

Deutsches Institut für Ernährungsforschung (DIFE) Potsdam-Rehbrücke
Abteilung Molekulare Genetik

**Identifizierung und Charakterisierung von
Bitterrezeptoren**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

vorgelegt von
Bernd Bufe

Potsdam, Mai 2003

*Für Iris,
ohne deren Verständnis und Unterstützung
diese Arbeit nicht entstanden wäre.*

Teile dieser Dissertation sind veröffentlicht:

The human TAS2R16 receptor mediates bitter taste in response to beta-glucopyranosides.

Bufe B, Hofmann T, Krautwurst D, Raguse JD, Meyerhof W.

Nature Genetics. 2002 Nov;32(3):397-401.

Identification of human bitter taste receptors

Bufe B, Schöley-Pohl E, Krautwurst D, Hofmann T, Meyerhof W.

ACS book series; in Druck

Während meiner Zeit als Doktorand am DIfE sind weitere Publikationen auf anderen Gebieten der Geschmacksforschung entstanden, deren Ergebnisse in dieser Dissertation nicht niedergelegt sind. So sind alle Experimente dieser Veröffentlichung von mir durchgeführt:

Induction of membrane chloride currents in *Xenopus laevis* oocytes by the sulfonyl amide sweeteners acesulfame K and saccharin.

Bufe B, Schmale H, Meyerhof W.

Journal of Receptor and Signal Transduction Research. 2000 May-Aug;20(2-3):153-66.

Zu dieser Publikation habe ich die molekularbiologischen Experimente (RT-PCR, *in situ* Hybridisierung) beigetragen:

Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli.

Stevens DR, Seifert R, **Bufe B**, Müller F, Kremmer E, Gauss R, Meyerhof W,

Kaupp UB, Lindemann B.

Nature. 2001 Oct 11;413(6856):631-5.

1.	Einleitung	1
1.1	Geschmack und Ernährung	1
1.2	Das Geschmackserlebnis und die beteiligten Sinne	2
1.3	Physiologie und Anatomie des Geschmackssinnes	3
1.4	Neuroanatomie und neuronale Kodierung des Geschmackssinnes	4
1.5	Molekulare Grundlagen des Geschmacks	5
1.5.1	Molekulare Grundlagen des Salzgeschmacks	6
1.5.2	Molekulare Grundlagen des Sauergeschmacks	6
1.5.3	Molekulare Grundlagen des Süßgeschmacks	7
1.5.4	Molekulare Grundlagen des Umamigeschmacks	7
1.5.5	Molekulare Grundlagen des Bittergeschmacks	8
1.6	Ziele dieser Arbeit	9
2.	Material und Methoden	11
2.1	Material	11
2.1.1	Chemikalien und Enzyme	11
2.1.1.1	Chemikalien	11
2.1.1.2	Enzyme	11
2.1.2	Puffer und Lösungen	11
2.1.3	Medien	11
2.1.3.1	Medien für Bakterien	11
2.1.3.2	Medien für Zellkultur	12
2.1.4	Antibiotika	12
2.1.4.1	Antibiotika für Bakterienkultur	12
2.1.4.2	Antibiotika für Zellkultur	12
2.1.5	Bakterien	12
2.1.6	Zelllinien und zugehörige Medien und Antibiotika	12
2.1.7	Plasmide	12
2.1.7.1	Konstruktion des Expressionsplasmids für die TAS2R-Rezeptoren	12
2.1.7.2	Plasmide zur Klonierung von DNA Fragmenten aus PCR-Reaktionen	13
2.2	Grundlegende molekularbiologische Methoden	13
2.2.1	Phenol-Chloroform Extraktion	13
2.2.2	DNA Fällung	13
2.2.3	Bestimmung von RNA- / DNA-Konzentrationen	13
2.2.4	Agarosegelelektrophorese	14
2.2.5	Isolation von Plasmid-DNA	14
2.2.6	Verdau von DNA durch Restriktionsenzyme	14

