

# MASTERARBEIT | MASTER'S THESIS

Titel | Title

Fruktose und SP1 als Modulatoren der TLR2-Expression in  
menschlichen Immunzellen

verfasst von | submitted by

Amelie Sarah Kristin Geyer 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**

Hiermit möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Ina Bergheim für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe sowie für die Betreuung meiner Masterarbeit bedanken. Vielen Dank für Ihre Unterstützung und die konstruktiven Hinweise während der Erstellung der Arbeit.

Ein großer Dank gilt außerdem der gesamten Arbeitsgruppe, die immer bereit war zu helfen. Besonders bedanken möchte ich mich bei Anja Baumann, die mich während der gesamten Zeit geduldig unterstützt und begleitet hat. Ebenfalls danke ich Raphaela Staltner, für die Zusammenarbeit im Rahmen ihres Projekts und die hilfreichen fachlichen Anregungen.

Auch meinen Kommilitoninnen und Kommilitonen danke ich für die angenehme gemeinsame Zeit, den Austausch und die Unterstützung.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freundinnen und Freunden bedanken, die mich während des Studiums auf vielfältige Weise unterstützt und mir stets den Rücken gestärkt haben.

# Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                            |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Danksagung .....</b>                                                                                    | <b>I</b>   |
| <b>Inhaltsverzeichnis .....</b>                                                                            | <b>II</b>  |
| <b>Tabellenverzeichnis .....</b>                                                                           | <b>V</b>   |
| <b>Abbildungsverzeichnis.....</b>                                                                          | <b>VI</b>  |
| <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>                                                                         | <b>VII</b> |
| <br>                                                                                                       |            |
| <b>1. Einleitung.....</b>                                                                                  | <b>1</b>   |
| 1.1. Grundlagen des Fruktosestoffwechsels.....                                                             | 1          |
| 1.1.1. Absorption und Metabolismus.....                                                                    | 1          |
| 1.2. Das menschliche Immunsystem und bakterielle Erreger .....                                             | 4          |
| 1.2.1. Grundlagen des angeborenen Immunsystems.....                                                        | 4          |
| 1.2.2. Bakterielle Infektionen und grampositive Bakterien: Struktur und Pathogenität .....                 | 4          |
| 1.2.3. Toll-like Rezeptoren und deren Rolle im angeborenen Immunsystem .....                               | 5          |
| 1.3. Fruktose und das Immunsystem: Modulation und potentielle Auswirkungen auf Infektionskrankheiten ..... | 9          |
| 1.4. Fragestellung und Zielsetzung.....                                                                    | 10         |
| <br>                                                                                                       |            |
| <b>2. Materialien.....</b>                                                                                 | <b>11</b>  |
| 2.1. Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte .....                                                     | 11         |
| 2.2. Fruktose-Messung im Plasma .....                                                                      | 12         |
| 2.3. Zellisolation primärer Immunzellen .....                                                              | 12         |
| 2.3.1. Zellisolation von PBMC's .....                                                                      | 12         |
| 2.3.2. Zellisolation von Monozyten .....                                                                   | 13         |
| 2.3.3. Zellisolation von T- und B-Lymphozyten .....                                                        | 13         |
| 2.4. Stimulation der Immunzellen .....                                                                     | 14         |
| 2.5. mRNA-Expression.....                                                                                  | 14         |
| 2.5.1. RNA-Isolation.....                                                                                  | 14         |
| 2.5.2. cDNA-Synthese (Reverse Transkription) .....                                                         | 15         |
| 2.5.3. Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion.....                                                | 15         |
| 2.6. Enzyme-linked Immunosorbent Assay .....                                                               | 15         |
| 2.7. Western-Blot.....                                                                                     | 16         |
| 2.7.1. Proteinextraktion .....                                                                             | 18         |

|           |                                                                                                                                                                        |           |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.8.      | Statistische Auswertung .....                                                                                                                                          | 18        |
| <b>3.</b> | <b>Methoden.....</b>                                                                                                                                                   | <b>19</b> |
| 3.1.      | Humanstudien .....                                                                                                                                                     | 19        |
| 3.2.      | Fruktose-Messung im Plasma .....                                                                                                                                       | 19        |
| 3.3.      | Zellisolation primärer Immunzellen .....                                                                                                                               | 20        |
| 3.3.1.    | Zellisolation von PBMCs aus Vollblut .....                                                                                                                             | 20        |
| 3.3.2.    | Zellisolation von Monozyten aus Vollblut oder Buffy-Coat .....                                                                                                         | 20        |
| 3.3.3.    | Zellisolation von T- und B-Lymphozyten aus Buffy-Coat.....                                                                                                             | 21        |
| 3.4.      | Stimulation der Immunzellen .....                                                                                                                                      | 22        |
| 3.5.      | mRNA-Expression .....                                                                                                                                                  | 24        |
| 3.5.1.    | RNA-Isolation .....                                                                                                                                                    | 24        |
| 3.5.2.    | cDNA-Synthese (Reverse Transkription) .....                                                                                                                            | 25        |
| 3.5.3.    | Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion.....                                                                                                                   | 26        |
| 3.6.      | Enzyme Linked Immunosorbent Assay .....                                                                                                                                | 28        |
| 3.7.      | Western-Blot: Proteinbestimmung von SP1 in humanen Monozyten .....                                                                                                     | 29        |
| 3.8.      | Statistische Auswertung .....                                                                                                                                          | 33        |
| <b>4.</b> | <b>Ergebnisse .....</b>                                                                                                                                                | <b>34</b> |
| 4.1.      | Einfluss einer fruktosereichen Ernährung auf die Fruktoseplasmakonzentration und die GLUT5-mRNA-Expression in PBMCs .....                                              | 34        |
| 4.2.      | Einfluss der Behandlung mit Fruktose auf die mRNA-Expression von GLUT5 in Monozyten und B- und T-Lymphozyten .....                                                     | 35        |
| 4.3.      | Einfluss der Behandlung mit Fruktose und Stimulation mit LTA auf die mRNA-Expression pro-inflammatorischer Zytokine in Monozyten .....                                 | 35        |
| 4.4.      | Einfluss der Behandlung mit Fruktose und Stimulation mit LTA auf die Proteinkonzentration pro-inflammatorischer Zytokine in Monozyten .....                            | 37        |
| 4.5.      | Effekt von Mithramycin A auf die Fruktose-vermittelte Expression von TLR2 und der Einfluss von Fruktose auf die Proteinkonzentration und mRNA-Expression von SP1 ..... | 37        |
| <b>5.</b> | <b>Diskussion .....</b>                                                                                                                                                | <b>40</b> |
| 5.1.      | Fruktose ist ein Regulator von GLUT5-mRNA in Monozyten.....                                                                                                            | 40        |
| 5.2.      | Fruktose moduliert die TLR2-vermittelte Immunantwort über SP1-abhängige Mechanismen.....                                                                               | 41        |

|                                  |           |
|----------------------------------|-----------|
| 5.3. Fazit und Ausblick .....    | 44        |
| <b>Zusammenfassung .....</b>     | <b>45</b> |
| <b>Summary .....</b>             | <b>46</b> |
| <b>Literaturverzeichnis.....</b> | <b>47</b> |
| <b>Anhang .....</b>              | <b>57</b> |

## Tabellenverzeichnis

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 1: Herstellung der Fruktose-Standardreihe .....                                          | 19 |
| Tabelle 2: Herstellung des RPMI-1640 Mediums .....                                               | 21 |
| Tabelle 3: Lösungen zur Isolation von T- und B-Lymphozyten.....                                  | 22 |
| Tabelle 4: Versuchsbedingungen für die Zellstimulation.....                                      | 24 |
| Tabelle 5: Mastermix (cDNA-Synthese) .....                                                       | 25 |
| Tabelle 6: Temperaturprofil der cDNA-Synthese im Thermocycler .....                              | 26 |
| Tabelle 7: Mastermix für die RT-qPCR.....                                                        | 26 |
| Tabelle 8: Primersequenzen und eingesetzte Primerkonzentration .....                             | 27 |
| Tabelle 9: Temperaturprofile der real-time qPCR.....                                             | 27 |
| Tabelle 10: Probenverdünnungen für den ELISA.....                                                | 28 |
| Tabelle 11: Lösungen für die Urea/DTT Proteinextraktion.....                                     | 30 |
| Tabelle 12: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel .....                                       | 31 |
| Tabelle 13: Ablauf der Immundetektion.....                                                       | 32 |
| Tabelle 14: Antikörperbedingungen für den Westernblot.....                                       | 32 |
| Tabelle 15: Anleitung zur Herstellung von 1l PBS (Phosphate buffered saline) für den ELISA ..... | 57 |
| Tabelle 16: Herstellung der Reagenzien für den Western-Blot.....                                 | 57 |

## Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1: Fruktosestoffwechsel in der Leber .....                                                                                                                                                                                                                 | 3  |
| Abbildung 2: TLR2-Signalkaskade .....                                                                                                                                                                                                                                | 7  |
| Abbildung 3: Zellstimulation: Monozyten.....                                                                                                                                                                                                                         | 23 |
| Abbildung 4: Arbeitsablauf Western-Blot: .....                                                                                                                                                                                                                       | 29 |
| Abbildung 5: Fruktosekonzentration im Plasma und GLUT5-mRNA-Expression in PBMCs von Probanden der ENDO-META-Studie nach der einmaligen Aufnahme von 40g Fruktose und der dreitägigen Aufnahme einer fruktosereichen Ernährung (25 E% der Gesamtkalorienzufuhr). .... | 34 |
| Abbildung 6: GLUT5-mRNA-Expression in Monozyten sowie B- und T-Lymphozyten nach 2, 6 und 12-Stündiger Inkubation mit Fruktose (50 µM). ....                                                                                                                          | 35 |
| Abbildung 7: mRNA-Expression pro-inflammatorischer Zytokine nach 12-Stündiger Vorbehandlung mit 50 µM Fruktose und 2-Stündiger Stimulation mit 10 µg/mL LTA in Monozyten. ....                                                                                       | 36 |
| Abbildung 8: Proteinkonzentration pro-inflammatorischer Zytokine nach Vorbehandlung mit Fruktose und Stimulation mit LTA in Monozyten.....                                                                                                                           | 37 |
| Abbildung 9: SP1-mRNA- und Proteinkonzentration in Monozyten nach der Inkubation mit Fruktose sowie die TLR2-mRNA-Expression in Monozyten nach der Inkubation mit Fruktose ± Mithramycin A.....                                                                      | 38 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                   |                                               |
|-------------------|-----------------------------------------------|
| ADP               | Adenosindiphosphat                            |
| AMP               | Adenosinmonophosphat                          |
| AMPK              | AMP-activated protein kinase                  |
| AMV               | avian myeloblastosis virus                    |
| AP-1              | activator protein-1                           |
| APS               | Ammoniumperoxodisulfat                        |
| ATP               | Adenosintriphosphat                           |
| CD                | cluster of differentiation                    |
| cDNA              | complementary DNA                             |
| ChREBP            | carbohydrate response element-binding protein |
| CO <sub>2</sub>   | Kohlenstoffdioxid                             |
| CREB              | cAMP response element-binding protein         |
| dH <sub>2</sub> O | destilliertes Wasser                          |
| DHAP              | Dihydroxyacetonphosphat                       |
| DNA               | Desoxyribonukleinsäure                        |
| DNL               | De-novo-Lipogenese                            |
| dNTP              | Desoxyribonukleosidtriphosphat                |
| DPBS              | Dulbecco's phosphate-buffered saline          |
| DTT               | Dithiothreitol                                |
| EDTA              | ethylenediaminetetraacetic acid               |
| ELISA             | enzyme linked immunosorbent assay             |
| ERK               | extracellular-signal regulated kinases        |
| F1P               | Fruktose-1-Phosphat                           |
| FA                | fatty acids                                   |
| FBS               | fetal bovine serum                            |
| Fru               | Fruktose                                      |
| GAP               | Glycerinaldehyd-3-phosphat                    |
| GK                | Glukokinase                                   |
| GLUT              | glucose transporter                           |
| HFCS              | high-fructose corn syrup                      |

|                |                                                                   |
|----------------|-------------------------------------------------------------------|
| HRP            | horseradish peroxidase                                            |
| IL             | interleukin                                                       |
| IRAK           | IL-1-receptor-associated kinase                                   |
| IRF            | interferon regulatory factor                                      |
| JNK            | c-Jun N-terminal kinase                                           |
| KHK            | Ketohexokinase                                                    |
| LPS            | lipopolysaccharide                                                |
| LRRs           | leucine-rich repeats                                              |
| LTA            | lipoteichoic acid                                                 |
| MAL            | MyD88-adaptor-like protein                                        |
| MAP-Kinasen    | mitogen-activated protein kinases                                 |
| MAPKKK         | mitogen-activated protein kinase kinase kinase                    |
| MASLD          | metabolische Dysfunktion-assoziierte steatotische Lebererkrankung |
| MMP            | Magermilchpulver                                                  |
| mRNA           | messenger ribonucleic acid                                        |
| mTORC          | mammalian target of rapamycin complex                             |
| MW             | Mittelwert                                                        |
| MyD88          | myeloid differentiation primary response 88                       |
| n              | Anzahl                                                            |
| NF- $\kappa$ B | nuclear factor kappa B                                            |
| NTC            | non-template control                                              |
| PAMP           | pathogen-associated molecular pattern                             |
| PBMCs          | peripheral blood mononuclear cells                                |
| PBS            | phosphate buffered saline                                         |
| Pen/Strep      | Penicillin/streptomycin                                           |
| PRR            | pattern recognition receptor                                      |
| PVDF           | Polyvinylidendifluorid                                            |
| rcf            | relative centrifugal force                                        |
| RD             | reagent diluent                                                   |
| Real-time qPCR | quantitative real-time polymerase chain reaction                  |
| RNA            | ribonucleic acid                                                  |

|               |                                                            |
|---------------|------------------------------------------------------------|
| ROS           | reaktive Sauerstoffspezies                                 |
| rpm           | revolutions per minute                                     |
| SDS           | sodium dodecyl sulfate                                     |
| SEM           | standard error of the mean                                 |
| SGLT1         | sodium glucose co-transporter 1                            |
| SP1           | Transkriptionsfaktor SP1, Spezifitätsprotein 1             |
| STD           | Standard                                                   |
| TAB           | TAK1-binding protein                                       |
| TAK1          | transforming growth factor-beta activated kinase 1         |
| TCA-Zyklus    | Tricarbonsäurezyklus                                       |
| TEMED         | Tetramethylethyldiamin                                     |
| TIR           | Toll/IL-1Receptor                                          |
| TIRAP         | TIR domain containing adaptor protein                      |
| TLR           | Toll-like receptor                                         |
| TNF- $\alpha$ | Tumornekrosefaktor alpha                                   |
| TRAF6         | TNF receptor-associated factor 6                           |
| TRIF          | TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ |
| Tris          | Tris(hydroxymethyl)aminomethan                             |
| VF            | Verdünnungsfaktor                                          |
| WTA           | wall teichoic acid                                         |



# **1. Einleitung**

## **1.1. Grundlagen des Fruktosestoffwechsels**

Fruktose ist ein Monosaccharid, das natürlicherweise in Obst, Gemüse und Honig vorkommt und aufgrund seiner hohen Süßkraft, als auch aufgrund ihrer geringen Kosten sowie ihrer Fähigkeit allgemeine Qualitätsmerkmale des Endprodukts zu verbessern, häufig in der Lebensmittelindustrie eingesetzt wird [1]. Des Weiteren kommt Fruktose auch als Teil eines Disaccharids, Saccharose, mit Glukose im Verhältnis von 1:1 vor [2]. Sie spielt insbesondere als Bestandteil von Saccharose sowie in Form von Maissirup mit hohem Fruktosegehalt (high-fructose corn syrup, HFCS) eine zentrale Rolle in der industriellen Lebensmittelproduktion. So wurde vor allem in den USA Saccharose in den letzten Jahrzehnten zunehmend durch das kostengünstigere HFCS ersetzt [3]. HFCS ist eine Mischung aus Fruktose und Glukose, wobei verschiedene Formulierungen erhältlich sind, die je im Fruktosegehalt variieren. Die gebräuchlichsten Varianten sind HFCS-42 (42% Fruktose und 58% Glukose), HFCS-55 (55% Fruktose und 45% Glukose) und HFCS-90 (90% Fruktose und 10% Glukose) [4], [5], [6]. Während in den Vereinigten Staaten HFCS aufgrund seiner wirtschaftlichen Vorteile häufig anstelle von Saccharose verwendet wird, ist der Konsum in den meisten europäischen Ländern vergleichsweise gering [7], [8]. Die Weltgesundheitsorganisation empfiehlt die Aufnahme von freiem Zucker idealerweise auf weniger als 5 – 10 % der Gesamtenergieaufnahme zu begrenzen [9]. Dennoch liegt die durchschnittliche Zuckeraufnahme in vielen Ländern, darunter die USA, Lateinamerika und Europa, über den empfohlenen Grenzwerten, was gesundheitliche Implikationen nach sich ziehen kann [10].

### **1.1.1. Absorption und Metabolismus**

#### **Aufnahme, Verteilung**

Fruktose wird, wie andere Nährstoffe auch, im Dünndarm aufgenommen [8]. Wird Fruktose als Teil von Saccharose aufgenommen, wird sie zunächst von bürstensaumständigen Saccharasen (Glukosidasen) in ihre Bausteine, Glukose und Fruktose, hydrolysiert [11], [12]. Die Aufnahme und der Transport von Fruktose erfolgen hauptsächlich durch erleichterte Diffusion über Glukosetransporter (GLUTs), die sich auf beiden Seiten der Enterozytenmembran befinden. Die Absorption von Fruktose erfolgt durch GLUT5, das sich auf der apikalen Membran des Enterozyten befindet [7] und ist im Gegensatz zu Glukose, welche aktiv durch den Natrium-Glukose-Cotransporter 1 (SGLT1) unter Energieaufwand absorbiert wird, ein insulin- und natriumunabhängiger Prozess ohne Adenosintriphosphat (ATP)-Verbrauch [10]. Ein Teil der Fruktose wird in den Enterozyten direkt in Glukose metabolisiert. Wenn jedoch große Mengen

Fruktose konsumiert werden, gelangt Fruktose in die Leber und den Dickdarm. Die Leber stellt den primären Ort des Fruktosestoffwechsels dar. Fruktose kann jedoch auch von der Niere, dem Skelettmuskel und dem Fettgewebe verstoffwechselt werden [10].

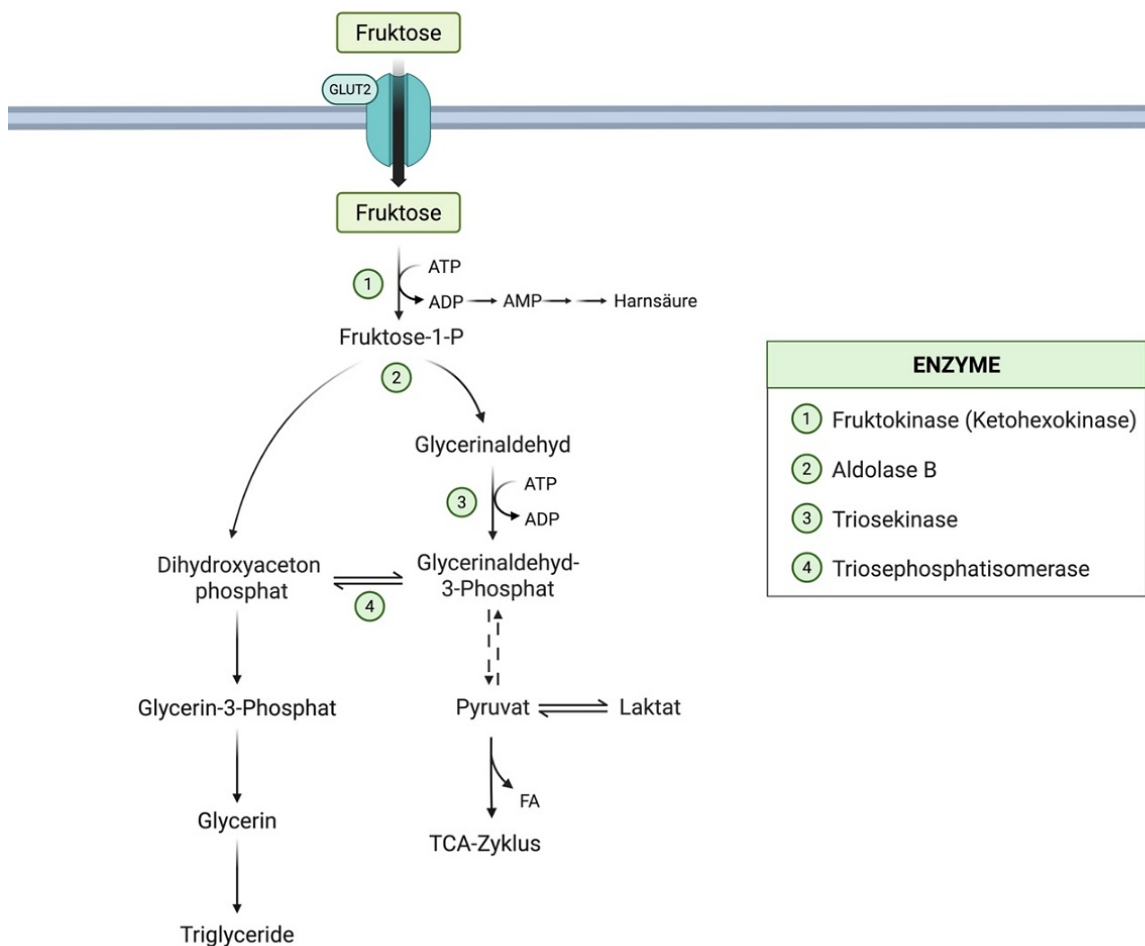
Der Transport in den portalen Blutkreislauf erfolgt durch GLUT2, das sich auf der basolateralen Membran der Enterozyten befindet [7]. Die Fruktosekonzentrationen im peripheren Plasma liegen bei gesunden Erwachsenen typischerweise bei etwa 0,04 mM und können nach dem Konsum von Fruktose akut auf um das 10-fache ansteigen [13], [14]. Während der Transporter GLUT5, der eine hohe Affinität für Fruktose hat, im Dünndarm, in den Nieren, im Fettgewebe, der Skelettmuskulatur und auch im Gehirn stark exprimiert wird, kommt er in der Leber jedoch kaum vor. Daher wird der Fruktosetransport dort in erster Linie durch GLUT2 vermittelt [8].

