (25 g, 221.1 kcal), Karotte gegart (70 g, 23.3 kcal), Paprikaschoten (65 g, 12.7 kcal), Pastinake (70 g, 38.3 kcal), Kokosmilch (150 g, 15.1 kcal), Reis parboiled (70 g, 245.9 kcal), Trinkwasser (140 g, 0.0 kcal), Speisesalz (1 g, 0.0 kcal), Cashewnuss geröstet (15 g, 89.2 kcal), Kräutermischung (3 g, 1.4 kcal), Mineralwasser prickelnd (500 g, 0.0 kcal)

Zwischenanalyse: Energie 728.5 kcal

Zwischenmahlzeit

Banane (150 g, 134.4 kcal), Dattel getrocknet (85 g, 236.7 kcal), Mineralwasser prickelnd (750 g, 0.0 kcal)

Zwischenanalyse: Energie 371.1 kcal

Abendessen

Weißbrot-Weizenbrot (100 g, 242.6 kcal), Vollkornbrot (100 g, 197.9 kcal), Tomate rot (125 g, 21.8 kcal), Porree (15 g, 3.9 kcal), Knoblauch (3 g, 4.3 kcal), Essig (1 g, 0.2 kcal), Rapsöl (15 g, 132.6 kcal), Rucola (25 g, 7.4 kcal), Gurke (50 g, 6.1 kcal), Mineralwasser prickelnd (500 g, 0.0 kcal)

Zwischenanalyse: Energie 616.8 kcal

Standarddiät, Tag 1

Frühstück

Schoko-Müsli (75 g, 288.8 kcal), Kuhmilch Trinkmilch 3.5% Fett (150 g, 97.5 kcal), Banane (100 g, 89.6 kcal), Kaffee (200 g, 4.3 kcal)

Zwischenanalyse: Energie 480.2 kcal

1. Zwischenmahlzeit

Laugengebäck (50 g, 171.2 kcal), Butter (10 g, 74.1 kcal)

Zwischenanalyse: Energie 245.4 kcal

Mittagessen

Kartoffeln geschält (250 g, 176.3 kcal), Trinkwasser (250 g, 0.0 kcal), Speisesalz (3,5 g, 0.0 kcal), Kuhmilch Trinkmilch 3.5% Fett (30 g, 19.5 kcal), Butter (10 g, 74.1 kcal), Broccoli (150 g, 42.3 kcal), Rumpsteak (Rind) (150 g, 369.3 kcal), Colagetränk (330 g, 155.4 kcal)

Zwischenanalyse: Energie 836.8 kcal

2. Zwischenmahlzeit

Schokolade (50 g, 268.3 kcal), Apfel (100 g, 60.9 kcal), Trinkwasser (250 g, 0.0 kcal)

Zwischenanalyse: Energie 329.2 kcal

Abendessen

Vollkornbrot (80 g, 158.3 kcal), Butter (20 g, 148.2 kcal), Emmentaler mind. 45% Fett i. Tr. (40 g, 151.1 kcal), Salami (40 g, 149.9 kcal), Tee (200 g, 1.0 kcal)

Zwischenanalyse: Energie 608.6 kcal

Standarddiät, Tag 2

Frühstück

Schoko-Müsli (75 g, 288.8 kcal), Kuhmilch Trinkmilch 3.5% Fett (150 g, 97.5 kcal), Banane (100 g, 89.6 kcal), Kaffee (150 g, 3.2 kcal)

Zwischenanalyse: Energie 479.1 kcal

Mittagessen

Kartoffeln geschält (200 g, 141.0 kcal), Speisesalz (3 g, 0.0 kcal), Rind/Schwein Hackfleisch (125 g, 357.3 kcal), Rapsöl (10 g, 88.4 kcal), Semmel (105 g, 298.1 kcal), Tomatenketchup (20 g, 22.0 kcal), Eisbergsalat (20 g, 2.6 kcal), Tomate rot (20 g, 3.5 kcal), Gurke (20 g, 2.4 kcal), Cheddar mind. 50% Fett i. Tr. (20 g, 78.7 kcal), Colagetränk (190 g, 89.5 kcal), Trinkwasser (250 g, 0.0 kcal)

Zwischenanalyse: Energie 1083.6 kcal

Zwischenmahlzeit

Schokolade (50 g, 268.3 kcal), Apfel (100 g, 60.9 kcal), Trinkwasser (300 g, 0.0 kcal)

Zwischenanalyse: Energie 329.2 kcal

Abendessen

Vollkornbrot (80 g, 158.3 kcal), Butter (20 g, 148.2 kcal), Emmentaler mind. 45% Fett i. Tr. (40 g, 151.1 kcal), Salami (40 g, 149.9 kcal), Tee (150 g, 0.7 kcal)

Zwischenanalyse: Energie 608.3 kcal

Erklärung zum Einsatz von Künstlicher Intelligenz

In der vorliegenden Masterarbeit wurde das Sprachmodell *ChatGPT* (OpenAI, Version GPT-5, Stand: September 2025) unterstützend eingesetzt.
Der Einsatz erfolgte ausschließlich zur

- Strukturierung von Ideen (ausschließlich in Einleitung, Diskussion, Fazit und Zusammenfassung),
- Klärung von methodischen und formalen Fragen (z. B. Erstellung von Verzeichnissen in MS Word),
- Formulierungsvorschlägen und sprachlicher Optimierung.

Alle inhaltlichen Aussagen, Daten, Theorien und Ergebnisse, die in dieser Arbeit dargestellt sind, beruhen auf eigener Leistung und/oder sind durch geeignete wissenschaftliche Fachquellen belegt. ChatGPT wurde nicht als Quelle für wissenschaftliche Inhalte genutzt, sondern lediglich als Hilfsmittel im Schreibprozess.