2.2.7	Isolation von DNA Fragmenten aus Agarosegelen	14
2.2.8	Klonierung	14
2.2.8.1	Ungerichtete Klonierung von DNA aus PCR-Reaktionen	14
2.2.8.2	Gerichtete Klonierung	14
2.2.9	Transformation	14
2.2.10	Die Poymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	15
2.2.10.1	Design von Oligonukleotiden	15
2.2.10.2	Liste der benutzten Oligonukleotide	15
2.2.10.3	Amplifizierung von DNA-Fragmenten aus cDNA	17
2.2.10.4	Klonierung von TAS2R-Rezeptoren aus genomischer DNA	18
2.2.10.5	Erzeugung von Punktmutationen	18
2.2.11	Herstellung von cDNA aus mRNA	19
2.3	Analyse der Sequenzdaten der Genomprojekte	19
2.3.1	Identifizierung neuer TAS2R-Sequenzen in den Datenbanken des öffentlichen humanen Genomprojektes	19
2.3.2	Dendrogramme, Sequenzvergleiche und Sequenzanalysen	19
2.3.3	Identifizierung von Genpolymorphismen (SNPs)	19
2.4	Zellkultur	19
2.4.1	Passagieren der Zellen	19
2.4.2	Beschichten von Platten	20
2.4.3	Lagerung von Zelllinien	20
2.4.4	Auftauen einer Zelllinie	20
2.4.5	Transfektion von Zellen	20
2.5	Einzelzell-Calcium-Imaging	21
2.6.	Calcium-Imaging im Fluoreszenz-Platten-Lese-Gerät	22
2.7	Planung, Durchführung und Analyse von Dosiswirkungskurven im FLIPR	23
2.8	Immunologische Arbeiten	26
2.8.1	Nachweis HSV-epitopmarkierter Rezeptoren in HEK293 Zellen	26
2.8.2	Colokalisation von Rezeptor und Plasmamembran durch Fluoreszenzmarkierung	26
2.8.3	Konfokale Laserscan Mikroskopie	27
2.9	<i>in situ</i> Hybridisierung	27
2.9.1	Material	27
2.9.2	Herstellung von Gewebeschnitten	27
2.9.3	Herstellung der Sonde	27
2.9.4	Durchführung	28
2.9.5	Detektion	28
2.10	Ermittlung von Schwellwerten, Dosiswirkungskurven und Adaptation beim Menschen	29

2.10.1	Bestimmung menschlicher Geschmacksschwellwerte	29
2.10.2	Bestimmung von Dosiswirkungskurven beim Menschen	29
2.10.3	Messung der Adaptation und Kreuzadaptation beim Menschen	29
2.11	Nomenklatur	30
3.	Ergebnisse	32
3.1.	Identifizierung und chromosomale Lokalisierung der humanen TAS2R-Familie	32
3.2	Funktionellen Expression von TAS2R-Rezeptoren	36
3.2.1	Entwicklung eines Epitops für den verbesserten Membranexport	36
3.2.2	Funktionelle Expression von mTAS2R5	39
3.2.3	Vergleich des Rezeptor mTAS2R5 mit verschiedenen N-terminalen Epitops	41
3.3	Identifizierung eines neuen Rezeptor-Liganden Paares	42
3.4	Analyse der Ligandenspezifität von hTAS2R16	45
3.5	Vergleich der im FLIPR und beim Menschen ermittelten Schwell- und EC₅₀-Werte	46
3.6	Untersuchung der Desensitivierbarkeit des hTAS2R16-Signals im Einzelzell-Calcium-Imaging	48
3.7	Adaptation und Kreuzadaptation des Bittergeschmacks von hTAS2R16 Agonisten beim Menschen	49
3.8	Adaptation und Kreuzadaptation von hTAS2R16 Agonisten und strukturverwandten Nicht-Agonisten beim Menschen	50
3.9	Nachweis der hTAS2R16 mRNA in menschlichen Geschmacksknospen	52
3.10	Identifizierung und Charakterisierung weiterer TAS2R-Rezeptor Ligandenpaare	54
3.11	Charakterisierung der Ligandenspezifität der TAS2R-Rezeptoren	55
3.12	Untersuchung der Expression und Lokalisation von TAS2R-Rezeptoren in HEK293 G15 Zellen	55
3.13	Untersuchung der G-Protein Kopplung von TAS2R-Rezeptoren in HEK293 Zellen	57
3.14	Vergleichende Analyse der hTAS2R16 Aminosäuresequenzen mit anderen humanen TAS2R-Rezeptoren	59
3.15	Analyse der SNP Datenbank des Humanen Genomprojektes	61
3.16	Korrelation menschlicher Salicinschwellwerte mit hTAS2R16 Genvariationen	63
4.	Diskussion	65
4.1	Ergebnisse der Genomanalyse	65
4.1.1	Zahl der TAS2R-Gene	65
4.1.2	Chromosomale Lokalisation der TAS2R-Gene	66
4.1.3	Evolution der TAS2R-Gene	67
4.2	Funktionelle Expression von TAS2R-Rezeptoren	68