### **Stoffwechsel**

Der Fruktosestoffwechsel beginnt im Dünndarm, der eine zentrale Rolle in der Fruktoseverarbeitung spielt [15]. Alle fruktolytischen Enzyme werden im Dünndarm, besonders im Jejunum, stark exprimiert. Dort werden auch die höchsten GLUT5-Werte beobachtet. Ähnlich wie bei GLUT5 steigt bei Aufnahme von Fruktose auch die intestinale Expression fruktolytischer und glukogener Enzyme, abhängig von der GLUT5 und Kethexokinase -Aktivität [16]. Bei niedriger Fruktosezufuhr (<0,5 g/kg) kann der Darm etwa 90 % der aufgenommenen Fruktose verstoffwechseln und hauptsächlich in Glukose und organische Säuren umwandeln, wodurch nur geringe Mengen in den portalen Kreislauf gelangen [7], [15]. Die Kapazität zur Fruktoseaufnahme bei gesunden Erwachsenen variiert zwischen <5 g und >50 g pro Portion. Wird diese Kapazität überschritten, gelangt überschüssige Fruktose in die Leber [15]. Eine hohe Fruktoseaufnahme (≥1 g/kg) kann zudem gastrointestinale Beschwerden wie Blähungen, Bauchschmerzen und Durchfall verursachen [7]. Daher stellt der Dünndarm nicht nur einen Ort für die Absorption und Verstoffwechselung von Fruktose dar, sondern fungiert auch als Barriere, um zu verhindern, dass große Mengen an Fruktose in die Leber gelangen, was potenziell toxische Auswirkungen hätte [15].

Der Fruktosestoffwechsel in der Leber (Abbildung 1) unterscheidet sich grundlegend vom Glukosestoffwechsel, obwohl beide Zucker strukturell ähnlich sind [8]. Während Glukose durch die Glukokinase (GK) zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert wird, wird Fruktose durch die Kethexokinase (KHK), unter ATP-Verbrauch, zu Fruktose-1-Phosphat (F1P) phosphoryliert [15], [17]. KHK liegt in zwei Isoformen vor: KHK-A, die ubiquitär exprimiert wird, und KHK-C, die vor allem in der Leber, dem Darm und den Nieren vorkommt und eine hohe Affinität für Fruktose besitzt [10]. Die Phosphorylierungsrate von KHK ist etwa 10-mal höher als die von GK. Diese schnelle Phosphorylierung führt dazu, dass Fruktose bevorzugt in die Leber aufgenommen und

metabolisiert wird, da KHK-C keine negative Rückkopplungshemmung besitzt [10], [18]. Die unregulierte Fruktolyse in der Leber ermöglicht bei hoher Fruktosezufuhr eine schnelle Anreicherung von Hexose- und Triosephosphaten, wodurch zentrale Kohlenstoffstoffwechselwege vermehrt mit Substraten versorgt werden können [16].



**Abbildung 1: Fruktosestoffwechsel in der Leber**

Fruktose wird in der Leber zu Fruktose-1-phosphat (F1P) phosphoryliert und durch Aldolase B in Glycerinaldehyd und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) gespalten. Diese Metabolite werden in Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) überführt und in die Glykolyse, Glukoneogenese, Lipogenese oder Triglyceridsynthese eingeschleust [19], [20], [21], [22]. GLUT2: Glukosetransporter 2; ADP: Adenosindiphosphat; ATP: Adenosintriphosphat; AMP: Adenosinmonophosphat; Fruktose-1-P: Fruktose-1-Phosphat; FA: Fettsäuren; TCA-Zyklus: Tricarbonsäurezyklus. Erstellt in <https://BioRender.com>

Nach der Phosphorylierung wird F1P durch das Enzym Aldolase B in Glycerinaldehyd und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) gespalten [16], [19], [20]. Beide Metabolite können in einer weiteren Reaktion zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) phosphoryliert werden. DHAP und GAP stellen dabei zentrale intermediäre Verbindungen dar, die sowohl in die Glykolyse als auch in die Glukoneogenese eingeschleust werden können [19], [21]. DHAP kann zudem reversibel durch die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase in Glycerin-3-phosphat überführt werden. Dieser Metabolit dient als Vorstufe in der de-novo-Lipogenese (DNL), wodurch die Synthese freier

Fettsäuren und Triglyceride ermöglicht wird [19], [20], [21], [22]. GAP kann wiederum zu Pyruvat abgebaut werden, das anschließend entweder zu Laktat reduziert und in den systemischen Kreislauf abgegeben oder zu Acetyl-CoA oxidiert wird. Acetyl-CoA fungiert als zentraler Metabolit in der Lipogenese, der Triglyceridbiosynthese sowie im Tricarbonsäurezyklus (TCA-Zyklus) [20], [21], [22].

Ein Überschuss an Fruktose kann aufgrund der fehlenden Rückkopplungshemmung zu einer Überproduktion metabolischer Zwischen- und Endprodukte führen, die typischerweise an der Glykolyse, der Lipogenese und der Triglyceridsynthese beteiligt sind, und somit zur Entstehung metabolischer Störungen beitragen können [20], [21].

## **1.2. Das menschliche Immunsystem und bakterielle Erreger**

### **1.2.1. Grundlagen des angeborenen Immunsystems**

Das Immunsystem des Menschen stellt ein hochkomplexes Abwehrsystem dar, das den Körper vor Pathogenen schützt. Es besteht aus zwei Hauptkomponenten: dem angeborenen Immunsystem, das eine schnelle und unspezifische erste Verteidigungslinie bildet, und dem adaptiven Immunsystem, das spezifische, langanhaltende Immunantworten vermittelt. Das angeborene Immunsystem umfasst physikalische Barrieren wie Haut und Schleimhäute, lösliche Proteine und bioaktive kleine Moleküle, wie Komplementproteine und Zytokine sowie eine Vielzahl von Immunzellen, darunter Granulozyten und Monozyten sowie die sich aus ihnen differenzierenden Makrophagen. Eine entscheidende Funktion dieser Immunzellen besteht in der Erkennung und Eliminierung von Pathogenen [23]. Hierbei spielen Mustererkennungsrezeptoren (Pattern Recognition Receptors, PRRs), die auf Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert werden, eine zentrale Rolle. Zu den wichtigsten PRRs gehören die Toll-like Rezeptoren (TLRs), welche konservierte molekulare Strukturen von Mikroorganismen erkennen, sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) [24], [25]. Die Bindung eines PAMPs an einen TLR führt zur Aktivierung von intrazellulären Signalwegen, die eine proinflammatorische Immunantwort auslösen. Dies geschieht durch die Induktion von Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$ , die eine entscheidende Rolle in der Immunabwehr spielen [26].

### **1.2.2. Bakterielle Infektionen und grampositive Bakterien: Struktur und Pathogenität**

Bakterielle Infektionen stellen weiterhin eine globale Belastung für das Gesundheitssystem dar. Im Jahr 2019 waren sie für jeden achten Todesfall verantwortlich und machten somit 13,6% aller Todesfälle weltweit aus. Mit insgesamt 13,7 Millionen Todesfällen stellten bakterielle Infektionen

2019 die zweithäufigste Todesursache dar. Davon konnten 7,7 Millionen Todesfälle mit 33 bakteriellen Erregern in Verbindung gebracht werden und lediglich fünf dieser untersuchten bakteriellen Krankheitserreger (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa*) waren für etwa 54,9% der Todesfälle verantwortlich [27].

Der Einsatz konventioneller Antibiotika zur Behandlung bakterieller Infektionen verliert aufgrund der zunehmenden Resistenzbildung von Bakterien seine Wirkung. Antimikrobiell resistente und multiresistente Bakterien treten zunehmend auf und stellen ein immer größer werdendes Problem dar [28], [29]. Schätzungen zufolge konnten 2021 4,71 Millionen Todesfälle mit antimikrobiell resistenten Bakterien in Verbindung gebracht werden, darunter 1,14 Millionen Todesfälle, die direkt auf bakterielle antimikrobielle Resistenz zurückzuführen waren [30].

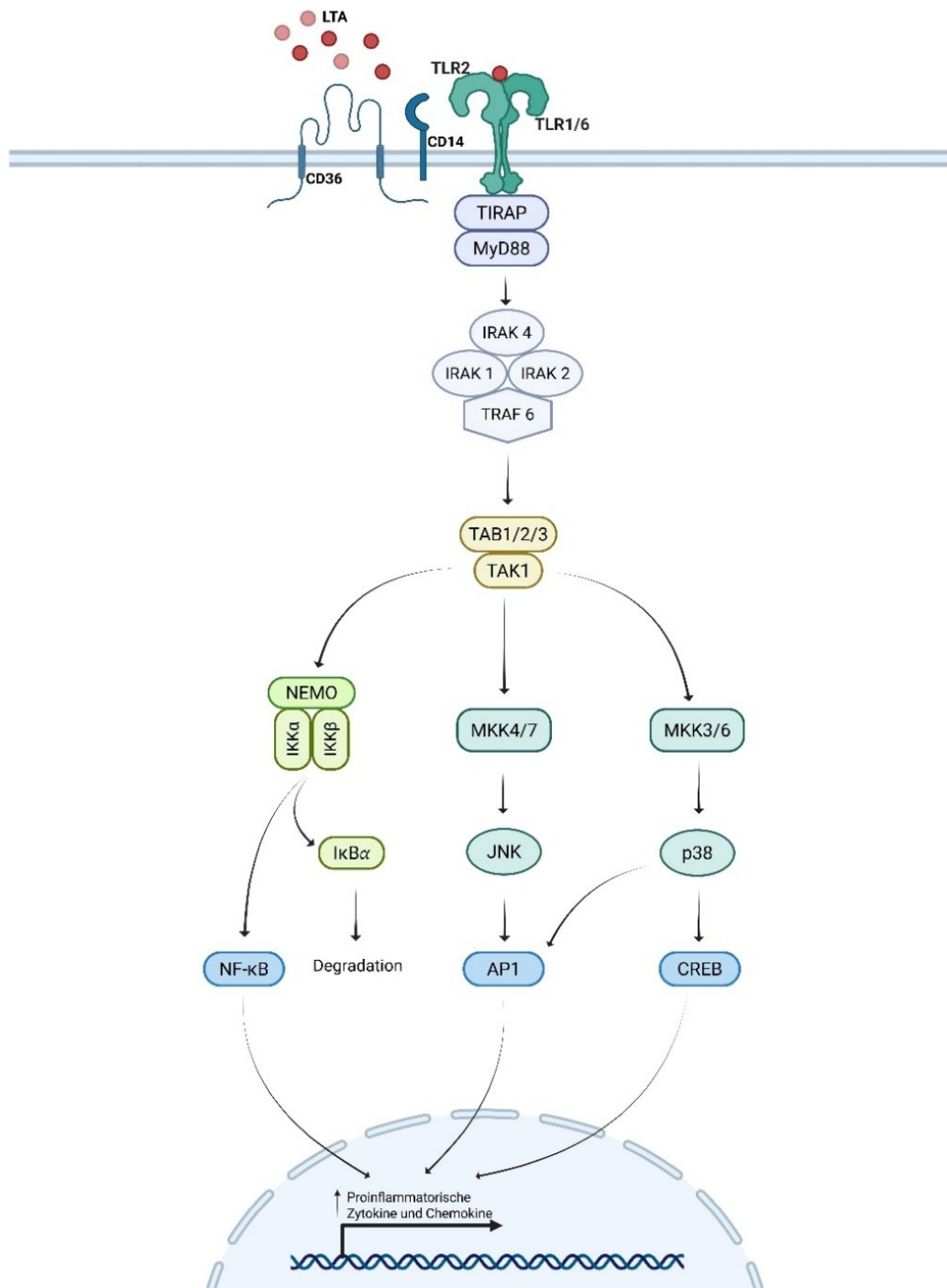
Zu den besonders problematischen Bakterien zählt *Staphylococcus aureus*, ein grampositives Bakterium, das 2019 für mehr als 1 Millionen Todesfälle verantwortlich war [27]. Grampositive Bakterien besitzen eine komplexe, mehrschichtige Zellhülle, die ihnen Schutz vor externen Einflüssen bietet [31]. Diese Zellhülle besteht aus zwei Hauptstrukturen: einer zytoplasmatischen Lipiddoppelschichtmembran und einer darüber liegenden Zellwand [32]. Die Lipidmembran enthält meist große Mengen an Phosphatidylglycerol und Cardiolipin sowie zahlreiche Transmembranproteine und Lipoproteine, die an der Synthese der Zellhülle, dem Transport von Zellhüllenvorläufern oder dem Export toxischer Substanzen beteiligt sind [31]. In der Zellmembran sind zudem Lipoteichonsäuren (LTA) verankert, ein wichtiges anionisches Polymer, das zusammen mit Wandteichonsäuren (WTA) die Zellwandstruktur verstärkt [31], [33]. Die Zellwand selbst wird von einer dicken Schicht Peptidoglykan (auch Murein oder Sacculus genannt) gebildet [32], welche 30 bis 100 nm dick sein kann [33]. Dieses Peptidoglykan besteht aus  $\beta$ -1,4-verknüpften Disaccharideinheiten von N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure, die über Peptidseitenketten netzartig verknüpft sind [31], [33]. Darüber hinaus sind Peptidoglykanschichten kovalent mit Wandteichonsäuren sowie Kapselpolysacchariden verbunden [31]. Die Kapsel stellt die äußerste Schicht vieler grampositiver Bakterien dar und besteht meist aus Polysacchariden oder Polypeptiden, die das Bakterium in einer dicken, amorphen Schicht umhüllen [31], [33].

### **1.2.3. Toll-like Rezeptoren und deren Rolle im angeborenen Immunsystem**

Das angeborene Immunsystem verfügt über die Fähigkeit, Bestandteile pathogener Mikroorganismen über PRRs wie die TLRs zu erkennen. Beim Menschen sind bislang zehn verschiedene TLRs identifiziert worden [24], [34], [35]. TLRs sind integrale Transmembran-

Glykoproteine, die sich aus drei funktionellen Domänen zusammensetzen: einer extrazellulären Ektodomäne mit leucinreichen Wiederholungssequenzen (leucine-rich repeats, LRRs), welche die Erkennung von PAMPs vermittelt, einer Transmembrandomäne sowie einer zyttoplasmatischen Toll/IL-1-Rezeptor-(TIR)-Domäne, die die intrazelluläre Signalweiterleitung initiiert [24], [26], [35], [36]. Die Ektodomäne von TLRs besitzt eine charakteristische hufeisenförmige Struktur. Die PAMP-Erkennung erfolgt meist durch Homo- oder Heterodimerisierung des TLRs in Kombination mit Korezeptoren oder akzessorischen Molekülen [35], [36]. Nach Ligandenbindung rekrutieren TLRs TIR-Domänen-haltige Adapterproteine wie MyD88 (Myeloid Differentiation Primary Response 88) oder TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ) [26], [35]. Diese aktivieren nachgeschaltete Signaltransduktionskaskaden, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B), IRFs (interferon regulatory factors) oder MAP-Kinasen (mitogen-activated protein kinases) führen. In der Folge werden proinflammatorische Zytokine, Chemokine sowie Typ-I-Interferone exprimiert, die eine effektive Abwehr gegen Mikroorganismen vermitteln [26], [34], [35].

Bei der Immunantwort auf grampositive Bakterien (Abbildung 2) spielt besonders der TLR2 eine zentrale Rolle. TLR2 wird in einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert, darunter Immunzellen (z.B. Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen), aber auch Endothel- und Epithelzellen [24], [36], [37]. Nach der Erkennung und Bindung eines Liganden bildet TLR2 entweder ein Homo- oder Heterodimer, was die nachgeschaltete Signaltransduktion initiiert. In der Regel geht TLR2 Heterodimere mit TLR1 oder TLR6 ein, abhängig von der molekularen Struktur des Liganden. Das TLR2/1-Heterodimer erkennt bevorzugt triacylierte Lipopeptide, die hauptsächlich in gramnegativen Bakterien vorkommen [37], [38]. Die Dimerisierung mit TLR6 erfolgt hingegen in Reaktion auf diacylierte Lipopeptide, wie Lipoteichonsäuren aus grampositiven Bakterien [24], [37], [38], [39]. Seltener erfolgt eine Dimerisierung mit TLR10. Darüber hinaus existieren Hinweise darauf, dass TLR2 auch als Homodimer oder sogar als Monomer fungieren kann, wobei die Rolle von TLR2 als Homodimer bislang nicht eindeutig erforscht ist [38]. An der Ligandenpräsentation sind zusätzlich Korezeptoren wie das Glykoprotein CD14 und der Rezeptor CD36 beteiligt. Der Korezeptor CD14 erleichtert die Präsentation des Liganden an den TLR2/6-Komplex und verstärkt so dessen Aktivierung [40]. Besonders für die Bindung von LTA ist, dass zusätzlich der Korezeptor CD36 in ähnlicher Weise wie CD14, an der Bildung und Funktionalität des Rezeptorkomplexes beteiligt ist [24], [39], [41].



**Abbildung 2: TLR2-Signalkaskade**

Nach Bindung von LTA an das TLR-Heterodimer, vermittelt durch Korezeptoren wie CD14 und CD36, erfolgt eine Aktivierung der intrazellulären TIR-Domäne [24], [38], [39], [40], [41]. Diese rekrutiert über MAL das Adapterprotein MyD88, woraufhin ein Komplex aus den Kinasen IRAK1/2/4 gebildet wird [26], [36], [42], [43]. Der nachgeschaltete Signalweg aktiviert über TRAF6 und TAK1 sowohl den NF-κB- als auch den MAPK-Signalweg [26], [35], [36]. Dies führt zur Aktivierung inflammatorischer Transkriptionsfaktoren (NF-κB, AP-1, CREB) und zur Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF-α, IL-1β und IL-6 [35], [36], [40], [42].

LTA: Lipoteichonsäure; CD: Cluster of differentiation; TLR: Toll-like receptor; TIRAP: TIR-Domäne enthaltendes Adaptermolekül; MYD88: Myeloid Differentiation Primary Response 88; IRAK: IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase; TRAF6: TNF receptor-associated factor 6; TAB: TAK1-binding protein; TAK1: Transforming growth factor-beta activated kinase 1; NEMO: NF-κB essential modulator; IKK: IκB kinase; NF-κB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; MKK: Mitogen kinase kinase; JNK: c-Jun N-terminal kinase; AP1: Activator protein-1; CREB: cAMP response element-binding protein. Erstellt in <https://BioRender.com>

Die Ligandenbindung an den TLR2/6-Komplex löst vermutlich eine Konformationsänderung aus, welche die intrazelluläre TIR-Domäne von TLR2 aktiviert. Über homotypische TIR-TIR-Wechselwirkungen werden nach aktuellem Kenntnisstand die Adapterproteine MyD88 und das MyD88-Adapter-like-Protein (MAL), auch bekannt als TIRAP (TIR domain containing adaptor protein), rekrutiert [26], [42]. MAL fungiert dabei offenbar als Brückenmolekül zwischen TLR2 und MyD88 und erleichtert so die Signalweiterleitung [44]. Nach Bindung rekrutiert MyD88 die IL-1-Rezeptor-assoziierten Kinasen (IRAK): IRAK4, IRAK1 und IRAK2. Diese bilden zusammen mit MyD88 einen Komplex, der als Myddosom bezeichnet wird. Es wird angenommen, dass IRAK4 durch MyD88 aktiviert wird und anschließend IRAK1 und IRAK2 phosphoryliert, die sich daraufhin an mehreren Stellen autophosphorylieren [26], [36], [43]. Im nächsten Schritt bindet IRAK1 an den E3-Ubiquitin-Ligase TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6). Gemeinsam mit den Ubiquitin-konjugierenden Enzymen UBC13 und UEV1A katalysiert TRAF6 die K63-gebundene Polyubiquitinierung von sich selbst und des TAK1-Komplexes (Transforming growth factor-beta activated kinase 1) [35], [36]. TAK1 ist ein Mitglied der MAPKKK-Familie (mitogen-activated protein kinase kinase kinase) und bildet mit den Adapterproteinen TAB (TAK1-binding protein) 1, TAB2 und TAB3 einen aktivierbaren Proteinkomplex, der durch die Bindung an Polyubiquitinketten aktiviert wird [26], [35].

Das aktivierte TAK1-Protein induziert zwei zentrale Signalwege: den NF- $\kappa$ B- und den MAPK-Signalweg [26], [35], [36]. Der NF- $\kappa$ B-Weg wird über die Phosphorylierung des IKK-Komplexes aktiviert, was zum Abbau des Inhibitorproteins I $\kappa$ B $\alpha$  und zur Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern führt. Dort reguliert NF- $\kappa$ B die Transkription zahlreicher inflammatorischer Gene [26], [35], [36]. Parallel aktiviert TAK1 über MAPK-Kinasen Mitglieder der MAPK-Familie wie JNK (c-Jun N-terminal kinase), p38 und ERK (extracellular-signal regulated kinases) 1/2, die wiederum Transkriptionsfaktoren wie AP-1 (Activator protein-1) und CREB (cAMP response element-binding protein) aktivieren und so ebenfalls zur Expression entzündungsrelevanter Gene beitragen [35], [36].

Die kombinierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B und AP-1 resultiert in der verstärkten Expression proinflammatorischer Mediatoren wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 sowie Chemokinen wie IL-8. Diese fördern die Rekrutierung und Aktivierung weiterer Immunzellen, wie neutrophile Granulozyten und Makrophagen, und stellen einen essenziellen Bestandteil der ersten Abwehrlinie gegen grampositive bakterielle Infektionen dar [26], [36], [40], [42].

### **1.3. Fruktose und das Immunsystem: Modulation und potentielle Auswirkungen auf Infektionskrankheiten**

In den vergangenen Jahren ist das wissenschaftliche Interesse an der Wechselwirkung zwischen Ernährung und Immunfunktion deutlich gestiegen. Studien zeigen, dass die westliche Ernährungsweise nicht nur mit der Entstehung metabolischer Erkrankungen assoziiert ist, sondern auch den Immunstatus moduliert und sowohl an der Pathogenese als auch am Verlauf einer Sepsis beteiligt sein kann [45]. Insbesondere ein übermäßiger Konsum von Fruktose, wie er typischerweise in westlichen Ernährungsformen erfolgt, wird zunehmend mit der Entstehung metabolischer Erkrankungen wie Adipositas, Insulinresistenz, Typ-2-Diabetes und mit metabolischer Dysfunktion assoziierter steatotischer Lebererkrankung (MASLD) in Verbindung gebracht [2], [8], [15], [46], [47]. Diese Erkrankungen sind ihrerseits mit einem chronisch niedriggradigen Entzündungszustand verbunden. Dabei befindet sich das angeborene Immunsystem in einem Zustand, indem es dauerhaft aktiviert ist, was allmählich zu Immunseneszenz führen kann [48], [49], [50], [51].

Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass Menschen mit metabolischen Störungen nicht nur ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen tragen, sondern auch anfälliger für bakterielle Infektionen sind, z.B. für Harnwegsinfekte, Lungenentzündungen oder postoperative Wundinfektionen [52], [53], [54], [55]. Ein übermäßiger Konsum von Fruktose kann möglicherweise dazu führen, dass Fruktose und ihre Metabolite (z.B. Urat, Laktat, freie Fettsäuren) eine Umprogrammierung immunologischer Signalwege in Immunzellen wie Monozyten und Makrophagen auslösen, welche letztlich in einer übermäßigen Produktion proinflammatorischer Zytokine (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) und gleichzeitig beeinträchtigter Pathogenabwehr führen [56], [57]. Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigten bereits eine erhöhte mRNA-Expression von TLR2, TLR4 und MYD88 in humanen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) nachdem Probanden hohe Mengen an Fruktose aufgenommen haben [58]. Auch in weiteren Studien in Tiermodellen und in humanen Zellkulturen (v.a. Monozyten und dendritische Zellen) führt Fruktose zu einer gesteigerten Aktivität von TLR2 und TLR4 sowie zu einer mTORC1-vermittelten Hochregulation translationaler Prozesse, die die Immunantwort auf bakterielle Liganden wie Lipopolysaccharide (LPS) deutlich verstärken können [56], [59].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es Hinweise darauf gibt, dass ein hoher Fruktosekonsum über metabolische Dysfunktion nicht nur Entzündungsprozesse fördern kann, sondern möglicherweise auch direkt in immunologische Signalwege eingreift, z.B. über TLR2. Die

zugrunde liegenden Mechanismen und potenziellen Folgen sind bislang jedoch nicht abschließend geklärt und bedürfen weiterer Forschung.

#### **1.4. Fragestellung und Zielsetzung**

Ein übermäßiger Fruktosekonsum wird zunehmend mit der Entstehung metabolischer Erkrankungen wie Adipositas, Typ-2-Diabetes und MASLD in Verbindung gebracht [8], [15], [46], [47], [60]. Diese Erkrankungen gehen wiederum häufig mit einem erhöhten Infektionsrisiko einher [52], [53], [54], [55], was auf eine mögliche Beeinflussung der Immunfunktion durch Fruktose hindeutet. Tatsächlich gibt es mehrere Hinweise darauf, dass Fruktose immunmodulatorische Effekte in verschiedenen Zelltypen ausüben kann, wie unter anderem von Cheng et al. [61] in einem Review dargestellt wurde. Die genauen molekularen Mechanismen dieser Effekte sind bislang jedoch nur unzureichend verstanden.

Nier et al. [58] zeigten bereits, dass ein erhöhter Fruktosekonsum in PBMCs zu einer signifikanten Hochregulation der TLR2-mRNA führt, während Glukose diesen Effekt nicht hervorrief. TLR2 spielt eine zentrale Rolle in der angeborenen Immunantwort, insbesondere bei der Erkennung grampositiver bakterieller Komponenten wie LTA [24], [36]. Der Transkriptionsfaktor SP1 ist an der Regulation der TLR2-Expression beteiligt und interagiert zudem mit weiteren immunrelevanten Signalwegen wie NF- $\kappa$ B [62], [63].

Ausgehend von diesen Erkenntnissen war das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluss von Fruktose auf die TLR2-vermittelte Immunantwort näher zu charakterisieren und potenzielle Regulationsmechanismen durch SP1 zu untersuchen. Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob eine Inhibition von SP1 die zelluläre Reaktion auf eine LTA-Stimulation beeinflusst.

Im Rahmen dieser Masterarbeit werden daher folgende Fragestellungen untersucht:

1. Wie beeinflusst Fruktose die TLR2-vermittelte Immunreaktion in humanen Monozyten?
2. Führt die Inhibition von SP1 zu einer veränderten Sensitivität gegenüber einer LTA-vermittelten Stimulation?

## 2. Materialien

### 2.1. Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte

|                                                        |                                                     |
|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Destilliertes Wasser                                   | Laborbestand                                        |
| Zentrifugenröhren, 15mL, 50mL (Falcon)                 | SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland        |
| Feinwaage                                              | VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland      |
| Eisbereiter FM-120KE-50-HC                             | Hoshizaki Europe B.V. – HQ, Amsterdam, Niederlande  |
| Glastrichter                                           | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Rotiprotect® Nitril-Handschuhe                         | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| StarGuard® Nitril-Handschuhe                           | Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland                  |
| Glasflasche Simax                                      | Zeller GmbH, Hohenems, Österreich                   |
| Becherglas                                             | Laborbestand                                        |
| Magnetrührer PCE-MSR 100                               | PCE Deutschland GmbH, Meschede, Deutschland         |
| Magnetrührstäbchen ROTILABO®                           | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| pH Meter Orion Model 420A                              | Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA          |
| Omnifix Luer Lock Solo                                 | B. Braun Austria GmbH, Maria Enzersdorf, Österreich |
| Syringe Filter, 0,22 µm                                | Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland                  |
| Messzylinder                                           | BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland           |
| Pipettenspitzen, 1000 µL, 200 µL, 100 µL, 20 µL, 10 µL | Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland        |
| Vortex Laborschüttler                                  | Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland       |
| Reaktionsgefäßständer -ROTILABO®                       | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Röhrchengestell                                        | Laborbestand                                        |
| Laborstift                                             | VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland      |
| Labortücher - Kimtech                                  | Kimberly-Clark GmbH, Koblenz, Deutschland           |
| Mikroreaktionsgefäße                                   | Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland        |
| Zentrifuge Z 216 MK / Zentrifuge Z 446 K               | Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland     |
| Stoppuhr                                               | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Mehrkanalpipette Research Plus® (100 µL, 300 µL)       | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                  |
| Mixing Block MB - 102                                  | Hangzhou Bioer Technology Co., Hangzhou, China      |
| Pufferwanne Kunststoff                                 | VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland      |

|                                                                         |                                                            |
|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Research Plus® Pipetten (2,5 µL, 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL) | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                         |
| Schere                                                                  | Laborbestand                                               |
| Serologische Pipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)                              | SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland               |
| TipOne Filterspitzen                                                    | STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland           |
| Vortex REAX 2000                                                        | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland |
| Wasserbad                                                               | Köttermann GmbH, Uetze, Deutschland                        |
| Wiegeschalen                                                            | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland            |
| Pipettierhilfe                                                          | DLAB Scientific Inc., Beijing, China                       |

## 2.2. Fruktose-Messung im Plasma

### Chemikalien/Lösungen

|                                   |                                      |
|-----------------------------------|--------------------------------------|
| Abnova Fructose Assay Kit, KA1668 | Abnova GmbH, Heidelberg, Deutschland |
|-----------------------------------|--------------------------------------|

### Verbrauchsmaterialien und Geräte

|                                   |                                                          |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------------|
| SpectraMax M3 Multi-Mode          | Molecular Devices GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland |
| 96-Well Microplates, Clear Bottom | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland         |

## 2.3. Zellisolation primärer Immunzellen

### 2.3.1. Zellisolation von PBMC's

#### Chemikalien/Lösungen

|                                             |                                        |
|---------------------------------------------|----------------------------------------|
| Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) | Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA     |
| Pancoll                                     | PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland    |
| TRIzol G <sup>TM</sup> Trizol               | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |

### Verbrauchsmaterialien und Geräte

|                                         |                                                     |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Mikroskop                               | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland       |
| Sicherheitswerkbank Heraeus Typ HS 12/2 | Deutschland Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland |

### 2.3.2. Zellisolation von Monozyten

#### Chemikalien/Lösungen

|                                             |                                                            |
|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Buffy-Coat                                  | Rotes Kreuz, Blutspendezentrale, Wien, Österreich          |
| Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) | Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA                         |
| Monocyte Spin Medium (pluri-spin)           | Pluriselect Life Science UG & Co. KG, Leipzig, Deutschland |
| Penicillin-Streptomycin                     | PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland                        |
| FBS Good                                    | PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland                        |
| RPMI-1640 Medium, R8758                     | Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA                         |
| Trypan Blau 0,5%                            | Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA                         |

#### Verbrauchsmaterialien und Geräte

|                                         |                                                            |
|-----------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Neubauer Zählkammer                     | VWR International GmbH, Wien, Österreich                   |
| Mikroskop                               | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland              |
| pluriMate® II Zentrifugenröhren, 15mL   | pluriSelect Life Science UG & Co. KG, Leipzig, Deutschland |
| Sicherheitswerkbank Heraeus Typ HS 12/2 | Deutschland Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland        |
| CO <sub>2</sub> Incubator MCO-17AIC-PE  | PHC Holdings Corporation, Tokyo, Japan                     |
| Zellkultur Suspensionsplatte (24 Well)  | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland                   |

### 2.3.3. Zellisolation von T- und B-Lymphozyten

#### Chemikalien/Lösungen

|                                 |                                                            |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Buffy-Coat                      | Rotes Kreuz, Blutspendezentrale, Wien, Österreich          |
| RPMI-1640 Medium ohne Phenolrot | Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA                         |
| Percoll™                        | Cytiva Sweden AB, Uppsala, Sweden                          |
| EDTA-Solution pH 8,0 (0,5 M)    | PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt, Deutschland     |
| Penicillin-Streptomycin         | PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland                        |
| RPMI-1640 Medium                | Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA                         |
| FBS Good                        | PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland                        |
| 10x PBS                         | pluriSelect Life Science UG & Co. KG, Leipzig, Deutschland |

## Verbrauchsmaterialien und Geräte

|                                         |                                                     |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Sicherheitswerkbank Heraeus Typ HS 12/2 | Deutschland Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland |
| CO <sub>2</sub> Incubator MCO-17AIC-PE  | PHC Holdings Corporation, Tokyo, Japan              |

## 2.4. Stimulation der Immunzellen

### Chemikalien/Lösungen

|                                                                |                                                                   |
|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| D(-)-Fruktose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland                   |
| Mithramycin A                                                  | Cayman Chemical, Michigan USA                                     |
| Lipoteichonsäure (LTA)                                         | Merck Life Science UK Limited, Gillingham, Vereinigtes Königreich |
| TRIzol G <sup>TM</sup> (Trizol)                                | PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt, Deutschland            |
| Penicillin-Streptomycin                                        | PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland                               |
| RPMI-1640 Medium                                               | Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA                                |
| FBS Good                                                       | PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland                               |

## Verbrauchsmaterialien und Geräte

|                                         |                                                     |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Sicherheitswerkbank Heraeus Typ HS 12/2 | Deutschland Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland |
| CO <sub>2</sub> Incubator MCO-17AIC-PE  | PHC Holdings Corporation, Tokyo, Japan              |

## 2.5. mRNA-Expression

### 2.5.1. RNA-Isolation

#### Chemikalien/Lösungen

|                                                       |                                                 |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Chloroform (CHCl <sub>3</sub> ) ≥ 99,5%               | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Ethanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O) ≥ 99,8%     | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Isopropanol (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O) ≥ 99,5% | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Nuklease-freies Wasser Autoklaviert, DEPC-behandelt   | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| TRIzol G <sup>TM</sup> Trizol                         | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland          |

### 2.5.2. cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

#### Chemikalien/Lösungen

|                                  |                                   |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| Reverse Transcription System Kit | Promega Cooperation, Madison, USA |
|----------------------------------|-----------------------------------|

#### Verbrauchsmaterialien und Geräte

|                                      |                                                |
|--------------------------------------|------------------------------------------------|
| DLAB Mini Zentrifuge Typ D1008       | DLAB Scientific Co., Ltd., Beijing, China      |
| LifeECO Thermal cycler               | Hangzhou Bioer Technology Co., Hangzhou, China |
| Multiply® µStrip Pro 8-strip, 0,2 µL | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland       |

### 2.5.3. Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion

#### Chemikalien/Lösungen

|                                                                                                  |                                           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| iTaq™ Universal SYBR® Green                                                                      | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA |
| Nuklease-freies Wasser                                                                           | Promega Cooperation, Madison, USA         |
| Primer (forward, reverse): 18S, GLUT5, TLR2, TNF-α, IL-6, IL-1β, SP1 (Sequenzen siehe Tabelle 8) | Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland |

#### Verbrauchsmaterialien und Geräte

|                                      |                                                 |
|--------------------------------------|-------------------------------------------------|
| CFX Connect™ Real- Time System       | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA       |
| DLAB Mini Zentrifuge Typ D1008       | DLAB Scientific Co., Ltd., Beijing, China       |
| Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA       |
| Hard Shell PCR Plates 96 well        | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA       |
| Zentrifuge Z 446 K                   | HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland |

### 2.6. Enzyme-linked Immunosorbent Assay

#### Chemikalien/Lösungen

|                                                  |                                                 |
|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Human IL-1β/IL-1F2 DuoSet® ELISA                 | R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA             |
| Human IL-6 DuoSet® ELISA                         | R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA             |
| Human TNF-α DuoSet® ELISA                        | R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA             |
| Tween® 20 (Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumchlorid (NaCl)                            | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe,             |
| Kaliumchlorid (KCl)                              | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |

|                                                                              |                                                 |
|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| di-Natriumhydrogenphosphat<br>( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )                  | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Kaliumdihydrogenphosphat<br>( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )                     | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Albumin Fraktion V (BSA)                                                     | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Stabilisierte Peroxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) Lösung<br>(Color Reagent A) | R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA             |
| Tetramethylbenzidin<br>(Color Reagent B)                                     | R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA             |
| 2N Schwefelsäure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )                                 | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |

## Verbrauchsmaterialien und Geräte

|                                                                    |                                                             |
|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Rotilabo®- Abdeckfolien für<br>Mikrotestplatten, Polyester, steril | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland             |
| SpectraMax M3 Multi-Mode                                           | Molecular Devices GmbH, Biberach an der Riß,<br>Deutschland |
| iMark™ Microplate Absorbance<br>Reader                             | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA                   |
| Thermo-Shaker PST-60 HL                                            | BioSan SIA, Riga, Lettland                                  |
| Mikrotestplatte 96-Well                                            | R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA                         |

## 2.7. Western-Blot

### Chemikalien/Lösungen

|                                                                              |                                                        |
|------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 2-β-Mercaptoethanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ )                      | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland        |
| 37% konzentrierte Salzsäure (HCl)                                            | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland        |
| Acrylamid/Bis (30%) ( $\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$ )                      | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland        |
| Ammoniumpersulfat (APS)<br>( $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ )         | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland        |
| Bromphenolblau ( $\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$ ) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland        |
| 1,4-Dithiothreitol ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$ )         | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen,<br>Deutschland |
| Essigsäure 100% ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ )                         | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland        |
| Glycerol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ )                                | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen,<br>Deutschland |
| Glycin ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ )                                 | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland        |
| Magermilchpulver                                                             | PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland              |

|                                                                                                 |                                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Methanol (CH <sub>3</sub> OH)                                                                   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| Natriumchlorid (NaCl)                                                                           | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)<br>(NaC <sub>12</sub> H <sub>25</sub> SO <sub>4</sub> )              | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Ponceau S (C <sub>22</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>13</sub> S <sub>4</sub> )      | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Precision Plus Protein Standard                                                                 | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA           |
| Primärantikörper SP1                                                                            | Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA          |
| Primärantikörper β-Actin                                                                        | Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA          |
| Sekundärantikörper Anti-Mouse IgG<br>(HRP-linked)                                               | Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande      |
| SuperSignal™ West Dura Extended<br>Duration Substrate                                           | Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland       |
| Tetramethylethylendiamin (C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> )<br>(TEMED)            | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan<br>(Tris base )(C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Tween® 20 (Polyoxyethylen-20-<br>sorbitanmonolaurat)                                            | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |

## Verbrauchsmaterialien und Geräte

|                                                     |                                               |
|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| ChemiDoc™ Imaging Systems<br>(XRS+System)           | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA     |
| Extra Thick Blot Paper                              | Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland |
| Gel Releasers                                       | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA     |
| Impuls Schweißgerät PM-FS-200-S                     | ALLPAX GmbH + Co. KG, Papenburg, Deutschland  |
| Mini-PROTEAN® Casting Stand<br>Gaskets              | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA     |
| Mini-PROTEAN® Glass Plates                          | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA     |
| Mini-PROTEAN® Spacer Plates<br>(1,5mm)              | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA     |
| Mini-PROTEAN® System Comb 15<br>well                | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA     |
| Mini-PROTEAN® Tetra Cell Casting<br>Stands & Clamps | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA     |
| Mini-PROTEAN® Tetra Electrode<br>Assembly           | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA     |
| Mini-PROTEAN® Tetra Vertical                        | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA     |

|                                            |                                              |
|--------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Electrophoresis Cell for Mini Precast Gels | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA    |
| Multifunktionsrotor PS-M3D                 | Grant Instruments Ltd, Cambridge, UK         |
| Orbi-Blotter™                              | Benchmark Scientific Inc, Sayreville, USA    |
| Plastikkassetten                           | Laborbestand                                 |
| Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran        | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA    |
| PowerPac™ HC High-Current Power Supply     | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA    |
| Schlauchfolie zum Einschweißen             | ALLPAX GmbH + Co. KG, Papenburg, Deutschland |
| Trans Blot Turbo Transfer System           | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA    |

### 2.7.1. Proteinextraktion

#### Chemikalien/Lösungen

|                                              |                                                     |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 1,4-Dithiothreitol ( $C_4H_{10}O_2S_2$ )     | VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland      |
| 2-Propanol ( $C_3H_8O$ )                     | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Ethanol (99,5% Ph.Eur. reinst) ( $C_2H_6O$ ) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Guanidiniumchlorid ( $CH_5N_3HCl$ )          | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Harnstoff ( $CH_4N_2O$ )                     | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Protease Inhibitor Cocktail                  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| Phosphatase Inhibitor Cocktail 2             | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| Phosphatase Inhibitor Cocktail 3             | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |

## 2.8. Statistische Auswertung

#### Software

|                                   |                                         |
|-----------------------------------|-----------------------------------------|
| CFX Manager™ Software Version 3.1 | BIO-RAD Laborator Inc., Hercules, USA   |
| GraphPad Prism 7.0                | GraphPad Software, Inc., San Diego, USA |
| Microsoft Office 365              | Microsoft Corporation, Redmon, USA      |
| SoftMax Pro7 Software             | Molecular Devices GmbH, San Jose, USA   |

### 3. Methoden

#### 3.1. Humanstudien

Zusätzlich zu den selbst erhobenen Daten werden in dieser Arbeit weitere relevante Daten der eigenen Arbeitsgruppe, welche im Rahmen der ENDO-META (Effect of Monosaccharides on Intestinal Barrier Function) Studie erhoben wurden, betrachtet und diskutiert. Bei diesen Daten handelt es sich um die Fruktosekonzentration im Plasma sowie der GLUT5-mRNA-Expression in PBMCs nach Aufnahme einer fruktosereichen Diät. Die Studie ist bei ClinicalTrials.gov registriert (NCT03482284) und durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Jena (4588-11/15) genehmigt. Das Studiendesign wird im Folgenden kurz zusammengefasst. Für die Durchführung weiterer Experimente wurden zudem Monozyten aus Vollblut von Spendern isoliert, was durch die Ethikkommission der Universität Wien (Referenznummer: 00586) genehmigt wurde. Zudem wurden Monozyten und Lymphozyten aus Buffy Coats anonymer Spender isoliert, welche vom Österreichischen Roten Kreuz bezogen wurden.

##### Studiendesign

Probanden im Alter von 21 – 33 Jahren erhielten für 4 Tage eine standardisierte Diät gefolgt von einer Diät, bei der komplexe Kohlenhydrate entweder mit Fruktose oder Glukose (25 % der Gesamtenergiezufuhr) für 3 Tage ersetzt wurden. Nach der ersten Intervention folgte eine 3-wöchige Auswaschphase bevor der Ablauf mit der zweiten Intervention wiederholt wurde. Den Probanden wurde dabei zu Studienbeginn und jeweils nach Aufnahme der standardisierten Diät und der Intervention Blut abgenommen.

#### 3.2. Fruktose-Messung im Plasma

Die Fruktosekonzentration wurde im Plasma der Probanden der ENDO-META Studie einmal nüchtern und einmal postprandial, im Anschluss an die Fruktose-Intervention gemessen. Hierzu wurde ein kommerziell erhältlicher Assay verwendet der in Folge kurz beschrieben wird.

**Tabelle 1: Herstellung der Fruktose-Standardreihe**

| Standard | 1000 $\mu\text{M}$ STD ( $\mu\text{L}$ ) | H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{L}$ ) | Fruktose [ $\mu\text{M}$ ] |
|----------|------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| 1        | 100                                      | 0                                  | 1000                       |
| 2        | 60                                       | 40                                 | 600                        |
| 3        | 30                                       | 70                                 | 300                        |
| 4        | 0                                        | 100                                | 0                          |

STD (Standard)

Zunächst wurden die Plasmaproben in einem Verhältnis von 1:2 mit dH<sub>2</sub>O verdünnt. Anschließend wurde die Standardreihe vorbereitet. Dazu wurde zunächst eine 1000  $\mu\text{M}$  Stocklösung hergestellt

indem 12  $\mu\text{L}$  Standard (20 mM) mit 228  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$  verdünnt wurden. Daraus konnte dann wie in Tabelle 1 dargestellt die Standardreihe hergestellt werden. Darauffolgend wurden die verdünnten Proben und Standards in eine 96-Wellplatte pipettiert. Danach wurden je 80  $\mu\text{L}$  Farbreagenz (56  $\mu\text{L}$  Assay Puffer, 1  $\mu\text{L}$  Enzym, 14  $\mu\text{L}$  PMS-Lösung, 14  $\mu\text{L}$  MTT-Lösung) in die Wells zu den Proben und Standards vorgelegt. Nach einer einstündigen Inkubation im Dunklen bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 565 nm im Photometer gemessen. Mit Hilfe der Standardgerade ließ sich die Fruktose-Konzentration berechnen.

### **3.3. Zellisolation primärer Immunzellen**

#### **3.3.1. Zellisolation von PBMCs aus Vollblut**

Die Isolation von PBMCs erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation aus dem Vollblut der Probanden der ENDO-META-Studie. Das genaue Vorgehen ist in Nier et al. [58] beschrieben und wird im Folgenden nur kurz zusammengefasst. Zunächst wurde Pancoll (Dichte: 1,077 g/mL) in die Falcons vorgelegt und das Blut, im Verhältnis 1:1 mit DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) verdünnt, vorsichtig darauf geschichtet. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten bei 800 rcf und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die PBMCs abgenommen und in ein neues Falcon überführt. Es folgten zwei Waschschrte, wie sie unter 3.3.2 bei der Isolation von Monozyten beschrieben werden. Schließlich wurden die Zellen in TRIzol (Trizol; AppliChem) aufgenommen und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

#### **3.3.2. Zellisolation von Monozyten aus Vollblut oder Buffy-Coat**

Die Isolation humaner Monozyten erfolgte entweder aus Vollblut gesunder Spender oder aus Buffy-Coats, die vom Wiener Roten Kreuz bezogen wurden. Die Entnahme des Vollbluts erfolgte nach Einwilligung der Spender und mit Zustimmung der zuständigen Ethikkommission der Universität Wien (Referenznummer: 00586). Die Buffy-Coats wurden anonymisiert bereitgestellt.