4.2.1	Einfluss des N-terminalen Transport-Epitops auf mTAS2R5	68
4.2.2	Expression von TAS2R-Rezeptoren	69
4.2.3	Membranlokalisation von TAS2R-Rezeptoren in HEK293 Zellen	70
4.2.4	Analyse der G-Protein Kopplung von TAS2R-Rezeptoren in HEK293 Zellen	70
4.3	Identifizierung und Charakterisierung eines neuen Rezeptor-Liganden-Paares	71
4.3.1	Identifizierung von Salicin als Ligand für hTAS2R16	71
4.3.2	Ligandenstruktur von hTAS2R16 Agonisten	72
4.3.3	Bedeutung von Salicin und verwandten hTAS2R16 Agonisten	73
4.4	Spezifität der TAS2R-Rezeptoren für ihre Liganden	74
4.5	Vergleich der Ergebnisse des FLIPR-Systems mit menschlichen Sinneswahrnehmungen	75
4.6	Desensitivierung von TAS2R-Rezeptoren als mögliche Ursache für die Bitteradaption des Menschen	76
4.7	Mögliche Ursachen des Bittergeschmacks von Phenyl-α-D-Glucosid	78
4.8	Expression von TAS2R16	78
4.9	Ergebnisse der Analyse der Aminosäuresequenz	79
4.10	Genvariationen	82
4.11	Ausblick	83
5	Zusammenfassung	85
6.	Literaturverzeichnis	86
7.	Anhang	97
7.1	Verzeichnis einiger Abkürzungen	97
7.2	Danksagung	99
7.3	Erklärung	100

1. Einleitung

1.1 Geschmack und Ernährung

Für die Auswahl unserer Nahrungsmittel ist vor allem ihr Geschmack von großer Bedeutung [McCrary, 2002; Nasser, 2001; Mela, 2001; Drewnowski, 1997]. So stellt er für die Wahl unserer Lebensmittel sogar ein wichtigeres Kriterium dar, als die Wirkung der ausgewählten Speisen auf unsere Gesundheit [McCrary, 2002]. Dieses Verhalten führt auch zu negativen Konsequenzen: Deshalb werden wohlschmeckende, kalorienreiche Speisen häufig gegenüber den gesünderen, kalorienarmen Nahrungsmitteln bevorzugt [McCrary, 2002, Drewnowski, 1997]. Der gute Geschmack von Nahrungsmitteln kann auch dazu führen, dass wir trotz vorhandener Sättigungssignale weiter essen [Saper, 2002; Mela, 2001]. In den Industriestaaten, besonders jedoch in den USA, gibt es einen rapide wachsenden Bevölkerungsanteil mit Übergewicht [McCrary, 2002]. Dieser Trend, mit all seinen negativen Auswirkungen, ist hauptsächlich auf die für Industriestaaten typische große Auswahl an kalorienreichen Lebensmitteln zurückzuführen [McCrary, 2002; Drewnowski, 1997]. Eine mögliche Strategie, mit deren Hilfe das Problem des Übergewichts reduziert werden kann, ist es, dem Konsumenten verstärkt Nahrungsmittel mit reduziertem Kaloriengehalt anzubieten [McCrary, 2002]. Leider werden diese wegen ihres schlechteren Geschmacks häufig vom Verbraucher abgelehnt [Sandrou, 2000]. Ein detailliertes Verständnis unseres Geschmackssinnes kann dabei helfen, kalorienarme Nahrungsmittel so herzustellen, dass sie vom Verbraucher besser akzeptiert werden.