Zunächst wurden jeweils 4,5 ml des Dichtegradientenmediums (Monocytes Spin Medium) in 15 mL pluriMate II-Falcons vorgelegt und für zehn Sekunden bei 1000 rcf zentrifugiert. Der Überstand, der über der Barriere im Falcon verblieb, wurde verworfen, und das Blut gleichmäßig auf die Falcons verteilt. Anschließend wurden die Falcons für 15 Minuten bei 800 rcf zentrifugiert, um die verschiedenen Zellfraktionen voneinander zu trennen. Das Plasma (die oberste Phase) wurde verworfen, und die Monozyten in der darunter liegenden Phase in einem neuen 15 mL Falcon gesammelt. Es folgten zwei Waschschrte: Dazu wurde das Falcon mit den Monozyten auf 15 mL mit DPBS aufgefüllt und für 10 Minuten bei 300 rcf und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach jedem Waschschrte wurde der Überstand abgenommen. Nach dem zweiten Waschschrte wurde

das Zellpellett in 1 mL DPBS resuspendiert und das Falcon, abhängig von der Pellettgröße, auf 5 bis 10 mL mit DPBS aufgefüllt.

### Berechnung der Zellzahl

Zum Zählen der Monozyten wurde die Zellsuspension in einer 1:3 Verdünnung, bestehend aus 10 µL Zellsuspension, 10 µL DPBS und 10 µL Trypanblau, auf eine Neubauer Zählkammer aufgetragen. Unter dem Lichtmikroskop wurden die Zellen anschließend in den vier Quadraten gezählt und der Mittelwert gebildet, sodass die Gesamtzellzahl wie folgt berechnet werden konnte:

$$\frac{\sum \text{Zellzahl der Quadrate}}{\text{Anzahl der Quadrate}} * \text{VF} * 10000 * \text{Volumen der Zellsuspension}$$

Der Verdünnungsfaktor (VF) betrug 3 und das Volumen der Zellsuspension 5 – 10 mL.

### Aussäen der Zellen

Das Falcon mit der Zellsuspension wurde anschließend erneut bei 300 rcf für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellett in 1 mL RPMI-1640 Kulturmedium (Herstellung siehe Tabelle 2) resuspendiert. Anschließend wurde noch so viel Kulturmedium hinzugefügt, dass 300.000 Monozyten in einem Volumen von 350 µL in einer 24-Well Suspensionsplatte ausgesäht werden konnten. Die Zellkulturplatte wurde für eine Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in den Inkubator gestellt.

**Tabelle 2: Herstellung des RPMI-1640 Mediums**

| Substanz                                            | Volumen |
|-----------------------------------------------------|---------|
| RPMI-1640 (with L-glutamine and sodium bicarbonate) | 445 mL  |
| Hitzeinaktiviertes <sup>1</sup> FBS (10%)           | 50 mL   |
| Pen/Strep (1%)                                      | 5 mL    |

FBS: fetal bovine serum; Pen/Strep: penicillin/streptomycin

<sup>1</sup>FBS für 35 Minuten bei 56°C im Wasserbad erhitzen.

### 3.3.3. Zellisolation von T- und B-Lymphozyten aus Buffy-Coat

Die T- und B-Lymphozyten wurden aus Buffy-Coats anonymer Blutspender isoliert, die vom Wiener Roten Kreuz bezogen wurden. Zunächst wurden alle benötigten Reagenzien gemäß Tabelle 3 hergestellt. In einem 50 mL Falcon wurden 15 mL Pancoll (Dichte: 1,077 g/mL) pipettiert und anschließend 15 mL Buffy-Coat vorsichtig darauf geschichtet. Danach wurden die Proben für 30 Minuten bei 400 g und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Die PBMC-Fraktion wurde anschließend abgenommen und in ein neues Falcon überführt. Es folgten zwei Waschschr

denen das Falcon mit PBS-EDTA (1 mM) auf bis zu 40 mL aufgefüllt und für 10 Minuten bei 300 g ohne Bremse zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde nach jedem Waschschrift abgenommen. Nach dem zweiten Waschschrift wurden die Zellen in 20 mL RPMI-1640 Medium (ohne Phenolrot; + 10% FBS) resuspendiert. In einem neuen Falcon wurden zunächst 25 mL iso-osmotische Percoll-Lösung pipettiert, und die PBMC-Fraktion vorsichtig darauf geschichtet. Nach einem weiteren Zentrifugationsschrift bei 550 g für 30 Minuten ohne Bremse wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet in 1 mL PBS-EDTA resuspendiert und in ein neues 50 mL Falcon überführt. Das Falcon wurde erneut mit PBS-EDTA auf 40 mL aufgefüllt und für 10 Minuten bei 400 g ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, und das Pellet in 15 mL RPMI-1640 Medium mit Phenolrot aufgenommen. Die Bestimmung der Zellzahl sowie das Aussäen der Zellen erfolgten wie bei den Monozyten (siehe 3.3.2).

**Tabelle 3: Lösungen zur Isolation von T- und B-Lymphozyten.**

| Lösung                                            | Vorgehen                                                                                                                                                                   |
|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>PBS-EDTA (1mM)</b>                             | 250 mL PBS<br>+ 0,5 mL EDTA (0,5 M)                                                                                                                                        |
| <b>RPMI-1640 ohne Phenolrot + 10% FBS</b>         | 50 mL RPMI-1640 ohne Phenolrot<br>+ 5 mL FBS                                                                                                                               |
| <b>46% Iso-osmotische Percoll-Lösung</b>          | 1. 23,13 mL Percoll + 1,87 mL 10x PBS<br>2. 23 mL Percoll-PBS-Lösung + 27 mL RPMI-1640 (mit Phenolrot) + 10% FBS                                                           |
| <b>RPMI-1640 mit Phenolrot + 10% FBS + 1% P/S</b> | 1. 50 mL FBS 35 Minuten bei 56 °C im Wasserbad erhitzen<br>2. 5 mL Penicillin-Streptomycin (P/S) auftauen<br>3. 445 mL RPMI-1640 + 50 mL hitzeinaktiviertes FBS + 5 mL P/S |

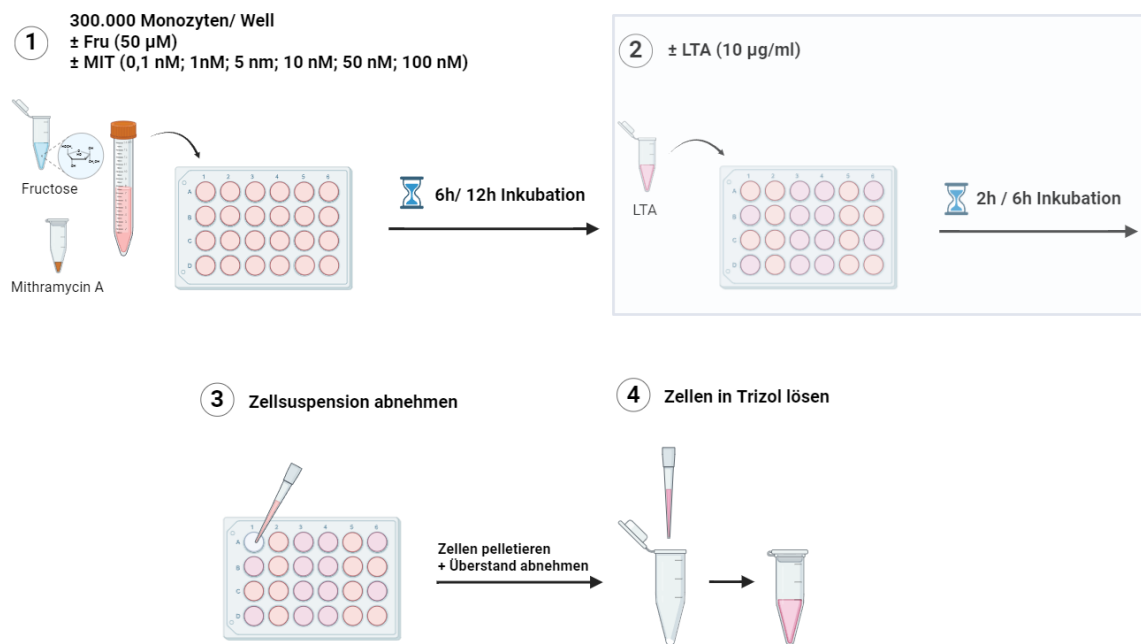
PBS: Phosphate buffered saline; EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure; FBS: fetal bovine serum; Pen/Strep: penicillin/streptomycin

### 3.4. Stimulation der Immunzellen

Um zu untersuchen, ob der Einfluss von Fruktose auf die Immunreaktion unter anderem durch die Regulation von TLR2 vermittelt wird und ob die Inhibition von SP1, einem Transkriptionsfaktor, der die Expression von TLR2 reguliert, zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber LTA führt, wurden isolierte Monozyten mit 50 µM Fruktose und 0,1 nM bis 100 nM Mithramycin A, einem SP1-Inhibitor, behandelt und anschließend mit 10 µg/ml LTA stimuliert.

In einem ersten Experiment wurden die Monozyten mit Fruktose sowie verschiedenen Konzentrationen von Mithramycin A behandelt. Nachdem eine effektive Konzentration von Mithramycin A bestimmt worden war, erfolgte in einem zweiten Experiment eine erneute Behandlung der Monozyten mit Fruktose und Mithramycin A, gefolgt von einer Stimulation mit LTA. Der genaue Versuchsablauf ist in Abbildung 3 dargestellt.

Zusätzlich wurden B- und T-Lymphozyten für zwei, sechs und zwölf Stunden mit Fruktose behandelt, um zu prüfen, ob auch in diesen Zellen eine Reaktion auf Fruktose beobachtbar ist.



### Abbildung 3: Zellstimulation: Monozyten

LTA: Lipoteichonsäure; Fru: Fruktose; MIT: Mithramycin A.  
Erstellt mit BioRender.com

Die Monozyten wurden mit 50  $\mu$ M Fruktoselösung sowie Mithramycin A in verschiedenen Konzentrationen (0,1 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM) behandelt. Die Zellen wurden anschließend für sechs bzw. zwölf Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und für fünf Minuten bei 2000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80 °C gelagert, und zur Lyse der Zellen wurden 500  $\mu$ L Trizol auf die Zellpellets pipettiert. Nach kurzem Vortexen und einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die lysierten Zellen ebenfalls bei -80 °C gelagert.

Im zweiten Experiment wurden die Monozyten erneut mit Fruktose (50  $\mu$ M) und Mithramycin A (10 nM, 50 nM) behandelt. Nach einer Inkubationszeit von zwölf Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden einige Zellen zusätzlich für zwei Stunden mit LTA (10  $\mu$ g/mL) stimuliert. Die Entnahme der Zellen nach Versuchsende erfolgte wie zuvor beschrieben.

Im Experiment mit den Lymphozyten erfolgte eine Behandlung mit Fruktose (50  $\mu$ M) für zwei, sechs und zwölf Stunden. Alle Versuchsbedingungen sind in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4: Versuchsbedingungen für die Zellstimulation**

| Monozyten                   |                                           | Lymphozyten    |
|-----------------------------|-------------------------------------------|----------------|
| Versuch 1<br>⌚ (6; 12 h)    | Versuch 2<br>⌚ (12 h)                     | ⌚ (2, 6, 12 h) |
| Unstimuliert                | Unstimuliert                              | Unstimuliert   |
| 50 µM Fruktose              | 50 µM Fruktose                            | 50 µM Fruktose |
| 50 µM Fruktose + 0,1 nm MIT | 10 µg/mL LTA                              |                |
| 50 µM Fruktose + 1 nm MIT   | 50 µM Fruktose + 10 µg/mL LTA             |                |
| 50 µM Fruktose + 5 nm MIT   | 50 µM Fruktose + 10 nM MIT                |                |
| 50 µM Fruktose + 10 nm MIT  | 50 µM Fruktose + 10 nM MIT + 10 µg/mL LTA |                |
| 50 µM Fruktose + 50 nm MIT  | 10 nM MIT + 10 µg/mL LTA                  |                |
| 50 µM Fruktose + 100 nm MIT | 50 µM Fruktose + 50 nM MIT                |                |
|                             | 50 µM Fruktose + 50 nM MIT + 10 µg/mL LTA |                |
|                             | 50 nM MIT + 10 µg/mL LTA                  |                |
|                             | 10 nM MIT                                 |                |
|                             | 50 nM MIT                                 |                |

MIT: Mithramycin A; LTA: Lipoteichonsäure  
Die Stimulation mit LTA erfolgte für 2 Stunden

### 3.5. mRNA-Expression

#### 3.5.1. RNA-Isolation

Die Extraktion der Ribonukleinsäure (RNA) wurde unter Verwendung des kommerziell erhältlichen Reagenz TRIzol<sup>™</sup> (Trizol; AppliChem) durchgeführt, das auf der Methode der sauren Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion basiert. Diese Methode wurde 1987 von Chomczynski und Sacchi entwickelt und ermöglicht die gleichzeitige Extraktion von RNA, DNA und Proteinen durch eine Flüssig-Flüssig-Extraktion. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass die RNA nach der Extraktion mit einer sauren Lösung, die Guanidiniumthiocyanat, Natriumacetat, Phenol und Chloroform enthält, und anschließender Zentrifugation von der DNA getrennt wird. Unter sauren Bedingungen verbleibt die RNA in der oberen wässrigen Phase, während DNA und Proteine in der Interphase bzw. in der unteren organischen Phase verbleiben [64].

Die in Trizol lysierten Zellen wurden zunächst aufgetaut, bevor zu jeder Probe 200 µL Chloroform hinzugefügt wurden. Die Proben wurden daraufhin etwa 15 Sekunden geschüttelt und anschließend 10 Sekunden gevortext. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 12.000 rcf und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. In diesem Schritt erfolgte die Trennung in eine wässrige, eine Inter- und eine organische Phase. Die obere farblose Phase, die die RNA enthält, wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 500 µL Isopropanol hinzugefügt, die Proben gevortext und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach

einer weiteren Zentrifugation bei 12.000 rcf und 4 °C folgten zwei Waschschr tte. Dazu wurde 75%iger Ethanol in die Reaktionsgefäße pipettiert. Diese wurden kurz gevortext und für 8 Minuten bei 7500 rcf und 4 °C zentrifugiert, wobei der Überstand jeweils verworfen wurde. Nach dem letzten Waschschr tt wurden die Mikoreaktionsgef  e geöffnet und über Kopf für 10 Minuten auf einem Papiertuch getrocknet. Zum Lösen der RNA wurden jeweils 9  L nukleasefreies Wasser hinzugefügt, und die Proben wurden für 10 Minuten bei 55 °C und 300 rpm auf einem Heizblock inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

### 3.5.2. cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Um die Expression verschiedener Gene auf mRNA-Ebene messen zu können, muss die isolierte RNA zunächst durch Reverse Transkription in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben werden. Im ersten Schritt wurde ein DNase-Verdau durchgeführt, um möglicherweise noch vorhandene DNA zu degradieren. Im zweiten Schritt erfolgte die Umschreibung der RNA in cDNA mittels der Reversen Transkriptase AMV (avian myeloblastosis virus) [65]. Da aufgrund der geringen Zellzahl nur eine geringe RNA-Ausbeute zu erwarten war, wurde auf die RNA-Konzentrationsmessung verzichtet, und stattdessen die maximale Menge an RNA für die cDNA-Synthese verwendet.

Für den DNase-Verdau wurden zunächst 8  L RNA in spezielle cDNA-Reaktionsgefäße überführt. Zu jeder Probe wurden jeweils 1  L RQ1 RNase-Free DNase 10x Reaction Buffer und RQ1 RNase-Free DNase hinzugefügt. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren mit einer Mini-Zentrifuge wurden die Reaktionsgefäße für 30 Minuten bei 37 °C im Thermocycler inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde zu jeder Probe 1  L RQ1 DNase Stop Solution pipettiert. Die Reaktionsgefäße wurden erneut gevortext und zentrifugiert, bevor sie für eine 10-minütige Inkubation bei 65 °C wieder in den Thermocycler gestellt wurden. Währenddessen wurde der Mastermix für die anschließende cDNA-Synthese, wie in Tabelle 5 beschrieben, vorbereitet.

**Tabelle 5: Mastermix (cDNA-Synthese)**

| Reagenz                             | Volumen pro Probe |
|-------------------------------------|-------------------|
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)           | 4  L              |
| Reverse Transkriptase Puffer (10 x) | 2  L              |
| dNTP-Mix (10 mM)                    | 2  L              |
| RNAasin                             | 0,5  L            |
| Random Primer (500  g/mL)           | 1  L              |
| AMV Reverse Transkriptase (15 U)    | 0,6  L            |

Nach der Inkubation im Thermocycler wurden die Proben kurz zum Abkühlen auf Eis gestellt, bevor 10,1  L Mastermix zu jeder Probe hinzugefügt wurden. Die Proben wurden erneut gevortext

und zentrifugiert, bevor sie wieder in den Thermocycler gestellt und das Programm zur cDNA-Synthese, wie in Tabelle 6 dargestellt, gestartet wurde. Schließlich wurde den Proben 80 µL DNase- und RNase-freies Wasser hinzugegeben und kurz zentrifugiert. Die fertige cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 6: Temperaturprofil der cDNA-Synthese im Thermocycler**

| Zeit (Minuten) | Temperatur (°C) |
|----------------|-----------------|
| 10             | 25              |
| 15             | 42              |
| 5              | 95              |
| 5              | 4               |

### 3.5.3. Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion

Die Methode der quantitativen Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (real-time qPCR) ermöglicht es sowohl einsträngige als auch doppelsträngige DNA zu vervielfältigen. Durch den Einsatz des fluoreszierenden Farbstoffes SYBR Green kann die Amplifikation der DNA in Echtzeit verfolgt und die Genexpression in der Ausgangs-DNA (Template) quantifiziert werden. Für die Durchführung werden zwei spezifische Oligonukleotid-Primer, dNTPs (Desoxynukleotide), eine hitzestabile Polymerase, Magnesium-Ionen sowie ein Puffer benötigt. Die Reaktion erfolgt durch drei sich wiederholende Temperaturzyklen in einem Thermocycler. Im ersten Zyklus, der Denaturierung, werden die beiden Stränge der DNA aufgetrennt und die Polymerase aktiviert. Anschließend folgt die Anlagerung (Annealing) der Primer an das Template bei geringerer Temperatur. Im letzten Schritt, der Elongation, erfolgt die Synthese der komplementären Stränge unter Verwendung der dNTPs bei einer für die Polymerase geeigneten Temperatur. In dieser Phase lagert sich auch der Farbstoff SYBR Green an die DNA an, wodurch ein fluoreszierendes Signal erzeugt wird, das die Menge der gebildeten DNA widerspiegelt [66]. Da die vorher generierte cDNA als Template verwendet wird, kann anhand der Menge der amplifizierten cDNA auf die Menge der entsprechenden mRNA in der Ausgangsprobe geschlossen werden.

**Tabelle 7: Mastermix für die RT-qPCR**

| Substanz                    | Volumen/ Probe [µL] |
|-----------------------------|---------------------|
| iTaq™ Universal SYBR® Green | 10                  |
| nuklease-freies Wasser      | 3                   |
| Primer forward <sup>1</sup> | 1                   |
| Primer reverse <sup>1</sup> | 1                   |

<sup>1</sup>für eingesetzte Konzentrationen der entsprechenden Primer siehe Tabelle 8

Zunächst wurde der Mastermix entsprechend Tabelle 7 hergestellt. Die eingesetzten Primer sowie deren Sequenzen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

**Tabelle 8: Primersequenzen und eingesetzte Primerkonzentration**

|              |    | Primersequenz (5'→3')     | pmol |
|--------------|----|---------------------------|------|
| <b>18S</b>   | fw | GGGCCCCGAAGCGTTTACTTT     | 3    |
|              | rv | CGCCGGTCCAAGAATTCAC       |      |
| <b>GLUT5</b> | fw | AAGGGAGGCTGACGCTTGTG      | 3    |
|              | rv | TGAGCAGTGCTGGGGAGTTG      |      |
| <b>TLR2</b>  | fw | ATTGTGCCCATTGCTCTTTC      | 3    |
|              | rv | CTGCCCTTGCAGATACCATT      |      |
| <b>TNF-α</b> | fw | GAAGGAGAAGAGGCTGAGGAACAAG | 6    |
|              | rv | AAAACAACCCTCAGACGCCACAT   |      |
| <b>IL-6</b>  | fw | CGAGCCCACCGGGAACGAAA      | 3    |
|              | rv | GTGGCTGTCTGTGTGGGGCG      |      |
| <b>IL-1β</b> | fw | CAAGGGCTTCAGGCAGGCCG      | 3    |
|              | rv | TGAGTCCCGGAGCGTGCAGT      |      |
| <b>SP1</b>   | fw | AGAACCCACAAGCCCAAACA      | 3    |
|              | rv | TGCACCTGGATTCTAAACA       |      |

18S: 18S ribosomale RNA; GLUT5: Glucosetransporter 5; IL-1β: Interleukin 1β; SP1: Transkriptionsfaktor SP1, Spezifitätsprotein 1; TLR2: toll-like receptor 2; IL-6: Interleukin 6; TNF-α: Tumornekrosefaktor α; fw: forward; rv: reverse

Jeweils 15 µL des Mastermixes wurden in die benötigten Wells einer 96-Well-Platte vorgelegt. Anschließend wurden 5 µL der cDNA, die als Template dient, in Doppelbestimmung hinzugefügt. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle (non-template control, NTC) durchgeführt, bei der nukleasefreies Wasser anstelle der cDNA in Doppelbestimmung hinzugefügt wurde. Die Platte wurde mit einer Folie versiegelt und in den Thermocycler eingesetzt. Schließlich wurde das entsprechende Programm (siehe Tabelle 9) eingestellt und gestartet.

**Tabelle 9: Temperaturprofile der real-time qPCR**

| Gen                                                      | Initiale Denaturierung | Denaturierung | Annealing/ Elongation | Schmelzkurve                    | Zyklen (n) |
|----------------------------------------------------------|------------------------|---------------|-----------------------|---------------------------------|------------|
| <b>18S</b><br><b>GLUT5</b><br><b>IL-1β</b><br><b>SP1</b> | 95°C, 30 s             | 95°C, 5 s     | 64°C, 30 s            | 95°C, 10 s<br>65°C, 5 s<br>95°C | 39         |
| <b>TLR2</b><br><b>IL-6</b>                               | 95°C, 30 s             | 95°C, 5 s     | 64°C, 30 s            | 95°C, 10 s<br>65°C, 5 s<br>95°C | 49         |
| <b>TNF-α</b>                                             | 95°C, 30 s             | 95°C, 5 s     | 60°C, 30 s            | 95°C, 10 s<br>65°C, 5 s<br>95°C | 49         |

18S: 18S ribosomale RNA; GLUT5: Glucosetransporter 5; IL-1β: Interleukin 1β; SP1: Transkriptionsfaktor SP1, Spezifitätsprotein 1; TLR2: toll-like receptor 2; IL-6: Interleukin 6; TNF-α: Tumornekrosefaktor α

Die Quantifizierung der relativen mRNA-Expression erfolgte durch die  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode [67], wobei die  $C_T$ -Werte des 18S-Housekeeping-Gens als Referenz dienten.

### 3.6. Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein biochemischer Test, der auf dem spezifischen Bindungsverhalten von Antigenen und Antikörpern basiert. Diese Methode ermöglicht den hochsensitiven Nachweis und die Quantifizierung von Antigenen wie Proteinen, Peptiden oder Hormonen in Flüssigkeitsproben. Durch die Verwendung von enzymmarkierten Antikörpern, die nach Bindung an das Zielantigen eine Farbänderung des Substrats bewirken, kann das Vorhandensein dieser Moleküle visuell oder fluorometrisch erfasst werden. ELISA wird sowohl in der biomedizinischen Forschung als auch in der Diagnostik eingesetzt und ermöglicht den Nachweis von Biomolekülen in sehr geringen Konzentrationen [68].

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration in den Zellüberständen von Monozyten wurden kommerziell erhältliche ELISA-Kits (Duoset® ELISA Development System Kit, R&D Systems) für die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  verwendet. Die Durchführung des Assays, die Herstellung aller benötigten Reagenzien sowie das Ansetzen aller mitgelieferten Substanzen erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers [69], [70], [71]. Die Zusammensetzung und Herstellung von PBS sind im Anhang in Tabelle 15 aufgelistet.

Zunächst wurden 100  $\mu$ L Capture Antibody in die benötigten Wells der ELISA-Platte pipettiert und über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Platte gewaschen und 300  $\mu$ L Reagent Diluent (RD) zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen pro Well hinzugefügt. Nach einer Stunde wurde die Platte erneut gewaschen, 100  $\mu$ L der Standards und verdünnten Proben (siehe Tabelle 10) aufgetragen und für zwei Stunden inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschriff, die Zugabe von 100  $\mu$ L Detection Antibody und eine zweistündige Inkubation. Nach dem erneuten Waschen wurden 100  $\mu$ L Streptavidin-HRP hinzugefügt und nach 20 Minuten erneut gewaschen. Abschließend wurde 100  $\mu$ L Substratlösung pro Well zugegeben und nach einer letzten 20-minütigen Inkubation die Reaktion durch Zugabe von 50  $\mu$ L 2N Schwefelsäure gestoppt. Die Absorption wurde bei 450 nm im Photometer gemessen. Alle Inkubationen wurden im Dunkeln, in einem Platteninkubator, bei Raumtemperatur durchgeführt.

**Tabelle 10: Probenverdünnungen für den ELISA**

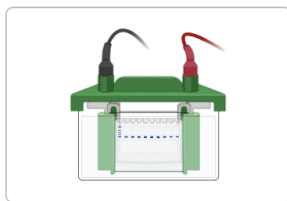
|                                   | TNF- $\alpha$ | IL-6       | IL-1 $\beta$ |
|-----------------------------------|---------------|------------|--------------|
| <b>Proben ohne LTA</b>            | unverdünnt    | unverdünnt | unverdünnt   |
| <b>Mit LTA stimulierte Proben</b> | 1:75          | 1:75       | 1:20         |

TNF- $\alpha$ : Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ; IL-6: Interleukin 6; IL-1 $\beta$ : Interleukin 1 $\beta$

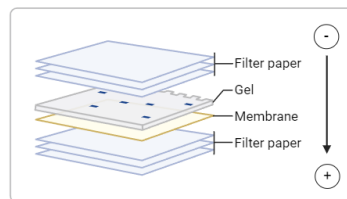
### 3.7. Western-Blot: Proteinbestimmung von SP1 in humanen Monozyten

Die Western-Blot-Methode ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung spezifischer Proteine in einer Probe. Zunächst wird das Gesamtprotein isoliert. Anschließend erfolgt die Auftrennung der Proteine in einer SDS-PAGE-Gelmatrix (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) durch Anlegen eines elektrischen Feldes im Rahmen einer Gel-Elektrophorese. Die aufgetrennten Proteine werden durch halbtrockenes Blotting von dem Gel auf eine feste Trägermatrix, eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid), transferiert. Dies geschieht durch das Anlegen eines weiteren elektrischen Feldes, das senkrecht zum Gel ausgerichtet ist. Nach der Inkubation mit spezifischen Antikörpern kann das Zielprotein in einem letzten Schritt mittels Immunodetektion durch Chemilumineszenz quantifiziert werden [72]. Abbildung 4 fasst den Ablauf der Western-Blot-Methode zusammen. Die Zusammensetzung aller für diese Methode benötigten Lösungen kann Tabelle 16 im Anhang entnommen werden.

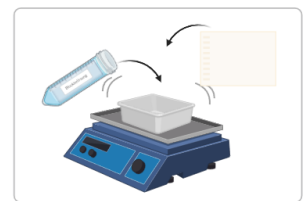
1) SDS-PAGE Elektrophorese



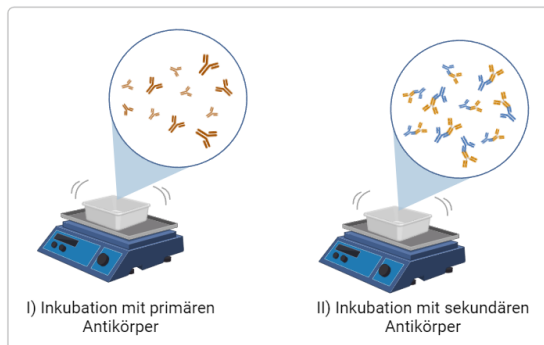
2) Proteintransfer (Blotting)



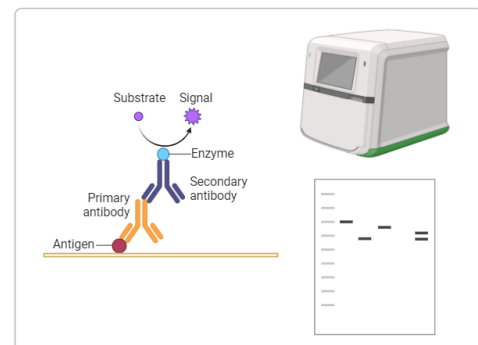
3) Blockieren



4) Antikörper Inkubation



5) Detektieren



**Abbildung 4: Arbeitsablauf Western-Blot**

Erstellt mit BioRender.com

### Proteinextraktion

Zur Proteinextraktion aus den Monozyten wurde TRIzol G<sup>TM</sup> (Trizol; AppliChem) verwendet. Die Zusammensetzung aller benötigten Lösungen kann Tabelle 11 entnommen werden.

Als Ausgangsmaterial diente die Trizolphase, die nach der Phasentrennung bei der RNA-Extraktion zurückblieb. Um die Proteinausbeute zu maximieren, wurden die Proben aus zwei bis drei

Versuchsansätzen zusammengeführt. Zunächst wurden 300 µL 100% Ethanol zu den gepoolten Trizolphasen hinzugefügt. Die Proben wurden gevortext und für zwei bis drei Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 2000 rcf und 4 °C. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und etwa 1 mL Isopropanol hinzugefügt. Die Proben wurden geschüttelt und gevortext. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben für 10 Minuten bei 12.000 rcf und 4 °C zentrifugiert, und der Überstand entfernt. Anschließend wurde das Proteinpellet dreimal gewaschen. Dazu wurden 2 mL 0,3 M Guanidinhydrochlorid in 95% Ethanol auf das Pellet pipettiert. Die Proben wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach für 5 Minuten bei 7500 rcf und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nach dem letzten Waschschrift wurden 2 mL 100% Ethanol zum Pellet gegeben. Die Proben wurden erneut für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 5 Minuten bei 7500 rcf und 4 °C zentrifugiert. Nach vollständigem Entfernen des Ethanols wurden die Pellets für 5 – 10 Minuten an der Luft getrocknet. In der Zwischenzeit wurde die Harnstoff/DTT-Lösung mit je 1 µL Protease-Inhibitor-Cocktail, Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 2 und Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 3 pro mL Harnstoff/DTT-Lösung versetzt. Anschließend wurden je 25 µL dieser Lösung zu den Proteinpellets pipettiert. Das Pellet wurde durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren solubilisiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben für 5 Minuten bei 100 °C auf einem Heizblock erhitzt, gevortext und für 10 Minuten bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

**Tabelle 11: Lösungen für die Urea/DTT Proteinextraktion**

| <b>10 M Harnstoff/ 50 mM DTT (1,4-Dithiotreit)</b>                                    | <b>0,3 M Guanidinhydrochlorid in 95% Ethanol</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 1,5015 g Harnstoff<br>+ 0,01925 g DTT<br>→ auf 2,5 mL mit dH <sub>2</sub> O auffüllen | 5,7318 g Guanidin-HCl<br>+ 200 mL 95% EtOH       |

## **SDS-PAGE Gelelektrophorese**

Für die Gelelektrophorese wurden Polyacrylamidgele bestehend aus einem 8% Trenngel und einem 4% Sammelgel verwendet (siehe Tabelle 12).

Die Gele wurden in einem Gestell fixiert und in der Elektrophoresekommer platziert, die mit 1x Elektrophoresepuffer gefüllt und auf Eis gestellt wurde. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese durch Zugabe von SDS und DTT sowie durch Erhitzen bei 95 °C für fünf Minuten vorbereitet. Diese Schritte sind notwendig, um die Proteine zu denaturieren, Disulfidbindungen aufzubrechen

und den Proteinen eine gleichmäßige negative Ladung zu verleihen [73]. Da eine genaue Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay nicht möglich war, wurden die Proben nicht weiter im Extraktionspuffer verdünnt, um die maximale Proteinmenge aufzutragen. Nach der Aufbereitung der Proben wurden die Gele mit jeweils 1,5 µL Proteinladder und 10 µL der Proben beladen. Die Elektrophorese wurde bei 110 V gestartet und die Proteine wurden in etwa 1,5 Stunden aufgetrennt.

**Tabelle 12: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel**

| Reagenz             | 8% Trenngel (µL) | 4% Sammelgel (µL) |
|---------------------|------------------|-------------------|
| dH <sub>2</sub> O   | 4500             | 1575              |
| 1,5 M Tris (pH 8,8) | 2600             | -                 |
| 0,5 M Tris (pH 6,8) | -                | 625               |
| 30% Acrylamid/Bis   | 2700             | 250               |
| 10% SDS             | 100              | 25                |
| 10% APS             | 100              | 25                |
| TEMED               | 6                | 3                 |

(Angaben für 2 Gele, bei 1 mm Spacer)

### **Blotten + Ponceau S Färbung**

Nach der Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe wurde die Übertragung der Proteine von dem Gel auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran durchgeführt. Zunächst wurde die Membran in Methanol aktiviert und anschließend, ebenso wie die Polyacrylamidgele und zwei Filterpapiere, für etwa 10 Minuten im Transferpuffer auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde das Blottingsandwich zusammengebaut und für 30 Minuten bei 25 V im Turboblotter platziert. Die Membran wurde anschließend für mindestens eine Stunde getrocknet.

Zur Überprüfung des Proteintransfers durch die Färbung mit Ponceau S wurde die Membran zunächst erneut in Methanol aktiviert. Anschließend wurde die Membran für 3 Minuten in Ponceau S geschwenkt und dreimal in destilliertem Wasser gespült.

### **Immundetektion: Inkubation mit primärem und sekundärem Antikörper**

Die auf der Membran gebundenen Proteine sollten nun durch die Immundetektion sichtbar gemacht werden. Der Ablauf ist in Tabelle 13 zusammengefasst und wird im Folgenden genauer beschrieben.

**Tabelle 13: Ablauf der Immundetektion**

|   | Protokollschritt                                   | Reagenz/ Lösung     | Dauer/ Bedingung                          |
|---|----------------------------------------------------|---------------------|-------------------------------------------|
| 1 | Blockieren unspezifischer Bindungsstellen          | Blockierlösung      | 60 Minuten, Raumtemperatur, auf Schüttler |
| 2 | Spezifische Bindung des Antikörpers an Zielprotein | Primär-Antikörper   | Über Nacht, 4 °C, Rotationstisch          |
| 3 | Waschschritt                                       | 1x TBST             | 3 x 10 Minuten                            |
| 4 | Bindung von sekundärem Antikörper                  | Sekundär-Antikörper | 90 Minuten, Raumtemperatur, auf Schüttler |
| 5 | Waschschritt                                       | 1x TBST             | 3 x 10 Minuten                            |
| 6 | Inkubation mit Chemilumineszenz-Substrat           | Detektionslösung    | 5 Minuten, Dunkelheit                     |
| 7 | Sichtbarmachung des Proteins                       |                     | Detektionsgerät                           |

Bei dem Zielprotein handelt es sich um SP1 und als sogenanntes Housekeeping-Protein wurde  $\beta$ -Actin verwendet. Der Blot wurde entsprechend mit den spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Verdünnungen der Antikörper sowie die Zusammensetzung der Blockierlösung sind in Tabelle 14 dargestellt.

**Tabelle 14: Antikörperbedingungen für den Westernblot**

| Primärer Antikörper | Verdünnung | Blockierlösung in 1xTBST | Sekundärer Antikörper (1:5000) |
|---------------------|------------|--------------------------|--------------------------------|
| SP1                 | 1:100      | 2,5 % MMP                | Anti-Maus                      |
| $\beta$ -Actin      | 1:2000     | 2,5 % MMP                | Anti Maus                      |

SP1: Transkriptionsfaktor SP1, Spezifitätsprotein 1; MMP: Magermilchpulver

Bevor die Membran mit dem primären Antikörper inkubiert wurde, war es notwendig, unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Dazu wurde die Membran für 60 Minuten in Blockierlösung bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper bei 4 °C über Nacht auf einem Rotationstisch. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in 1xTBST gewaschen, um ungebundene und unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Danach folgte die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper für 90 Minuten auf dem Schüttler bei Raumtemperatur. Die Membran wurde erneut dreimal für 10 Minuten in 1xTBST gewaschen und anschließend für 5 Minuten in Detektionslösung (Peroxidase-Puffer und Luminol/Enhancer Solution im Verhältnis 1:1) im Dunkeln inkubiert. Schließlich wurde die Membran im Detektionsgerät platziert und die Chemilumineszenz-Detektion des Proteins durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch eine densitometrische Analyse der Bandenintensität mit der Software Image Lab 3.0. Die Signale des Zielproteins wurden zuletzt mit denen des Housekeeping-Proteins normalisiert.

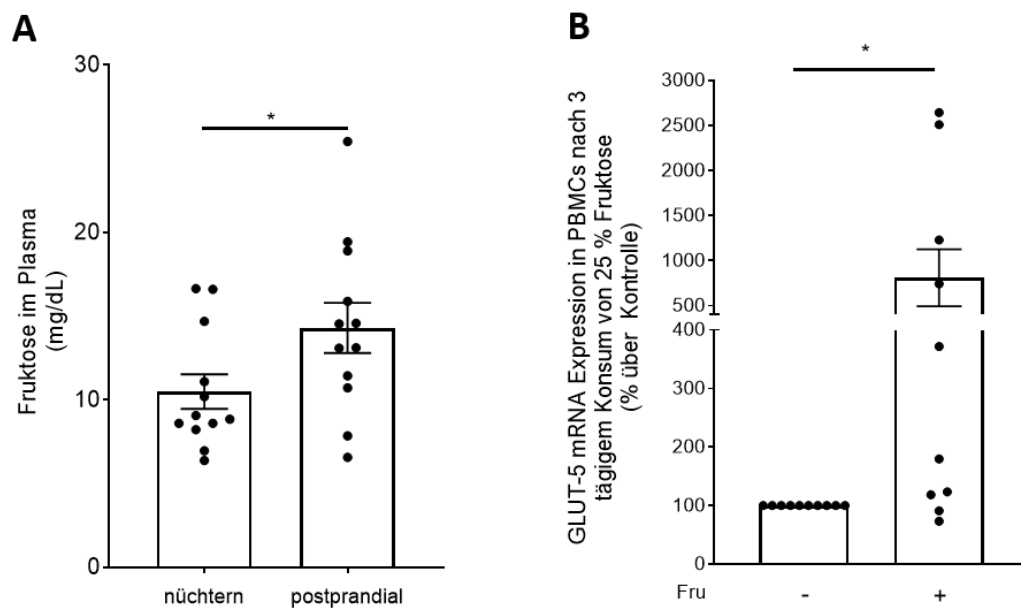
### **3.8. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung und grafische Darstellung der Daten erfolgte mittels GraphPad Prism 7.0. Zur Identifikation von Ausreißern wurde der Grubbs-Test verwendet, und diese wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die Normalverteilung der Daten wurde überprüft, und bei fehlender Varianzhomogenität wurden die Daten transformiert. Zum Vergleich der Gruppen wurden der gepaarte und ungepaarte t-Test sowie der Wilcoxon-Test durchgeführt. Wenn keine Normalverteilung vorlag, kam der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test zum Einsatz. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben, und Unterschiede wurden als signifikant betrachtet, wenn der p-Wert  $\leq 0,05$  lag.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Einfluss einer fruktosereichen Ernährung auf die Fruktoseplasmakonzentration und die GLUT5-mRNA-Expression in PBMCs

Um den Einfluss einer fruktosereichen Ernährung auf die Fruktoseaufnahme und den Fruktosemetabolismus in PBMCs genauer zu untersuchen, wurden die Fruktosekonzentration im Plasma sowie die GLUT5-mRNA-Expression in isolierten PBMCs der Probanden der ENDO-META-Studie nach dreitägiger Aufnahme einer fruktosereichen Kost gemessen.



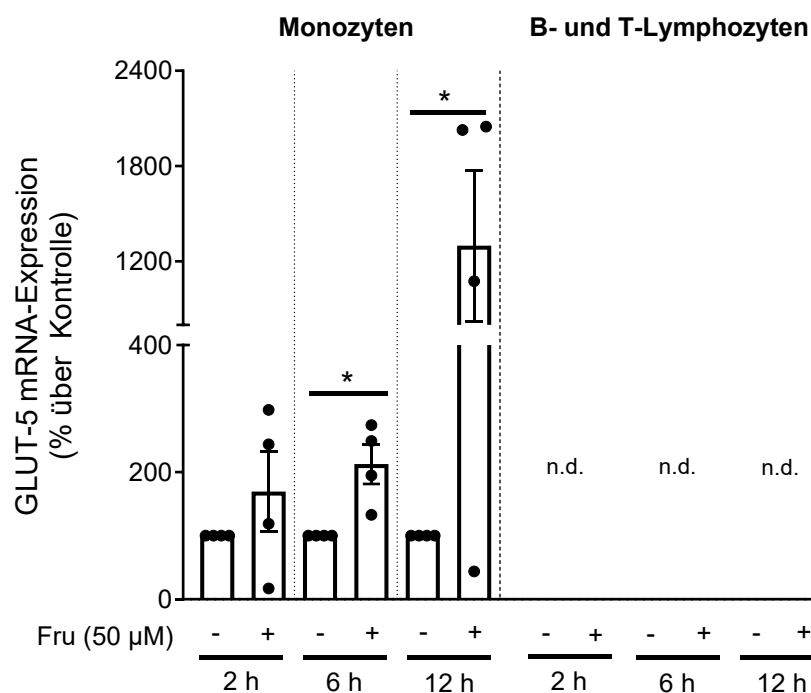
**Abbildung 5: Fruktosekonzentration im Plasma und GLUT5-mRNA-Expression in PBMCs von Probanden der ENDO-META-Studie nach der einmaligen Aufnahme von 40g Fruktose und der dreitägigen Aufnahme einer fruktosereichen Ernährung (25 E% der Gesamtkalorienzufuhr).**

(A) Fruktosekonzentration im Blutplasma nüchtern und 3 Stunden nach einem, 40g Fruktose beinhaltendem, Frühstück.  $n = 12$ . (B) GLUT5-mRNA-Expression in PBMCs nach dreitägiger Aufnahme einer fruktosereichen Ernährung (25 E% der Gesamtkalorienzufuhr).  $n = 10$ .  $*p \leq 0,05$ . Daten sind als MW  $\pm$  SEM dargestellt. GLUT5: Glukosetransporter 5; Fru: Fruktose.

Die Messungen der Fruktosespiegel im Plasma ergaben einen signifikanten, etwa 1,4-fachen postprandialen Anstieg der Fruktosekonzentration (Abbildung 5A). Zudem konnte eine, ebenfalls signifikante, etwa 8,1-fach erhöhte GLUT5-mRNA-Expression in PBMCs nach dreitägiger fruktosereicher Ernährung festgestellt werden (Abbildung 5B).

## 4.2. Einfluss der Behandlung mit Fruktose auf die mRNA-Expression von GLUT5 in Monozyten und B- und T-Lymphozyten

Nachdem eine signifikante Erhöhung der GLUT5-mRNA-Expression in PBMCs nach der Aufnahme einer fruktosereichen Ernährung nachgewiesen worden war, wurde untersucht, in welchen Blutzellen diese veränderte Expression auftritt. Dazu wurden Monozyten sowie B- und T-Lymphozyten aus Buffy-Coats isoliert und für 2, 6 und 12 Stunden mit 50  $\mu$ M Fruktose behandelt. Während in B- und T-Lymphozyten die GLUT5-mRNA-Expression unter der Nachweisgrenze lag, zeigte sich in Monozyten nach 6 Stunden und nach 12 Stunden eine signifikant höhere Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abbildung 2).