Auch individuelle Unterschiede in unserer Geschmacksempfindung haben einen starken Einfluss auf die Art und Menge der von uns verzehrten Nahrung. Diese Geschmacksvariationen können vielfältige Ursachen haben. So beeinflussen soziale sowie psychologische Faktoren unseren Geschmackssinn [Mela, 2001; Scalfani, 2001; Drewnowski, 1997]. Mit zunehmendem Alter reduziert sich auch unsere Geschmackssensitivität, was eine der Ursachen für den verringerten Nahrungsmittelkonsum vieler älterer Menschen ist [Drewnowski, 2001; Winkler, 1999 Schiffman, 1993a]. Aber auch genetisch determinierte Faktoren führen zu individuellen Variationen unseres Geschmackssinnes [Nasser, 2001; Drewnowski, 1997]. Ein klassisches Beispiel hierfür ist die Wahrnehmung der Bitterstoffe 6-N-Propylthiouracil (PROP) und Phenylthiocarbamid (PTC) [Guo, 2001]. In Europa können 70% der Bevölkerung diese Bitterstoffe ca. 100-fach besser wahrnehmen als die restlichen 30% [Bartoshuk, 2000; Guo, 2001]. Die genetisch bedingte Variation des PROP/PTC-Geschmacks scheint das Ernährungsverhalten zu beeinflussen. So sollen PROP/PTC-Schmecker bestimmte Nahrungsmittel eher ablehnen. Dies trifft vor allem auf bestimmte Gemüsesorten wie Kohl, Spinat und Broccoli zu, die einen bitteren Beigeschmack besitzen [Drewnowski, 1995; Turnbull, 2002]. Es wurde jedoch auch beobachtet, dass Menschen, die PROP und PTC nicht schmecken, Fette weniger gut wahrnehmen können [Tepper, 1998; Duffy, 2000]. Dies führt bei PROP/PTC-Nicht-Schmeckern zu einem erhöhtem Fettkonsum und höherem Körpergewicht [Tepper, 2002]. Die Identifizierung und funktionelle Analyse von Bitterrezeptoren, kann daher einen Beitrag zum besseren Verständnis unseres Geschmackssinnes sowie unserer Ernährungsgewohnheiten leisten [Guo, 2001]. Eine kürzlich durchgeführte genetische Kartierung von PROP/PTC-Schmeckern und Nicht-

Schmeckern legt nahe, dass Variationen des putativen Bitterrezeptorgens hTAS2R38 [Bufe, 2002] die Ursache für den PROP/PTC Phänotyp sein könnten [Kim, 2003; Drayna, 2003].

1.2 Das Geschmackserlebnis und die beteiligten Sinne

Wenn uns das Essen „schmeckt“, so ist dies ein komplizierter Prozess, dessen wichtigstes Ziel es ist, die Qualität des verzehrten Nahrungsmittels zu beurteilen. An der Entstehung des „Geschmackserlebnisses“ sind viele Sinne beteiligt [Drewnowski, 1997; Linden, 1993]. So wird beim Kauen eine Mixtur vieler flüchtiger Aromastoffe aus der Nahrung freigesetzt. Diese gelangen über eine Verbindung zwischen Rachen und Nasenraum, dem so genannten Nasopharynx, retronasal zum Geruchsepithel, wo sie dann Geruchsrezeptoren stimulieren [Burdach, 1987]. Wie wichtig der Anteil des Geruchssinns am „Geschmackserlebnis“ ist, kann jeder bei einem starken Schnupfen selbst erfahren. Durch starke Schleimbildung kann der Zugang der Aromastoffe zum Geruchsepithel blockiert werden. Alle dann noch verbleibenden Sinneseindrücke werden ausschließlich in der Mundhöhle wahrgenommen [Smith, 2001]. Dort spielt natürlich der Geschmackssinn die wichtigste Rolle. Er hat besondere Bedeutung für die abschließende Analyse der Nahrungsmittelqualität und stellt die letzte Möglichkeit dar, Nahrung, die sich schon im Mund befindet, vor dem Verschlucken nochmals zu prüfen. Der Geschmackssinn ist für die Wahrnehmung der fünf grundlegenden Geschmacksqualitäten süß, sauer, salzig, bitter und umami (würzig) verantwortlich. Dabei hilft uns der Süß- und Umamigeschmack den Energiegehalt der Nahrung einzuschätzen [Lindemann, 1996]. Der Bittergeschmack dagegen schützt uns vor giftigen Nahrungsmitteln [Lindemann, 1996]. Der Sauergeschmack warnt uns vor dem Verzehr von unreifen Früchten oder verdorbenen Nahrungsmitteln, während der Salzgeschmack an der Regulation des Mineralstoffhaushalts beteiligt ist [Lindemann, 1996]. Allerdings sind an der Analyse der Nahrungsmittel noch viele weitere Sinne beteiligt. So wird in der Mundhöhle auch die Struktur von Nahrungsmitteln durch Mechanorezeptoren analysiert [Hyde, 1993]. Dies führt zu Empfindungen, wie faserig, cremig oder krümelig. Wie wichtig die Mechanorezeption ist, kann jeder beim Verzehr von Kartoffelchips bemerken: Sind diese nicht mehr „knackig“ genug, so „schmecken“ sie nicht. Eine weitere wichtige Komponente der Geschmacksempfindung ist der Schmerzsinne. Viele Würzmittel, die Speisen einen scharfen „Geschmack“ verleihen, wie Pfeffer und Chili, enthalten als Wirkstoff Capsaicin und verwandte Substanzen [Caterina, 1997]. Diese Stoffe aktivieren VR1-Ionenkanäle in Nervenendigungen, die über die gesamte Zungenoberfläche verteilt sind und normalerweise durch Gewebeschädigungen, wie Verbrennungen, aktiviert werden [Kido, 2003; Ishida, 2002; Caterina, 1997]. Deshalb können zu stark gewürzte Speisen auch Schmerzen verursachen. Auch der Temperatursinn spielt beim Geschmackserlebnis eine Rolle. Substanzen wie Menthol und Eukalyptusöl beeinflussen ebenfalls Ionenkanäle der TRP-Familie in Nervenendigungen auf der Zungenoberfläche, die normalerweise Temperaturänderungen wahrnehmen [Xu, 2002; Peier, 2002]. Dadurch kann der kühlende Effekt dieser Substanzen auf Haut und Zunge erklärt werden. Das komplexe Zusammenspiel all dieser Sinneswahrnehmungen zeigt welche große Bedeutung, eine sorgfältige Analyse der Nahrungsmittelzusammensetzung für den Menschen besitzt.