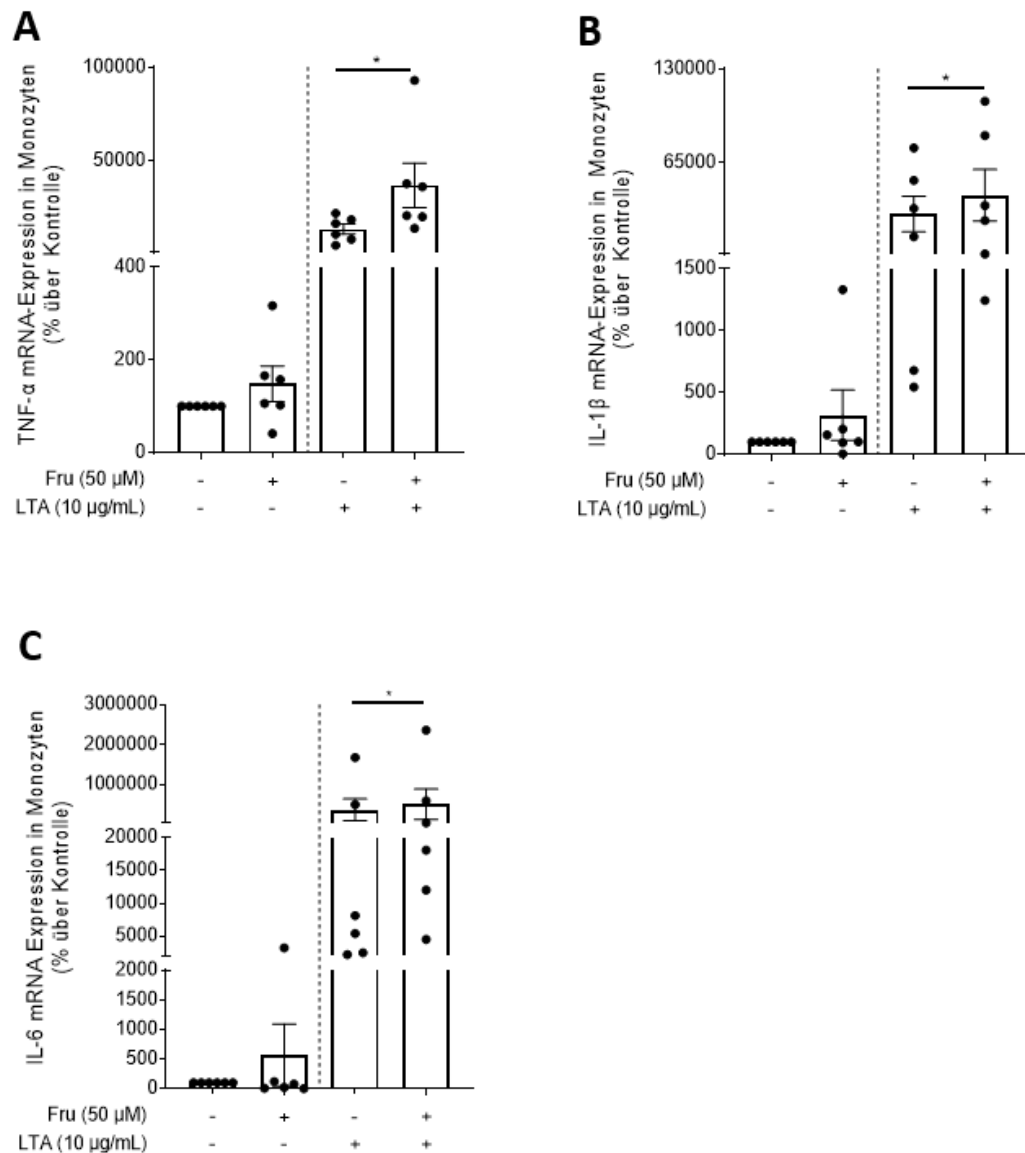
**Abbildung 6: GLUT5-mRNA-Expression in Monozyten sowie B- und T-Lymphozyten nach 2, 6 und 12-Stündiger Inkubation mit Fruktose (50  $\mu$ M).**

\* $p \leq 0,05$ .  $n=4$ . Daten sind als MW  $\pm$  SEM dargestellt. GLUT5: Glukosetransporter 5; Fru: Fruktose

## 4.3. Einfluss der Behandlung mit Fruktose und Stimulation mit LTA auf die mRNA-Expression pro-inflammatorischer Zytokine in Monozyten

Frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigten eine erhöhte TLR2-mRNA-Expression in PBMCs nach einer fruktosereichen Ernährung [58]. Um die Auswirkungen einer Fruktosebehandlung in Kombination mit LTA, einem TLR2-Liganden, auf die Immunantwort von Monozyten zu untersuchen, wurden Monozyten aus Buffy-Coats oder von gesunden Spendern isoliert und zunächst mit Fruktose (50  $\mu$ M) vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen 2 Stunden lang mit

LTA (10 µg/mL) stimuliert und die Konzentration proinflammatorischer Zytokine im Zellüberstand gemessen.



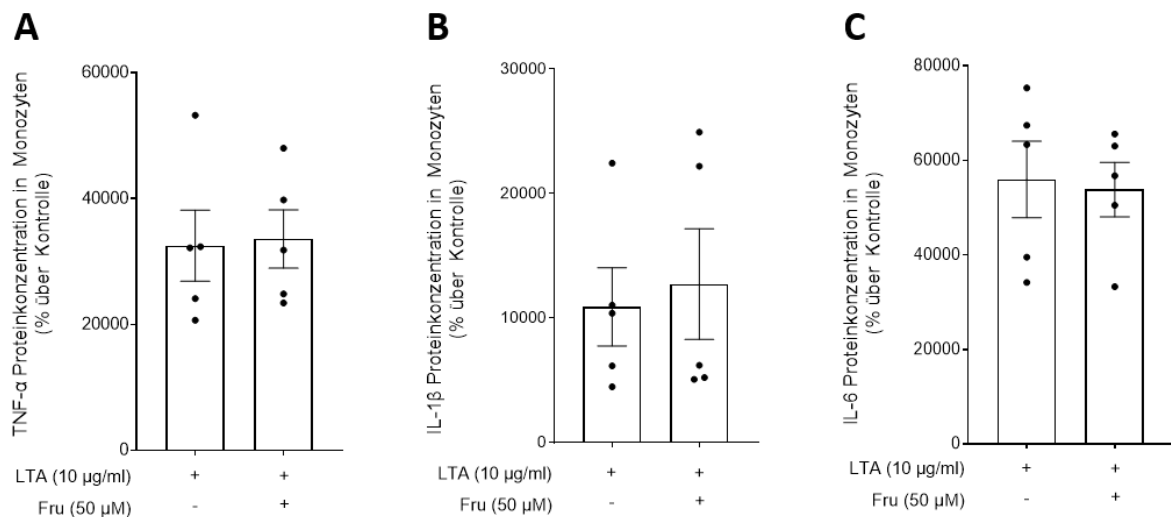
**Abbildung 7: mRNA-Expression pro-inflammatorischer Zytokine nach 12-Stündiger Vorbehandlung mit 50 µM Fruktose und 2-Stündiger Stimulation mit 10 µg/mL LTA in Monozyten.**

mRNA-Expression von (A) TNF-α, (B) IL-1β und (C) IL-6. n = 6. \*p ≤ 0,05. Daten sind als MW ± SEM dargestellt. LTA: Lipoteichonsäure; TNF-α: Tumornekrosefaktor α; IL-6: Interleukin 6; Fru: Fruktose.

In den mit LTA-stimulierten und zuvor mit Fruktose-behandelten Zellen konnte eine signifikant erhöhte Expression um das ca. 2,7-, 1,4- und 1,4-Fache von TNF-α, IL-1β und IL-6 im Vergleich zu nur mit LTA-stimulierten Zellen nachgewiesen werden. Eine ausschließliche Fruktosebehandlung führte hingegen zu keiner signifikanten Veränderung in der Expression der gemessenen Zytokine (Abbildung 7).

#### 4.4. Einfluss der Behandlung mit Fruktose und Stimulation mit LTA auf die Proteinkonzentration pro-inflammatorischer Zytokine in Monozyten

Nachdem die mRNA-Expression verschiedener Zytokine in Monozyten nach der Behandlung mit Fruktose und anschließender Stimulation mit LTA erhöht war, wurde untersucht, wie sich die Proteinkonzentration der Zytokine unter denselben Bedingungen verändert.



**Abbildung 8: Proteinkonzentration pro-inflammatorischer Zytokine nach Vorbehandlung mit Fruktose und Stimulation mit LTA in Monozyten.**

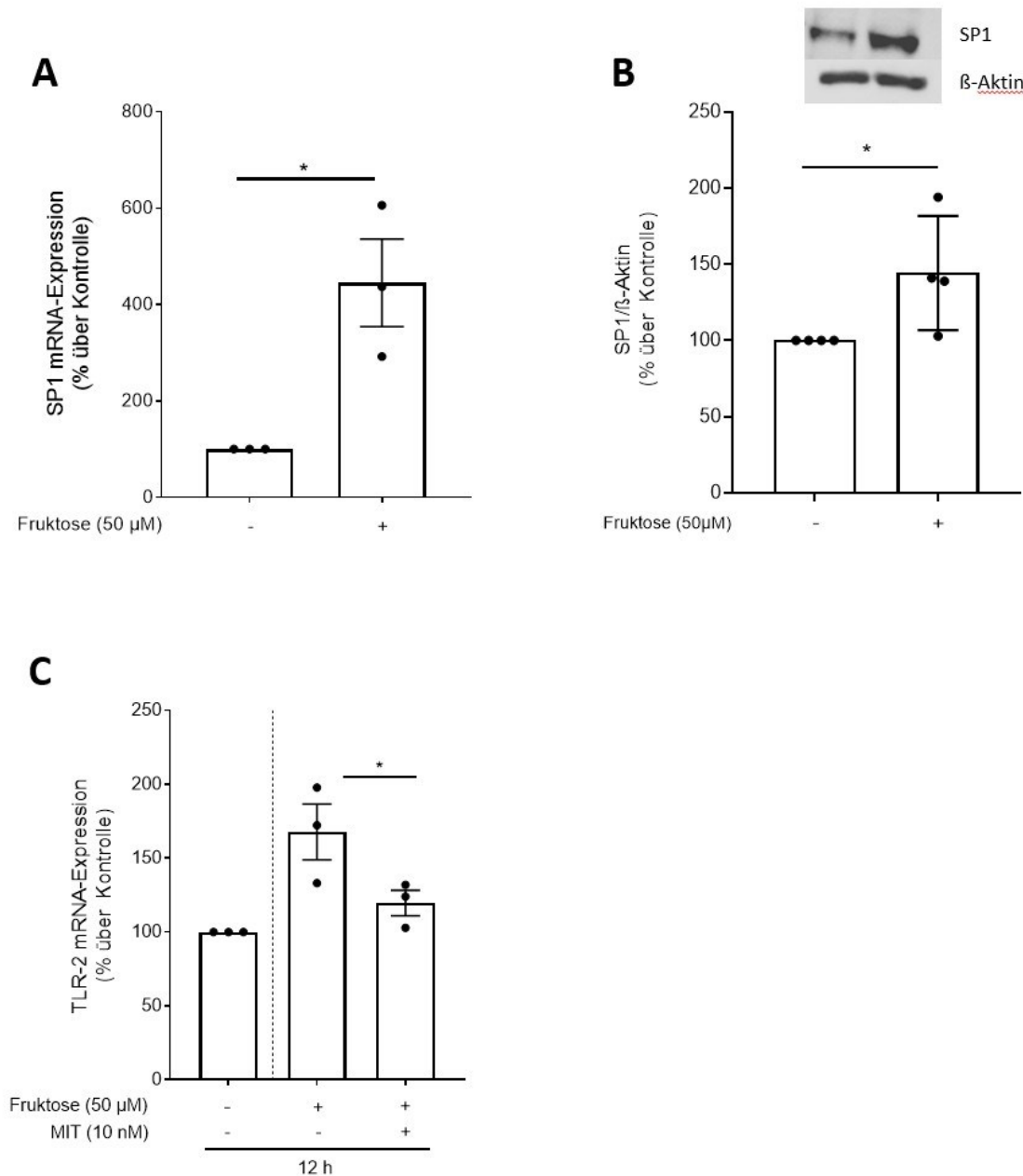
Proteinkonzentration in Monozyten nach 12-Stündiger Vor-Inkubation mit Fruktose (50 µM) und anschließender Stimulation mit LTA (10 µg/mL) für 2 Stunden von (A) TNF-α, (B) IL-1β und (C) IL-6. n = 5. \*p ≤ 0,05. Daten sind als MW ± SEM dargestellt. LTA: Lipoteichonsäure; TNF-α: Tumornekrosefaktor α; IL-6: Interleukin 6; Fru: Fruktose.

Die gemessenen Proteinkonzentrationen der Zytokine zeigten Veränderungen zwischen den Gruppen, wobei die Daten eine deutliche Streuung aufwiesen. Nach Stimulation mit LTA und Fruktose wiesen die Zellen für TNF-α und IL-1β tendenziell höhere Konzentrationen auf als nach alleiniger Behandlung mit LTA (TNF-α: p = 0,3962; IL-1β: p = 0,3011). Für IL-6 zeigte sich hingegen eine leicht niedrigere Konzentration für Zellen die mit LTA und Fruktose behandelt wurden (p = 0,6304). Keine der beobachteten Unterschiede erreichten statistische Signifikanz (Abbildung 8).

#### 4.5. Effekt von Mithramycin A auf die Fruktose-vermittelte Expression von TLR2 und der Einfluss von Fruktose auf die Proteinkonzentration und mRNA-Expression von SP1

Da SP1 als Regulator der TLR2-Expression beschrieben ist [74], [75], wurde im nächsten Schritt untersucht, ob und inwiefern Fruktose die Expression von SP1 und TLR2 beeinflusst. Hierzu wurden Monozyten neben Fruktose zusätzlich mit Mithramycin A, einem spezifischen SP1-

Inhibitor, ko-stimuliert. Anschließend wurden in Fruktose behandelten Zellen die mRNA- und Proteinkonzentration von SP1 im Vergleich zu unbehandelten Zellen bestimmt. Zudem wurde in Fruktose behandelten Zellen sowie in Zellen, die zusätzlich den Inhibitor erhielten, die Expression der TLR2-mRNA analysiert.



**Abbildung 9: SP1-mRNA- und Proteinkonzentration in Monozyten nach der Inkubation mit Fruktose sowie die TLR2-mRNA-Expression in Monozyten nach der Inkubation mit Fruktose  $\pm$  Mithramycin A.**

(A) Einfluss einer 12-Stündigen Inkubation von Monozyten mit Fruktose (50  $\mu$ M) auf die SP1-mRNA-Expression sowie der (B) SP1-Proteinkonzentration. (C) TLR2-mRNA-Expression in Monozyten nach Inkubation mit Fruktose (50  $\mu$ M) und MIT (10 nM) für 12 Stunden.  $n = 3-4$ . \* $p \leq 0,05$ . Daten sind als MW  $\pm$  SEM dargestellt. MIT: Mithramycin A; SP1: Transkriptionsfaktor 1; TLR2: Toll-like Rezeptor 2.

Im Vergleich zu unbehandelten Zellen zeigten Fruktose behandelte Zellen eine signifikant erhöhte SP1-mRNA-Expression (Abbildung 9A) sowie eine gesteigerte SP1-Proteinkonzentration

(Abbildung 9B). Die Proteinkonzentration war etwa 1,4-fach und die mRNA-Expression rund 4,5-fach erhöht.

Um zu prüfen, ob die durch Fruktose induzierte TLR2-Expression SP1-abhängig ist, wurden Monozyten zusätzlich mit dem SP1-Inhibitor behandelt. Dabei zeigte sich, dass Zellen, die sowohl Fruktose als auch Mithramycin A erhielten, eine signifikant reduzierte TLR2-Expression im Vergleich zu ausschließlich Fruktose behandelten Zellen aufwiesen. Die Expression lag in diesen Zellen nur etwa 1,2-fach über dem Niveau unbehandelter Kontrollzellen (Abbildung 9C).

## 5. Diskussion

Der Konsum von Fruktose ist in den vergangenen Jahrzehnten deutlich angestiegen und steht zunehmend im Fokus der Forschung [76]. Zahlreiche Studien belegen, dass ein übermäßiger Fruktosekonsum mit der Entstehung metabolischer Erkrankungen, wie Adipositas, Insulinresistenz und MASLD assoziiert ist [8], [15], [46], [47], [60]. Diese Krankheitsbilder sind häufig von chronischen, niedriggradigen Entzündungsprozessen begleitet, die mit einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen einhergehen [52], [53], [54], [55]. Vor diesem Hintergrund wird diskutiert, dass Fruktose selbst immunmodulatorische Effekte entfalten könnte. Erste experimentelle Arbeiten stützen diese Annahme und zeigen, dass Fruktose die Funktion menschlicher Immunzellen verändert und proinflammatorische Signalwege aktiviert [77]. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind jedoch bislang nur unzureichend verstanden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Einfluss von Fruktose auf die TLR2-vermittelte Immunantwort in humanen Monozyten zu untersuchen und die Rolle des Transkriptionsfaktors SP1 als potenziellen Regulator dieser Prozesse zu charakterisieren.

### 5.1. Fruktose ist ein Regulator von GLUT5-mRNA in Monozyten

Im Rahmen der „ENDO-META-Studie“ konnte durch die Messung der Fruktoseplasmakonzentration zwei Stunden nach einmaliger Aufnahme von 40g Fruktose ein signifikanter Anstieg nachgewiesen werden, was die effektive Aufnahme und systemische Verfügbarkeit von Fruktose im systemischen Kreislauf bestätigt. Dieser Befund deckt sich mit früheren Studien, die gezeigt haben, dass Fruktose rasch intestinal über den spezifischen Transporter GLUT5 resorbiert wird [78], [79] und nach oraler Aufnahme größerer Mengen auch systemisch verfügbar ist [80], [81], [82]. Darüber hinaus wurde eine erhöhte GLUT5-mRNA-Expression in PBMCs der Probanden nach einer dreitägigen fruktosereichen Diät (25 E% Fruktose) festgestellt. Dies deutet auf eine adaptive Antwort der Zellen auf die gesteigerte Substratverfügbarkeit hin.

Um zu klären, in welchen Zelltypen Fruktose zu einer Induktion der GLUT5-mRNA führt, wurden Zellen aus Buffy-Coats gesunder Spender isoliert, mit Fruktose (50  $\mu$ M) behandelt und inkubiert. In unbehandelten Monozyten konnte bereits eine geringe Menge GLUT5-mRNA nachgewiesen werden, die nach Fruktoseexposition signifikant zunahm. Auch Fu et al. konnten GLUT5-mRNA in unbehandelten Monozyten nachweisen [83]. Eine weitere Studie, die den Einfluss von Fruktose auf den Metabolismus und die Funktion humaner Monozyten sowie muriner Makrophagen untersuchte, stützt ebenfalls das Vorhandensein von GLUT5 in diesen Zellen [84]. Zwar wurde der Transporter dort nicht direkt quantifiziert, jedoch lassen sich die beobachteten

fruktosespezifischen metabolischen Veränderungen nur durch einen aktiven Fruktosetransport plausibel erklären, wobei GLUT5 als einziger etablierter spezifischer Transporter [78], [85] den wahrscheinlichsten Mechanismus darstellt. Diese Annahme wird durch die eigenen Ergebnisse gestützt, in denen GLUT5-mRNA direkt in Monozyten nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu war in den untersuchten Lymphozyten keine GLUT5-mRNA nachweisbar. Dieser Befund widerspricht den Ergebnissen von Fu et al., die geringe Mengen GLUT5-mRNA auch in Lymphozyten feststellen konnten [83]. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten methodische Unterschiede im Versuchsaufbau sein, insbesondere die deutlich höhere eingesetzte Zellzahl (ca. 5,8-fach). Andernfalls könnte das Ausbleiben der Expression in Lymphozyten auch auf zellspezifische Unterschiede in der Regulation von GLUT5 hindeuten.

Insgesamt legen die Ergebnisse nahe, dass Monozyten in der Lage sind, systemisch verfügbare Fruktose über GLUT5 aufzunehmen. Für Lymphozyten konnte dies unter den hier gewählten Bedingungen hingegen nicht bestätigt werden, was an der geringen Zellzahl gelegen haben könnte.

## **5.2. Fruktose moduliert die TLR2-vermittelte Immunantwort über SP1-abhängige Mechanismen**

Zunehmende Evidenz deutet darauf hin, dass ein erhöhter Fruktosekonsum entzündliche Prozesse in Immunzellen fördern kann. So zeigten Jaiswal et al., dass hohe Fruktosekonzentrationen im Vergleich zu Glukose in vitro zu einer Aktivierung humaner dendritischer Zellen führen, was sich in einer gesteigerten Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  widerspiegelte. Darüber hinaus wurde eine verstärkte Sekretion von INF- $\gamma$  durch T-Zellen beobachtet, was auf mögliche indirekte Effekte von Fruktose auf die adaptive Immunantwort hinweist [77]. Auch in humanen Monozyten konnte nach Fruktosebehandlung eine erhöhte mRNA-Expression für TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  festgestellt werden [86]. Diese Befunde verdeutlichen, dass Fruktose direkt zur Induktion entzündlicher Signalwege beitragen kann. Weniger untersucht ist hingegen die Frage ob Fruktose Immunzellen auch für bakterielle Stimuli sensibilisiert. In diesem Zusammenhang berichten Jones et al., dass murine Makrophagen und humane Monozyten nach kurzzeitiger Fruktoseexposition ex vivo eine verstärkte Reaktion auf LPS zeigten, die sich in einer signifikant höheren Sekretion von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  im Vergleich zu glukosebehandelten Zellen äußerte [84].

In der vorliegenden Arbeit wurden Monozyten zunächst für 12 Stunden mit Fruktose (50  $\mu$ M) vorbehandelt und anschließend für 2 Stunden mit LTA (10  $\mu$ g/mL) stimuliert. Die kombinierte Behandlung führte zu einer signifikant erhöhten mRNA-Expression von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  im

Vergleich zu Zellen, die ausschließlich mit Fruktose behandelt wurden. Diese Befunde sprechen für eine durch Fruktose induzierte Sensitivierung gegenüber bakteriellen Bestandteilen wie LTA. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Studien und deuten darauf hin, dass Fruktose die inflammatorische Reaktionsbereitschaft von Monozyten verstärken kann.