1.3 Physiologie und Anatomie des Geschmackssinnes

Die Wahrnehmung der fünf Geschmacksqualitäten süß, sauer, bitter, salzig und umami findet in Geschmackspapillen auf der Zunge statt. Es gibt drei Typen von Geschmackspapillen auf der Zungenoberfläche (Abb. 1.1). Die kleinen Pilzpapillen sind über den größten Teil der Zungenoberfläche verteilt. An der Zungenspitze sind sie jedoch in besonders hoher Zahl zu finden. An den Seitenrändern des hinteren Zungendrittels befinden sich die Blätterpapillen. Ganz hinten am Zungengrund sind die großen kreisförmigen Wallpapillen lokalisiert. In allen Papillen gibt es zwiebelartige Geschmacksknospen, deren Zahl je nach Papillentyp unterschiedlich ist. Jede der aus ca. 100 Zellen bestehenden Geschmacksknospen ist tief in das umliegende Gewebe eingebettet. In den Knospen liegen die lang gestreckten Geschmacksrezeptorzellen, die nur an einer einzigen Stelle, dem Porus, einen Kontakt zur Zungenoberfläche haben. Dies ist der eigentliche Ort der Geschmackswahrnehmung; dort sind die Geschmacksrezeptoren lokalisiert, mit deren Hilfe z. B. Süß- oder Bitterstoffe wahrgenommen werden. Geschmacksrezeptorzellen sind spezialisierte Epithelzellen und gehören daher zu den sekundären Sinneszellen. Sie werden daher von den Nervenfasern ableitender Neurone direkt innerviert. Die Geschmacksrezeptorzellen haben nur eine kurze Lebensdauer von ca. 10 Tagen [Farbman, 1980]. Interessanterweise muss das Epithelgewebe innerviert sein, damit sich die Geschmacksknospen differenzieren. Durchtrennt man die ableitenden Nervenfasern, so führt dies zum Verlust der Geschmacksknospen [Sun, 2002; Takeda, 1996; Oakley, 1998].