Auf Proteinebene spiegelten sich die Ergebnisse so jedoch nicht direkt wider. Zwar waren die mittleren Sekretionswerte von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  in den mit LTA stimulierten Zellen leicht erhöht im Vergleich zu den ausschließlich fruktosebehandelten Zellen, allerdings erreichte dieser Unterschied keine statistische Signifikanz. Für IL-6 ließ sich dieser Trend jedoch nicht beobachten. Dies könnte daran liegen, dass TNF- $\alpha$  tendenziell früher sezerniert wird als andere Interleukine wie IL-6 [87]. Diskrepanzen zwischen mRNA- und Proteinebene sind nicht ungewöhnlich und können unter anderem durch (post)transkriptionale Mechanismen, Translationskontrolle oder Abbauprozesse erklärt werden [88]. Zudem könnte der gewählte Messzeitpunkt von 2 Stunden nach Stimulation zu früh gewesen sein, um Unterschiede auf Proteinebene detektieren zu können. Der maximale Ausschüttungspunkt von Zytokinen tritt häufig erst später auf. So erreicht TNF- $\alpha$  in humanen Monozyten erst nach etwa 12 Stunden seinen Peak, während IL-6 über 24 Stunden hinweg langsamer, aber konstant ansteigt [87]. Letztlich ist denkbar, dass ein fruktoseinduzierter Einfluss auf den zellulären Energiestoffwechsel, wie etwa ATP-Depletion, die Translation zusätzlich beeinflusst. Ein solcher Mechanismus könnte erklären, warum trotz erhöhter mRNA-Spiegel keine signifikante Zunahme der Proteinsekretion beobachtet wurde. Eine mögliche ATP-Depletion durch den Fruktosestoffwechsel könnte über AMPK-vermittelte Signalwege die Translation beeinflussen, was zu einer reduzierten Proteinproduktion beitragen kann [89], [90], [91], [92], [93].

Trotz dieser Einschränkungen weisen die beobachteten Veränderungen auf mRNA-Ebene darauf hin, dass Fruktose die inflammatorische Reaktionsbereitschaft von Monozyten grundsätzlich erhöht. Um die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen dieser Sensitivierung zu identifizieren, wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob Fruktose die Expression von TLR2 moduliert. Ergebnisse früherer Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigten bereits, dass ein erhöhter Fruktosekonsum, nicht jedoch Glukose, mit einer gesteigerten Expression von TLR2-mRNA in PBMCs assoziiert ist [58]. In den hier präsentierten Experimenten konnte dieser Befund auch in isolierten Monozyten bestätigt werden. Eine 12-stündige Inkubation mit Fruktose (50  $\mu$ M) führte zu einer signifikant höheren TLR2-mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die fruktoseinduzierte Sensitivierung gegenüber LTA zumindest teilweise auf eine Hochregulation von TLR2 beruht. Zur weiteren Aufklärung der zugrunde liegenden Signalwege wurde der Transkriptionsfaktor SP1 als potenzieller Mediator untersucht.

SP1 ist ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor [94], der an die Promotorregion zahlreicher Gene bindet, darunter TLR2 [74], [75] und IL-6 [95], [96]. Zudem bestehen Hinweise auf eine funktionelle Interaktion von SP1 mit NF- $\kappa$ B [63], [96]. Frühere Arbeiten belegen, dass die Aktivität von SP1 durch metabolische Stressoren wie Hyperglykämie oder oxidativen Stress moduliert werden kann [97], [98]. Für Fruktose lag ein solcher Zusammenhang bislang nicht vor. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten jedoch darauf hin, dass Fruktose über SP1-vermittelte Mechanismen die Expression von TLR2 reguliert. So kam es zu einer signifikanten Zunahme sowohl der SP1-mRNA als auch der Proteinexpression nach Fruktoseexposition (50  $\mu$ M). Zudem führte die Inhibition von SP1 durch Mithramycin A (10 nM) zu einer Normalisierung der TLR2-mRNA-Spiegel, was auf eine kausale Beteiligung von SP1 an der fruktosevermittelten TLR2-Hochregulation hinweist.

Ein möglicher Mechanismus hierfür könnte in der durch Fruktose gesteigerten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) liegen [99]. Es gibt Hinweise darauf, dass SP1 empfindlich auf ROS reagiert, wobei seine DNA-Bindungsaktivität durch redoxabhängige Modifikationen posttranslational reguliert werden kann. Hierbei scheint besonders das Thioredoxin-System eine wichtige Rolle einzunehmen, da es die Aktivität von SP1 moduliert und damit die Expression zahlreicher Zielgene beeinflusst [100]. Da der Fruktosemetabolismus mit einer erhöhten ROS-Produktion einhergehen kann [99], [101], ist eine redoxabhängige Kontrolle von SP1 auch in Monozyten denkbar. Darüber hinaus könnten epigenetische Mechanismen beteiligt sein. So induzierte akute Fruktosezufuhr Histonacetylierungen am GLUT5-Gen in Mäusen [102], während chronischer Fruktosekonsum mit DNA-Methylierungsänderungen metabolischer Gene wie PPAR $\alpha$  und CPT1A verknüpft wurde [103]. Ob solche Mechanismen auch die SP1-abhängige Regulation immunologischer Gene wie TLR2 beeinflussen, bleibt bislang ungeklärt und Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Daten, dass Fruktose die proinflammatorische Reaktionsbereitschaft von Monozyten erhöht, indem sie über eine SP1-abhängige Hochregulation von TLR2 zu einer Sensitivierung gegenüber bakteriellen Stimuli beiträgt. Diese Mechanismen könnten im Kontext bakterieller Infektionen, insbesondere durch grampositive Erreger, zu einer überschießenden oder dysregulierten Immunantwort führen. Auch wenn Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Fruktoseexposition und immunologischen Dysfunktionen bestehen, sind die zugrunde liegenden Mechanismen bislang nicht vollständig verstanden. Weitere Studien sind erforderlich, um diese Zusammenhänge im pathophysiologischen Kontext einzuordnen.

### 5.3. Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern deutliche Hinweise darauf, dass Fruktose immunmodulierende Effekte auf Monozyten entfalten kann. Dies äußert sich sowohl in einer vermehrten Expression des Fruktosetransporters GLUT5 als auch von TLR2 sowie in einer gesteigerten Expression proinflammatorischer Zytokine. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Fruktose die Sensitivität der Zellen gegenüber LTA erhöht und so eine verstärkte Immunantwort hervorruft. Ein weiterer Befund dieser Arbeit ist, dass die fruktoseinduzierte Hochregulation von TLR2 offenbar vom Transkriptionsfaktor SP1 abhängig ist. Wie Fruktose oder dessen Metabolite die Aktivität von SP1 beeinflussen, ist bislang unklar. Denkbar wäre eine Modulation über epigenetische Mechanismen oder redoxabhängige Veränderungen, was jedoch in weiteren Studien überprüft werden muss.

Zukünftige Arbeiten sollten die hier gewonnen Erkenntnisse in vivo validieren, etwa in Tiermodellen mit fruktosereicher Diät oder in Patientenkohorten mit metabolischem Syndrom. Zudem sollte die Rolle von SP1 weiter untersucht werden, insbesondere im Hinblick auf epigenetische Regulation. Auch die Beteiligung anderer Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B, AP-1 oder ChREBP sollte geprüft werden. Schließlich könnte eine Ausweitung der Analysen auf weitere Immunzelltypen (z.B. dendritische Zellen, Neutrophile) zusätzliche Aufschlüsse über die fruktoseabhängige Immunmodulation liefern.

## Zusammenfassung

In den letzten Jahren hat das wissenschaftliche Interesse an der Verbindung zwischen Ernährung und Immunfunktion deutlich zugenommen. Insbesondere der übermäßige Konsum von Fruktose wird mit der Entstehung metabolischer Erkrankungen in Verbindung gebracht. Diese sind häufig durch einen chronisch niedriggradigen Entzündungszustand und erhöhter Infektanfälligkeit gekennzeichnet. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass Fruktose Entzündungsprozesse nicht nur indirekt über metabolische Dysfunktionen fördern kann, sondern auch direkt in immunologische Signalwege eingreift. Dabei rückte insbesondere der Toll-like-Rezeptor 2 (TLR2) in den Fokus, der die Immunantwort auf grampositive bakterielle Toxine vermittelt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Einfluss von Fruktose auf die TLR2-vermittelte Immunantwort in humanen Monozyten zu charakterisieren und die Rolle von SP1 als potenziellen Regulator näher zu untersuchen. Die experimentellen Arbeiten basierten auf zwei Ansätzen. Zum einen wurden Daten aus einer Humanstudie der eigenen Arbeitsgruppe ausgewertet, in der die Plasmafruktokonzentration nach einmaliger Aufnahme von 40g Fruktose sowie die GLUT5-mRNA-Expression in PBMCs nach dreitägiger fruktosereicher Ernährung (25 E% der Gesamtkalorien) bestimmt wurden. Zum anderen wurden Buffy-Coats gesunder Spender verwendet, um Monozyten und Lymphozyten zu isolieren und in vitro zu untersuchen. Monozyten und Lymphozyten wurden mit Fruktose (50  $\mu$ M) behandelt und für 12 Stunden inkubiert. Dabei zeigte sich, dass die Expression von GLUT5-mRNA in Monozyten, nicht jedoch in Lymphozyten nachweisbar war und in Monozyten nach Fruktoseinkubation signifikant erhöht vorlag. In weiteren Versuchen an Monozyten wurden diese zum einen für 12 Stunden mit Fruktose (50  $\mu$ M) gefolgt von einer 2-Stündigen Stimulation mit Lipoteichonsäure (10  $\mu$ g/ml) und zum anderen für 12 Stunden mit Fruktose (50  $\mu$ M)  $\pm$  Mithramycin A (0,1 – 100 nM) behandelt. Fruktose verstärkte die durch LTA ausgelöste Immunantwort, was sich in einer gesteigerten Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  auf mRNA-, nicht jedoch auf Proteinebene zeigte. Schließlich konnte gezeigt werden, dass Fruktose die Expression von SP1 erhöht und dass die Inhibition von SP1 durch Mithramycin A die fruktoseinduzierte TLR2-Expression normalisiert. Zusammenfassend liefern die Ergebnisse dieser Arbeit deutliche Hinweise darauf, dass Fruktose immunmodulierende Effekte auf Monozyten entfalten kann. Diese Effekte äußern sich in einer verstärkten Expression des Fruktosetransporters GLUT5, einer SP1-abhängigen Hochregulation von TLR2 sowie einer gesteigerten Produktion proinflammatorischer Zytokine. Darüber hinaus sensibilisiert Fruktose die Zellen gegenüber bakteriellen Stimuli wie LTA und verstärkt so die Immunantwort. Die molekularen Mechanismen, über die Fruktose oder ihre Metabolite die Aktivität von SP1 beeinflussen, sind bislang unklar und bedürfen weiterer Forschung.

## Summary

In recent years, scientific interest in the relationship between nutrition and immune function has grown significantly. Specifically, excessive fructose consumption has been linked to the development of metabolic diseases. These conditions are often characterised by a state of chronic low-grade inflammation and increased susceptibility to infection. Previous studies have shown that fructose can promote inflammatory processes not only indirectly via metabolic dysfunction, but also directly by interfering with immunological signalling pathways. The focus has been in particular on Toll-like receptor 2 (TLR2), which mediates the immune response to Gram-positive bacterial toxins. The aim of the present study was therefore to characterise the effect of fructose on the TLR2-mediated immune response in human monocytes and to investigate the role of SP1 as a potential regulator in more detail. The experimental work was based on two approaches. Firstly, data from a human study conducted by our own research group was analysed, in which plasma fructose concentrations were determined after a single intake of 40 g fructose, as well as GLUT5 mRNA expressions in PBMCs after three days of a fructose-rich diet (25 E% of total calories). Secondly, buffy coats from healthy donors were used to isolate monocytes and lymphocytes for in vitro experiments. Monocytes and lymphocytes were treated with fructose (50  $\mu$ M) and incubated for 12 hours. The results showed that GLUT5 mRNA was detectable in monocytes but not in lymphocytes and was significantly increased in monocytes after fructose incubation. In further experiments, monocytes were (1) treated for 12 hours with fructose (50  $\mu$ M) followed by a 2 hour long stimulation with lipoteichoic acid (10  $\mu$ g/ml) and (2) treated for 12 hours with fructose (50  $\mu$ M)  $\pm$  mithramycin A (0.1 – 100 nM). Fructose enhanced the LTA-induced immune response, which was reflected in increased expression of the proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  at the mRNA level, but not at the protein level. Finally, it was shown that fructose increases the expression of SP1 and that inhibition of SP1 by mithramycin A normalises fructose-induced TLR2 expression. In summary, the results of this study provide clear evidence that fructose can exert immunomodulatory effects on monocytes. These effects manifest themselves in increased expression of the fructose transporter GLUT5, SP1-dependent upregulation of TLR2, and increased production of proinflammatory cytokines. In addition, fructose sensitises cells to bacterial stimuli such as LTA, thereby enhancing the immune response. The molecular mechanisms by which fructose or its metabolites influence SP1 activity remain unclear and require further research.

## Literaturverzeichnis

- [1] A. Saraiva, C. Carrascosa, D. Raheem, F. Ramos, und A. Raposo, „Natural Sweeteners: The Relevance of Food Naturalness for Consumers, Food Security Aspects, Sustainability and Health Impacts“, *Int J Environ Res Public Health*, Bd. 17, Nr. 17, S. 6285, Sep. 2020, doi: 10.3390/IJERPH17176285.
- [2] X. Li u. a., „Fructose consumption from different food sources and cardiometabolic biomarkers: cross-sectional associations in US men and women“, *Am J Clin Nutr*, Bd. 117, Nr. 3, S. 490–498, März 2023, doi: 10.1016/J.AJCNUT.2023.01.006.
- [3] S. Stricker, S. Rudloff, A. Geier, A. Steveling, E. Roeb, und K. P. Zimmer, „Fructose Consumption—Free Sugars and Their Health Effects“, *Dtsch Arztebl Int*, Bd. 118, Nr. 5, S. 71, Feb. 2021, doi: 10.3238/ARZTEBL.M2021.0010.
- [4] J. S. White, „Straight talk about high-fructose corn syrup: what it is and what it ain't“, *Am J Clin Nutr*, Bd. 88, Nr. 6, S. 1716S-1721S, Dez. 2008, doi: 10.3945/AJCN.2008.25825B.
- [5] A. I. Cozma und J. L. Sievenpiper, „The Role of Fructose, Sucrose and High-fructose Corn Syrup in Diabetes“, *Eur Endocrinol*, Bd. 10, Nr. 1, S. 51, 2014, doi: 10.17925/EE.2014.10.01.51.
- [6] A. L. Mokale Kognou, S. Shrestha, Z. Jiang, C. (Charles) Xu, F. Sun, und W. Qin, „High-fructose corn syrup production and its new applications for 5-hydroxymethylfurfural and value-added furan derivatives: Promises and challenges“, *Journal of Bioresources and Bioproducts*, Bd. 7, Nr. 3, S. 148–160, Aug. 2022, doi: 10.1016/J.JOBAB.2022.03.004.
- [7] A. K. Azevedo-Martins, M. P. Santos, J. Abayomi, N. J. R. Ferreira, und F. S. Evangelista, „The Impact of Excessive Fructose Intake on Adipose Tissue and the Development of Childhood Obesity“, *Nutrients*, Bd. 16, Nr. 7, S. 939, März 2024, doi: 10.3390/NU16070939.
- [8] S. Jung, H. Bae, W. S. Song, und C. Jang, „Dietary Fructose and Fructose-Induced Pathologies“, *Annu Rev Nutr*, Bd. 42, Nr. Volume 42, 2022, S. 45–66, Aug. 2022, doi: 10.1146/ANNUREV-NUTR-062220-025831/CITE/REFWORKS.
- [9] „Guideline: sugars intake for adults and children“. Zugriffen: 26. Februar 2025. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549028>
- [10] B. Geidl-Flueck und P. A. Gerber, „Fructose drives de novo lipogenesis affecting metabolic health“, *J Endocrinol*, Bd. 257, Nr. 2, S. e220270, Mai 2023, doi: 10.1530/JOE-22-0270.

- [11] M. Kohlmeier, „How Nutrients are Affected by Genetics“, *Nutrigenetics*, S. 103–221, Jan. 2013, doi: 10.1016/B978-0-12-385900-6.00004-6.
- [12] N. L. Keim und P. J. Havel, „FRUCTOSE“, *Encyclopedia of Human Nutrition*, S. 351–356, Jan. 2005, doi: 10.1016/B0-12-226694-3/00141-1.
- [13] G. M. Preston und R. A. Calle, „Elevated Serum Sorbitol and not Fructose in Type 2 Diabetic Patients“, *Biomark Insights*, Bd. 5, Nr. 5, S. 33, 2010, doi: 10.4137/BMI.S4530.
- [14] P. N. Wahjudi, M. E. Patterson, S. Lim, J. K. Yee, C. S. Mao, und W. N. P. Lee, „Measurement of Glucose and Fructose in Clinical Samples Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry“, *Clin Biochem*, Bd. 43, Nr. 1–2, S. 198, Jan. 2009, doi: 10.1016/J.CLINBIOCHEM.2009.08.028.
- [15] Y. N. Shi, Y. J. Liu, Z. Xie, und W. J. Zhang, „Fructose and metabolic diseases: too much to be good“, *Chin Med J (Engl)*, Bd. 134, Nr. 11, S. 1276, Juni 2021, doi: 10.1097/CM9.0000000000001545.
- [16] S. A. Hannou, D. E. Haslam, N. M. McKeown, und M. A. Herman, „Fructose metabolism and metabolic disease“, *J Clin Invest*, Bd. 128, Nr. 2, S. 545, Feb. 2018, doi: 10.1172/JCI96702.
- [17] T. Jensen u. a., „Fructose and Sugar: A Major Mediator of Nonalcoholic Fatty Liver Disease“, *J Hepatol*, Bd. 68, Nr. 5, S. 1063, Mai 2018, doi: 10.1016/J.JHEP.2018.01.019.
- [18] M. Lodge, R. Dykes, und A. Kennedy, „Regulation of Fructose Metabolism in Nonalcoholic Fatty Liver Disease“, *Biomolecules*, Bd. 14, Nr. 7, S. 845, Juli 2024, doi: 10.3390/BIOM14070845.
- [19] A. Federico u. a., „The Role of Fructose in Non-Alcoholic Steatohepatitis: Old Relationship and New Insights“, *Nutrients*, Bd. 13, Nr. 4, S. 1314, Apr. 2021, doi: 10.3390/NU13041314.
- [20] D. M. Zhang, R. Q. Jiao, und L. D. Kong, „High Dietary Fructose: Direct or Indirect Dangerous Factors Disturbing Tissue and Organ Functions“, *Nutrients*, Bd. 9, Nr. 4, S. 335, Apr. 2017, doi: 10.3390/NU9040335.
- [21] G. V. Flores Monar, C. Sanchez Cruz, und E. Calderon Martinez, „Mindful Eating: A Deep Insight Into Fructose Metabolism and Its Effects on Appetite Regulation and Brain Function“, *J Nutr Metab*, Bd. 2025, Nr. 1, S. 5571686, Jan. 2025, doi: 10.1155/JNME/5571686.

- [22] M. A. Febbraio und M. Karin, „Sweet death”: Fructose as a metabolic toxin that targets the gut-liver axis“, *Cell Metab*, Bd. 33, Nr. 12, S. 2316–2328, Dez. 2021, doi: 10.1016/J.CMET.2021.09.004.
- [23] D. D. Chaplin, „Overview of the immune response“, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Bd. 125, Nr. 2 SUPPL. 2, S. S3–S23, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.jaci.2009.12.980.
- [24] L. Oliveira-Nascimento, P. Massari, und L. M. Wetzler, „The role of TLR2 in infection and immunity“, *Front Immunol*, Bd. 3, Nr. APR, S. 20479, Apr. 2012, doi: 10.3389/fimmu.2012.00079.
- [25] T. Hato, T. M. El-Achkar, und P. C. Dagher, „Sisters in arms: myeloid and tubular epithelial cells shape renal innate immunity“, *Am J Physiol Renal Physiol*, Bd. 304, Nr. 10, S. F1243, 2013, doi: 10.1152/AJPRENAL.00101.2013.
- [26] K. R. Balka und D. De Nardo, „Understanding early TLR signaling through the Myddosome“, *J Leukoc Biol*, Bd. 105, Nr. 2, S. 339–351, Jan. 2019, doi: 10.1002/JLB.MR0318-096R.
- [27] K. S. Ikuta u. a., „Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019“, *Lancet*, Bd. 400, Nr. 10369, S. 2221, Dez. 2022, doi: 10.1016/S0140-6736(22)02185-7.
- [28] A. R. Hauser, J. Meccas, und D. T. Moir, „Beyond Antibiotics: New Therapeutic Approaches for Bacterial Infections“, *Clinical Infectious Diseases*, Bd. 63, Nr. 1, S. 89–95, Juli 2016, doi: 10.1093/CID/CIW200.
- [29] M. Kolář, „Bacterial Infections, Antimicrobial Resistance and Antibiotic Therapy“, *Life* 2022, Vol. 12, Page 468, Bd. 12, Nr. 4, S. 468, März 2022, doi: 10.3390/LIFE12040468.
- [30] M. Naghavi u. a., „Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050“, *The Lancet*, Bd. 404, Nr. 10459, S. 1199–1226, Sep. 2024, doi: 10.1016/S0140-6736(24)01867-1.
- [31] M. Rajagopal und S. Walker, „Envelope Structures of Gram-Positive Bacteria“, *Curr Top Microbiol Immunol*, Bd. 404, S. 1, Jan. 2017, doi: 10.1007/82\_2015\_5021.
- [32] J. F. Fisher und S. Mobashery, „Constructing and deconstructing the bacterial cell wall“, *Protein Sci*, Bd. 29, Nr. 3, S. 629, März 2019, doi: 10.1002/PRO.3737.
- [33] M. Rohde, „The Gram-Positive Bacterial Cell Wall“, *Microbiol Spectr*, Bd. 7, Nr. 3, Mai 2019, doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0044-2018.