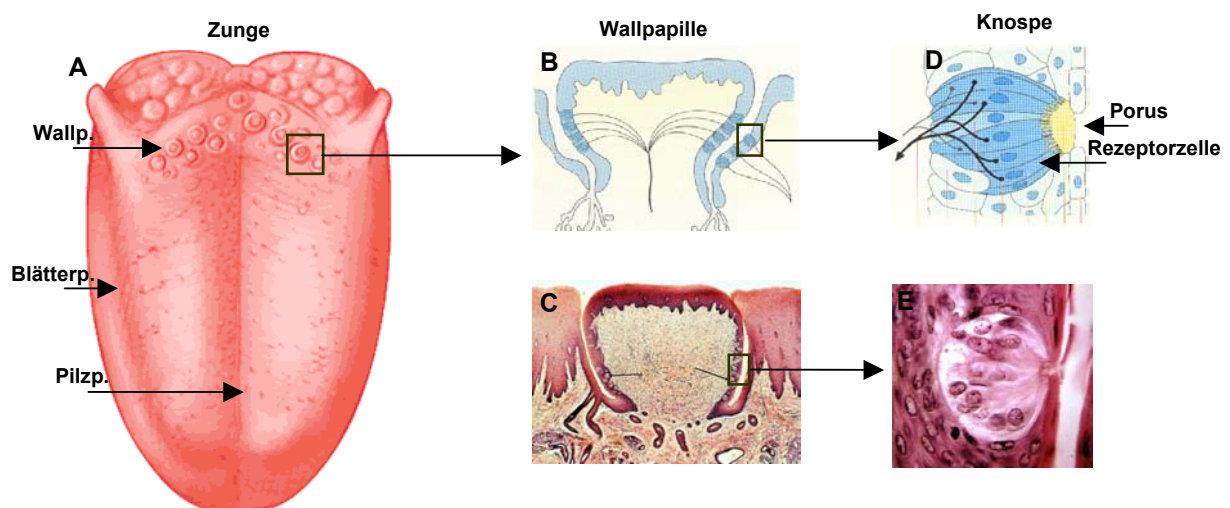


Abb. 1.1 Anatomie des Geschmackssinns

A: Schematische Darstellung der menschlichen Zunge. Wallp.: Wallpapillen, am Zungengrund. Blätterp.: Blätterpapillen, seitlich im hinteren Drittel der Zunge. Pilzp.: Pilzpapillen, verteilt auf der Zungenoberseite. B: schematische Darstellung eines Schnitts durch eine Wallpapille. C: Histologischer Querschnitt durch eine Wallpapille. D: Schematische Darstellung einer Geschmacksknospe im Querschnitt. E: Histologische Querschnitt durch eine Geschmacksknospe. Quelle: A: www.morphonix.com; C: www.cal.vet.upenn.edu/histo; E: www.medlib.med.utah.edu; B, D: [Dudel, 1996]

1.4 Neuroanatomie und neuronale Kodierung des Geschmackssinnes

Der vordere Teil der Zunge, in dem sich die Pilzpapillen befinden, wird vom VII Hirnnerv innerviert. Der hintere Teil der Zunge, in dem sich die Blätter- sowie Wallpapillen befinden, wird durch den IX Hirnnerv innerviert [Smith, 1999]. In Nagern projizieren beide Nerven zunächst zum Nucleus Tractus Soltarius und dann zum Nucleus Parabrachialis. Von dort aus erfolgt eine Projektion über den ventromedialen Nucleus im Thalamus zum Gustatorischen Cortex sowie zum Hypothalamus [Smith, 1999]. Es ist bislang noch nicht genau bekannt, welche Art von Information in den Neuronen transportiert wird [Smith, 1999]. Im Prinzip gibt es zwei konkurrierende Modelle [Smith, 1999; Hellekant, 1998]. Das so genannte Geschmacksbahnenmodell favorisiert eine getrennte Leitung der fünf Geschmacksqualitäten [Hellekant, 1998]. So existieren für jede Geschmacksqualität spezialisierte Rezeptorzelltypen, die von ebenfalls spezialisierten Nervenzellen innerviert werden [Hellekant, 1998]. Daher führen in diesem Modell Süßstoffe zur Aktivierung von Süßrezeptorzellen. Die Erregungsleitung wird dann von Neuronen übernommen, die ausschließlich Süßrezeptorzellen innervieren. Die Verarbeitung jeder einzelnen Geschmacksqualität erfolgt getrennt.

Dem gegenüber steht das Modell der neuronalen Mustererkennung. In diesem Modell gibt es keine strenge Spezialisierung der Geschmacksrezeptorzellen und der ableitenden Nervenzellen, sondern Rezeptorzellen und Neurone zeigen Reaktionen auf alle Geschmacksqualitäten [Smith, 2000]. Die Stärke der Signalantwort unterscheidet sich je nach Geschmacksqualität [Smith, 2000]. Das heißt es gibt Rezeptorzellen die auf Süßstoffe stärker reagieren als auf Bitterstoffe. Andere Geschmacksrezeptorzellen reagieren wiederum auf Bitterstoffe stärker als auf Süßstoffe. Die ableitenden Neurone innervieren immer mehrere Rezeptorzellen. Durch Zufall kann ein Neuron mehrere stärker auf Bitterstoffe reagierende Geschmacksrezeptorzellen innerviert. Dies führt dazu, dass Bitterstoffe bestimmte Nervenzellen besonders stark aktivieren, während eine andere Gruppe von Nervenzellen besonders stark durch Süßstoffe aktiviert wird. Anhand des unterschiedlichen Erregungsmusters jeder Geschmacksqualität kann das Gehirn dann verschiedene Geschmacksqualität erkennen [Smith, 2000].

Obwohl es auf den ersten Blick einfach scheint, sich anhand experimenteller Daten für eines der Modelle zu entscheiden, ist diese Frage bis heute nicht geklärt. Für beide Modelle gibt es eine ganze Reihe experimenteller Daten, die jeweils eine der Theorien stützen.

Für das Mustererkennungsmodell sprechen Arbeiten zur elektrophysiologischen Ableitungen der Nervenfasern von Nagern. In diesen Versuchen zeigen viele Fasern nach Stimulation mit Süßstoffen, Bitterstoffen, Salzen oder Säuren Reaktionen auf alle Geschmacksqualitäten. Meist ist die Signalantwort einer einzelnen Faser auf eine bestimmte Geschmacksqualität besonders stark [Smith, 1999; Miyaoka, 1996; Woolston, 1979]. In Ableitungen isolierter Geschmacksrezeptorzellen, die mit verschiedenen Geschmacksstoffen stimuliert werden, zeigten dieselben Rezeptorzellen häufig Antworten auf mehrere Geschmacksqualitäten [Herness, 2000; Herness, 1999]. Diese Daten werden von neuen Untersuchungen an Geschmacksknospen im Gewebeverband bestätigt. Die Stimulation mit verschiedenen Süß- bzw. Bitterstoffen führt ebenfalls zu einer Antwort derselben Rezeptorzellen auf mehrere Geschmacksqualitäten [Caicedo, 2001; Caicedo, 2002]. Allerdings besitzen viele Substanzen mehr als

eine Geschmacksqualität [Cohn 1914]. So haben viele künstliche Süßstoffe in höheren Konzentrationen einen bitteren Beigeschmack [Schiffman, 1995], während die Salze NaCl und KCl z. B. in geringen Konzentrationen auch einen süßen Beigeschmack besitzen; [Skramlik, 1926]. Da dies eine alternative Erklärung für die vorliegenden Befunde darstellt, kann aus diesen Ergebnissen nicht zwingend der Schluss abgeleitet werden, dass das Mustererkennungsmodell richtig ist.

Für das Geschmacksbahnen-Modell sprechen vor allem neuere molekularbiologische Daten. *In situ* Hybridisierungsexperimente an Nagern zeigen, dass die mRNA der Bitterrezeptoren (TAS2Rs) in ca. 20% der Rezeptorzellen einer Geschmacksknospe vorkommt [Adler, 2000]. Süß- und Umamirezeptoren (TAS1Rs) kommen ebenfalls nur in einer Subpopulation von ca. 30% der Geschmacksrezeptorzellen vor. Die TAS1R- und TAS2R-Rezeptoren werden dabei in nicht überlappenden Zellpopulationen exprimiert [Nelson, 2001]. Auch für die HCN-Kanäle, die wahrscheinlich Sauerrezeptoren der Nager darstellen, konnte gezeigt werden, dass sie nur in ca. 20% der Geschmacksrezeptorzellen exprimiert werden. Diese Zellpopulation zeigt keine Überlappung mit der Expression von Gustducin, einem G-Protein das zusammen mit den TAS2Rs exprimiert wird [Stevens, 2001, Adler, 2000]. Diese Ergebnisse, sowie viele weitere Befunde legen auf molekularer Ebene die Existenz von spezialisierten Zelltypen nahe. Vor kurzem wurden zwei Mauslinien erzeugt, in denen die Gene für die Phospholipase C Beta-2 (PLC- β -2) bzw. den Ionenkanal TRPM5, zerstört wurden. Es konnte gezeigt werden, dass diese Gene eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion von Süß-, Umami und Bitterstoffen spielen. Da deren Ausschaltung zum völligen Verlust des Süß-, Umami und Bittergeschmacks in diesen Tieren führt [Zhang, 2003]. Durch weitere genetische Veränderungen konnten Tiere erzeugt werden, bei denen die zuvor ausgeschaltete PLC- β -2 selektiv in TAS2R-Rezeptor-exprimierenden Zellen wieder produziert wurde [Zhang, 2003]. Diese Tiere konnten Bitterstoffe wieder schmecken. Der Defekt des Süß- und Umamigeschmacks dieser Tiere blieb dagegen erhalten [Zhang, 2003]. Auch einige physiologische Arbeiten, wie Ableitungen an Neuronen von Hamstern und Primaten zeigen, dass es zumindest in diesen Spezies deutlich spezialisierte Neurone für jeweils nur eine einzelne Geschmacksqualitäten gibt [Rehnberg, 1990; Danilova, 1998; Danilova, 2000;]. All diese Befunde stützen das Geschmacksbahnen-Modell.