- [34] R. K. Ernst und C. E. Chandler, „Bacterial lipids: powerful modifiers of the innate immune response“, *F1000Res*, Bd. 6, S. F1000 Faculty Rev-1334, 2017, doi: 10.12688/F1000RESEARCH.11388.1.
- [35] T. Kawasaki und T. Kawai, „Toll-like receptor signaling pathways“, *Front Immunol*, Bd. 5, Nr. SEP, S. 112681, Sep. 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00461.
- [36] T. Duan, Y. Du, C. Xing, H. Y. Wang, und R. F. Wang, „Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity“, *Front Immunol*, Bd. 13, S. 812774, März 2022, doi: 10.3389/FIMMU.2022.812774.
- [37] Z. Sepehri, Z. Kiani, A. A. Nasiri, und F. Kohan, „Toll-like receptor 2 and type 2 diabetes“, *Cell Mol Biol Lett*, Bd. 21, Nr. 1, S. 2, Juli 2016, doi: 10.1186/S11658-016-0002-4.
- [38] K. Colleselli, A. Stierschneider, und C. Wiesner, „An Update on Toll-like Receptor 2, Its Function and Dimerization in Pro- and Anti-Inflammatory Processes“, *Int J Mol Sci*, Bd. 24, Nr. 15, S. 12464, Aug. 2023, doi: 10.3390/IJMS241512464.
- [39] J. van Bergenhenegouwen u. a., „TLR2 & Co: a critical analysis of the complex interactions between TLR2 and coreceptors“, *J Leukoc Biol*, Bd. 94, Nr. 5, S. 885–902, Nov. 2013, doi: 10.1189/jlb.0113003.
- [40] S. V. Zubova u. a., „*Rhodobacter capsulatus* PG Lipopolysaccharide Blocks the Effects of a Lipoteichoic Acid, a Toll-Like Receptor 2 Agonist“, *Acta Naturae*, Bd. 14, Nr. 4, S. 69–74, Dez. 2022, doi: 10.32607/actanaturae.11747.
- [41] N. J. Nilsen u. a., „Cellular trafficking of lipoteichoic acid and Toll-like receptor 2 in relation to signaling; role of CD14 and CD36“, *J Leukoc Biol*, Bd. 84, Nr. 1, S. 280, Juli 2008, doi: 10.1189/JLB.0907656.
- [42] S. Rajpoot u. a., „TIRAP in the Mechanism of Inflammation“, *Front Immunol*, Bd. 12, S. 697588, Juli 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.697588.
- [43] I. Belhaouane, E. Hoffmann, M. Chamaillard, P. Brodin, und A. Machelart, „Paradoxical Roles of the MAL/Tirap Adaptor in Pathologies“, *Front Immunol*, Bd. 11, S. 569127, Sep. 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.569127.
- [44] B. Verstak, K. Nagpal, S. P. Bottomley, D. T. Golenbock, P. J. Hertzog, und A. Mansell, „MyD88 Adapter-like (Mal)/TIRAP Interaction with TRAF6 Is Critical for TLR2- and TLR4-mediated NF- $\kappa$ B Proinflammatory Responses“, *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 284, Nr. 36, S. 24192–24203, Sep. 2009, doi: 10.1074/JBC.M109.023044.

- [45] B. A. Napier *u. a.*, „Western diet regulates immune status and the response to LPS-driven sepsis independent of diet-associated microbiome“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 116, Nr. 9, S. 3688–3694, Feb. 2019, doi: 10.1073/PNAS.1814273116/-/DCSUPPLEMENTAL.
- [46] M. A. Herman und V. T. Samuel, „The sweet path to metabolic demise: fructose and lipid synthesis“, *Trends Endocrinol Metab*, Bd. 27, Nr. 10, S. 719, Okt. 2016, doi: 10.1016/J.TEM.2016.06.005.
- [47] X. Ma *u. a.*, „Excessive intake of sugar: An accomplice of inflammation“, *Front Immunol*, Bd. 13, S. 988481, Aug. 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.988481.
- [48] G. S. Hotamisligil, „Inflammation and metabolic disorders“, *Nature*, Bd. 444, Nr. 7121, S. 860–867, Dez. 2006, doi: 10.1038/nature05485.
- [49] G. Fahed *u. a.*, „Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021“, *Int J Mol Sci*, Bd. 23, Nr. 2, S. 786, Jan. 2022, doi: 10.3390/IJMS23020786.
- [50] M. van de Vyver, „Immunology of chronic low-grade inflammation: relationship with metabolic function“, *Journal of Endocrinology*, Bd. 257, Nr. 1, Apr. 2023, doi: 10.1530/JOE-22-0271.
- [51] C. N. Lumeng und A. R. Saltiel, „Inflammatory links between obesity and metabolic disease“, *J Clin Invest*, Bd. 121, Nr. 6, S. 2111, Juni 2011, doi: 10.1172/JCI57132.
- [52] J. Krznarić und A. Vince, „The Role of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Infections“, *Life*, Bd. 12, Nr. 12, S. 2052, Dez. 2022, doi: 10.3390/LIFE12122052.
- [53] J. P. Donnelly *u. a.*, „Association of Diabetes and Insulin Therapy With Risk of Hospitalization for Infection and 28-Day Mortality Risk“, *Clin Infect Dis*, Bd. 64, Nr. 4, S. 435, Feb. 2016, doi: 10.1093/CID/CIW738.
- [54] G. Pugliese, A. Liccardi, C. Graziadio, L. Barrea, G. Muscogiuri, und A. Colao, „Obesity and infectious diseases: pathophysiology and epidemiology of a double pandemic condition“, *Int J Obes*, Bd. 46, Nr. 3, S. 449–465, März 2022, doi: 10.1038/s41366-021-01035-6.
- [55] J. R. Petrie, T. J. Guzik, und R. M. Touyz, „Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease: Clinical Insights and Vascular Mechanisms“, *Can J Cardiol*, Bd. 34, Nr. 5, S. 575, Mai 2018, doi: 10.1016/J.CJCA.2017.12.005.
- [56] N. Jones *u. a.*, „Fructose reprogrammes glutamine-dependent oxidative metabolism to support LPS-induced inflammation“, *Nature Communications 2021 12:1*, Bd. 12, Nr. 1, S. 1–13, Feb. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-21461-4.

- [57] T. Nakagawa *u. a.*, „A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome“, *Am J Physiol Renal Physiol*, Bd. 290, Nr. 3, S. 625–631, 2006, doi: 10.1152/ajprenal.00140.2005.
- [58] A. Nier, A. Brandt, D. Rajcic, T. Bruns, und I. Bergheim, „Short-Term Isocaloric Intake of a Fructose- but not Glucose-Rich Diet Affects Bacterial Endotoxin Concentrations and Markers of Metabolic Health in Normal Weight Healthy Subjects“, *Mol Nutr Food Res*, Bd. 63, Nr. 6, S. 1800868, März 2019, doi: 10.1002/MNFR.201800868.
- [59] J. Zhang, B. Diao, X. Lin, J. Xu, und F. Tang, „TLR2 and TLR4 mediate an activation of adipose tissue renin-angiotensin system induced by uric acid“, *Biochimie*, Bd. 162, S. 125–133, Juli 2019, doi: 10.1016/J.BIOCHI.2019.04.013.
- [60] X. Li *u. a.*, „Fructose consumption from different food sources and cardiometabolic biomarkers: cross-sectional associations in US men and women“, *Am J Clin Nutr*, Bd. 117, Nr. 3, S. 490–498, März 2023, doi: 10.1016/J.AJCNUT.2023.01.006.
- [61] H. Cheng, J. Zhou, Y. Sun, Q. Zhan, und D. Zhang, „High fructose diet: A risk factor for immune system dysregulation“, *Hum Immunol*, Bd. 83, Nr. 6, S. 538–546, Juni 2022, doi: 10.1016/J.HUMIMM.2022.03.007.
- [62] V. Haehnel, L. Schwarzfischer, M. J. Fenton, und M. Rehli, „Transcriptional regulation of the human toll-like receptor 2 gene in monocytes and macrophages“, *J Immunol*, Bd. 168, Nr. 11, S. 5629–5637, Juni 2002, doi: 10.4049/JIMMUNOL.168.11.5629.
- [63] T. Wang, W. P. Lafuse, und B. S. Zwillig, „NFκB and Sp1 Elements Are Necessary for Maximal Transcription of Toll-like Receptor 2 Induced by Mycobacterium avium“, *The Journal of Immunology*, Bd. 167, Nr. 12, S. 6924–6932, Dez. 2001, doi: 10.4049/JIMMUNOL.167.12.6924.
- [64] P. Chomczynski und N. Sacchi, „Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction“, *Anal Biochem*, Bd. 162, Nr. 1, S. 156–159, Apr. 1987, doi: 10.1016/0003-2697(87)90021-2.
- [65] M. Jansohn und S. Rothhämel, *Gentechnische Methoden*. Spektrum Akademischer Verlag, 2012. doi: 10.1007/978-3-8274-2430-3.
- [66] M. Kubista *u. a.*, „The real-time polymerase chain reaction“, *Mol Aspects Med*, Bd. 27, Nr. 2–3, S. 95–125, Apr. 2006, doi: 10.1016/J.MAM.2005.12.007.

- [67] K. J. Livak und T. D. Schmittgen, „Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method“, *Methods*, Bd. 25, Nr. 4, S. 402–408, Dez. 2001, doi: 10.1006/METH.2001.1262.
- [68] S. D. Gan und K. R. Patel, „Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay“, *Journal of Investigative Dermatology*, Bd. 133, Nr. 9, S. 1–3, Sep. 2013, doi: 10.1038/jid.2013.287.
- [69] „R&D Systems. (2025). DuoSet® ELISA Development System Kit: Human IL-6 [Datasheet]“. Zugriffen: 12. Juli 2025. [Online]. Verfügbar unter: <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/dy206.pdf?v=20251021>
- [70] „R&D Systems. (2025). DuoSet® ELISA Development System Kit: Human IL-1 $\beta$  [Datasheet]“. Zugriffen: 12. Juli 2025. [Online]. Verfügbar unter: <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/dy201.pdf?v=20251021>
- [71] „R&D Systems. (2025). DuoSet® ELISA Development System Kit: Human TNF- $\alpha$  [Datasheet]“. Zugriffen: 12. Juli 2025. [Online]. Verfügbar unter: <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/dy210.pdf?v=20251021>
- [72] B. T. Kurien und R. H. Scofield, „Western blotting“, *Methods*, Bd. 38, Nr. 4, S. 283–293, Apr. 2006, doi: 10.1016/J.YMETH.2005.11.007.
- [73] R. Wiesner, C. Scheller, F. Krebs, H. Wätzig, und I. Oltmann-Norden, „A comparative study of CE-SDS, SDS-PAGE, and Simple Western: Influences of sample preparation on molecular weight determination of proteins“, *Electrophoresis*, Bd. 42, Nr. 3, S. 206–218, Feb. 2021, doi: 10.1002/ELPS.202000199.
- [74] T. Furuta *u. a.*, „DNA demethylation-dependent enhancement of toll-like receptor-2 gene expression in cystic fibrosis epithelial cells involves SP1-activated transcription“, *BMC Mol Biol*, Bd. 9, Nr. 1, S. 39, 2008, doi: 10.1186/1471-2199-9-39.
- [75] V. Haehnel, L. Schwarzfischer, M. J. Fenton, und M. Rehli, „Transcriptional Regulation of the Human Toll-Like Receptor 2 Gene in Monocytes and Macrophages“, *The Journal of Immunology*, Bd. 168, Nr. 11, S. 5629–5637, Juni 2002, doi: 10.4049/JIMMUNOL.168.11.5629.
- [76] M. B. Vos und J. E. Lavine, „Dietary fructose in nonalcoholic fatty liver disease“, *Hepatology*, Bd. 57, Nr. 6, S. 2525–2531, Juni 2013, doi: 10.1002/HEP.26299.

- [77] N. Jaiswal, S. Agrawal, und A. Agrawal, „High fructose-induced metabolic changes enhance inflammation in human dendritic cells“, *Clin Exp Immunol*, Bd. 197, Nr. 2, S. 237, Aug. 2019, doi: 10.1111/CEI.13299.
- [78] S. Barone *u. a.*, „Slc2a5 (Glut5) Is Essential for the Absorption of Fructose in the Intestine and Generation of Fructose-induced Hypertension“, *J Biol Chem*, Bd. 284, Nr. 8, S. 5056, Feb. 2009, doi: 10.1074/JBC.M808128200.
- [79] V. Douard und R. P. Ferraris, „Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease“, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, Bd. 295, Nr. 2, S. E227, Aug. 2008, doi: 10.1152/AJPENDO.90245.2008.
- [80] C. Jang *u. a.*, „The Small Intestine Converts Dietary Fructose into Glucose and Organic Acids“, *Cell Metab*, Bd. 27, Nr. 2, S. 351, Feb. 2018, doi: 10.1016/J.CMET.2017.12.016.
- [81] M. Gladding, X. Shen, M. P. Snyder, P. J. Havel, und S. H. Adams, „Interindividual Variability in Postprandial Plasma Fructose Patterns in Adults“, *Nutrients* 2024, Vol. 16, Page 3079, Bd. 16, Nr. 18, S. 3079, Sep. 2024, doi: 10.3390/NU16183079.
- [82] F. Theytaz *u. a.*, „Metabolic Fate of Fructose Ingested with and without Glucose in a Mixed Meal“, *Nutrients*, Bd. 6, Nr. 7, S. 2632, Juli 2014, doi: 10.3390/NU6072632.
- [83] Y. Fu, L. Maianu, B. R. Melbert, und W. T. Garvey, „Facilitative glucose transporter gene expression in human lymphocytes, monocytes, and macrophages: a role for GLUT isoforms 1, 3, and 5 in the immune response and foam cell formation“, *Blood Cells Mol Dis*, Bd. 32, Nr. 1, S. 182–190, Jan. 2004, doi: 10.1016/J.BCMD.2003.09.002.
- [84] N. Jones *u. a.*, „Fructose reprogrammes glutamine-dependent oxidative metabolism to support LPS-induced inflammation“, *Nat Commun*, Bd. 12, Nr. 1, S. 1209, Dez. 2021, doi: 10.1038/S41467-021-21461-4.
- [85] C. F. Burant, „Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5.“, *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 267, Nr. 21, S. 14523–14526, Juli 1992, doi: 10.1016/S0021-9258(18)42067-4.
- [86] P. Lin, Q. Ren, Q. Wang, und J. Wu, „Carotenoids Inhibit Fructose-Induced Inflammatory Response in Human Endothelial Cells and Monocytes“, *Mediators Inflamm*, Bd. 2020, S. 5373562, 2020, doi: 10.1155/2020/5373562.
- [87] J. E. Wang *u. a.*, „Peptidoglycan and Lipoteichoic Acid from *Staphylococcus aureus* Induce Tumor Necrosis Factor Alpha, Interleukin 6 (IL-6), and IL-10 Production in Both T Cells and

- Monocytes in a Human Whole Blood Model“, *Infect Immun*, Bd. 68, Nr. 7, S. 3965, Juli 2000, doi: 10.1128/IAI.68.7.3965-3970.2000.
- [88] C. Vogel und E. M. Marcotte, „Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses“, *Nat Rev Genet*, Bd. 13, Nr. 4, S. 227–232, Apr. 2012, doi: 10.1038/nrg3185.
- [89] G. S. Karczmar, T. Kurtz, N. J. Tavares, und M. W. Weiner, „Regulation of hepatic inorganic phosphate and ATP in response to fructose loading: an in vivo <sup>31</sup>P-NMR study“, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Bd. 1012, Nr. 2, S. 121–127, Juli 1989, doi: 10.1016/0167-4889(89)90084-0.
- [90] M. F. Abdelmalek u. a., „Higher Dietary Fructose Is Associated with Impaired Hepatic ATP Homeostasis in Obese Individuals with Type 2 Diabetes“, *Hepatology*, Bd. 56, Nr. 3, S. 952, Sep. 2012, doi: 10.1002/HEP.25741.
- [91] M. A. Herman und M. J. Birnbaum, „Molecular aspects of fructose metabolism and metabolic disease“, *Cell Metab*, Bd. 33, Nr. 12, S. 2329–2354, Dez. 2021, doi: 10.1016/J.CMET.2021.09.010.
- [92] L. A. J. O’Neill, R. J. Kishton, und J. Rathmell, „A guide to immunometabolism for immunologists“, *Nat Rev Immunol*, Bd. 16, Nr. 9, S. 553–565, Aug. 2016, doi: 10.1038/nri.2016.70.
- [93] D. G. Hardie, F. A. Ross, und S. A. Hawley, „AMPK - a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis“, *Nat Rev Mol Cell Biol*, Bd. 13, Nr. 4, S. 251, Apr. 2012, doi: 10.1038/NRM3311.
- [94] N. Y. Tan und L. M. Khachigian, „Sp1 Phosphorylation and Its Regulation of Gene Transcription“, *Mol Cell Biol*, Bd. 29, Nr. 10, S. 2483, Mai 2009, doi: 10.1128/MCB.01828-08.
- [95] S. H. Kang u. a., „Binding and functional effects of transcriptional factor Sp1 on the murine interleukin-6 promotor“, *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 271, Nr. 13, S. 7330–7335, März 1996, doi: 10.1074/jbc.271.13.7330.
- [96] W. T. Chang, M. Y. Hong, C. L. Chen, C. Y. Hwang, C. C. Tsai, und C. C. Chuang, „Mutant glucocorticoid receptor binding elements on the interleukin-6 promoter regulate dexamethasone effects“, *BMC Immunol*, Bd. 22, Nr. 1, S. 1–11, Dez. 2021, doi: 10.1186/s12865-021-00413-z.

- [97] J. Williquett, C. Allamargot, und H. Sun, „AMPK-SP1–Guided Dynein Expression Represents a New Energy-Responsive Mechanism and Therapeutic Target for Diabetic Nephropathy“, *Kidney360*, Bd. 5, Nr. 4, S. 538, Apr. 2024, doi: 10.34067/KID.0000000000000392.
- [98] S. Chu und T. J. Ferro, „Identification of a hydrogen peroxide-induced PP1-JNK1-Sp1 signaling pathway for gene regulation“, <https://doi.org/10.1152/ajplung.00454.2005>, Bd. 291, Nr. 5, 2006, doi: 10.1152/AJPLUNG.00454.2005.
- [99] M. L. Porto *u. a.*, „Increased oxidative stress and apoptosis in peripheral blood mononuclear cells of fructose-fed rats“, *Toxicology in Vitro*, Bd. 29, Nr. 8, S. 1977–1981, Dez. 2015, doi: 10.1016/J.TIV.2015.08.006.
- [100] K. L. Bloomfield, S. A. Osborne, D. D. Kennedy, F. M. Clarke, und K. F. Tonissen, „Thioredoxin-mediated redox control of the transcription factor Sp1 and regulation of the thioredoxin gene promoter“, *Gene*, Bd. 319, Nr. 1–2, S. 107–116, Nov. 2003, doi: 10.1016/S0378-1119(03)00799-6.
- [101] P. Jegatheesan und J. P. De Bandt, „Fructose and NAFLD: The Multifaceted Aspects of Fructose Metabolism“, *Nutrients 2017, Vol. 9, Page 230*, Bd. 9, Nr. 3, S. 230, März 2017, doi: 10.3390/NU9030230.
- [102] K. Honma, K. Mochizuki, und T. Goda, „Induction by Fructose Force-Feeding of Histone H3 and H4 Acetylation at Their Lysine Residues around the Slc2a5 Gene and Its Expression in Mice“, *Biosci Biotechnol Biochem*, Bd. 77, Nr. 11, S. 2188–2191, Nov. 2013, doi: 10.1271/BBB.130300.
- [103] K. Ohashi *u. a.*, „High fructose consumption induces DNA methylation at PPAR $\alpha$  and CPT1A promoter regions in the rat liver“, *Biochem Biophys Res Commun*, Bd. 468, Nr. 1–2, S. 185–189, Dez. 2015, doi: 10.1016/J.BBRC.2015.10.134.

## Anhang

**Tabelle 15: Anleitung zur Herstellung von 1L PBS (Phosphate buffered saline) für den ELISA**

| Substanz                                                      | Zielkonzentration | Menge     |
|---------------------------------------------------------------|-------------------|-----------|
| NaCl (Natriumchlorid)                                         | 137 mM            | 8,00628g  |
| KCl (Kaliumchlorid)                                           | 2,7 mM            | 0,2013g   |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (di-Natriumhydrogenphosphat) | 8,1 mM            | 1,149876g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Kaliumdihydrogenphosphat)    | 1,5 mM            | 0,204135g |

Alles in 800 mL dH<sub>2</sub>O lösen und den pH auf 7,2 – 7,4 einstellen;

→ Auf 1000 mL mit dH<sub>2</sub>O auffüllen

→ mit einem 0,22 µm Filter filtrieren

**Tabelle 16: Herstellung der Reagenzien für den Western-Blot**

| Lösung                           | Herstellung                                                                                                                                                                        |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Tris 1,5 M</b>                | 18,15 g Tris (base) in 80 mL dH <sub>2</sub> O lösen; pH 8,8 mit HCl einstellen<br>→ mit dH <sub>2</sub> O auf 100 mL auffüllen                                                    |
| <b>Tris 0,5 M</b>                | 6,05 g Tris (base) in 90 mL dH <sub>2</sub> O lösen; pH 6,8 mit HCl einstellen<br>→ mit dH <sub>2</sub> O auf 100 mL auffüllen                                                     |
| <b>10% SDS</b>                   | 10 g SDS in 100 mL dH <sub>2</sub> O lösen                                                                                                                                         |
| <b>10% APS</b>                   | 100 mg Ammoniumpersulfat in 1 mL dH <sub>2</sub> O lösen                                                                                                                           |
| <b>100 mM DTT</b>                | 0,85 mg DTT in 2 mL dH <sub>2</sub> O lösen                                                                                                                                        |
| <b>10 X Elektrophoresepuffer</b> | 30,28 g Tris (base); 144,13 g Glycin; 10 g SDS<br>→ in einem Endvolumen von 1000 mL dH <sub>2</sub> O lösen (pH 8,5 – 8,7)<br>(Vor Gebrauch auf 1X Elektrophoresepuffer verdünnen) |
| <b>4 X SDS-Ladepuffer</b>        | 5,217 mL Tris 1,5 M (pH auf 6,8 einstellen); 2,5 g SDS; 12,5 mL Glycerol;<br>5 mL 2-β-Mercaptoethanol; 12,5 mg Bromphenolblau<br>→ mit dH <sub>2</sub> O auf 25 mL auffüllen       |
| <b>Towbin-Transferpuffer</b>     | 14,4 g Glycin; 3,03 g Tris (base); 200 ml Methanol<br>→ auf 1000 ml mit dH <sub>2</sub> O auffüllen (pH: 8,1 – 8,5)                                                                |
| <b>Ponceau S.</b>                | 0,1 g Ponceau S; 500 µL Essigsäure (100%),<br>→ auf 50 mL mit dH <sub>2</sub> O auffüllen                                                                                          |
| <b>10 X TBS</b>                  | 24,2 g Tris (base); 80 g NaCl<br>→ in 900 mL dH <sub>2</sub> O lösen; pH auf 7,6 einstellen<br>→ mit dH <sub>2</sub> O auf 1000 mL auffüllen                                       |
| <b>1 x TBST</b>                  | 10x TBS auf 1x verdünnen: 100 mL 10xTBS in 900 mL dH <sub>2</sub> O verdünnen<br>→ 0,5 mL Tween 20 dazu pipettieren                                                                |