1.5 Molekulare Grundlagen des Geschmacks

Die fünf Grundqualitäten des Geschmacks können anhand ihrer Rezeptormoleküle in zwei Gruppen eingeteilt werden: So wird der Salz- und Sauergeschmack durch Ionenkanäle vermittelt, während Süß-, Bitter- und Umamigeschmack durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt wird [Lindemann, 1996]. Obwohl dies seit Jahrzehnten bekannt ist, und große Anstrengungen unternommen wurden die beteiligten Rezeptoren und Kanäle zu identifizieren, waren die am Geschmackssinn beteiligten Moleküle bis vor kurzem weitgehend unbekannt [Lindemann, 1996]. Erst in den letzten Jahren wurden durch die Entdeckung des Gustducins [McLaughlin, 1992], sowie der Süß-, Bitter- und Umamirezeptoren [Bufe, 2002; Max, 2001; Montmayeur, 2001; Nelson, 2001; Adler, 2000; Matsunami, 2000; Hoon, 1999] bedeutende Fortschritte erzielt.

1.5.1 Molekulare Grundlagen des Salzgeschmacks

Durch Erhöhung der Salzkonzentration in der Mundhöhle werden Ionenkanäle in einigen Geschmacksrezeptorzellen aktiviert. Dies führt zum Transport von positiv geladenen Na^+ -Ionen in das negativ geladene Innere der Geschmacksrezeptorzellen [Smith, 2001]. Die dadurch bedingte Depolarisation der Rezeptorzellen führt zur Öffnung von Ca^{2+} -leitenden Ionenkanälen. Dies bewirkt einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels und die Freisetzung von Neurotransmittern. Dadurch werden Nervenzellen aktiviert und das Signal zum Gehirn weitergeleitet [Smith, 2001; Lindemann, 1996]. In Nagern scheint der epitheliale Natriumkanal (ENaC) eine wichtige Rolle beim Salzgeschmack zu spielen [Lindemann, 2001]. Einer der wichtigsten Befunde hierfür ist, dass Amylorid, ein Inhibitor des ENaC-Kanals, in Nagern die Signale von Geschmacksrezeptorzellen und ableitender Neurone auf Na^+ -Stimulationen stark reduziert. Beim Menschen führt die Gabe von Amylorid nur zu einer Reduktion des Salzgeschmacks um ca. 20% [Smith, 1995]. Daraus lässt sich schließen, dass bei Menschen noch ein weiteres bislang unbekanntes Molekül am Salzgeschmack beteiligt ist [Lindemann, 1996; Ossebaard, 1995]. Viele weitere molekulare Mechanismen der Signaltransduktion wie z. B. der beteiligte Neurotransmitter oder der beteiligte Ca^{2+} -Kanal, sind bislang unbekannt [Lindemann, 1996].

1.5.2 Molekulare Grundlagen des Sauergeschmacks

Säuren erhöhen die Protonenkonzentration in der Mundhöhle. Dies führt zur Aktivierung von Ionenkanälen in Geschmacksrezeptorzellen. Dadurch werden positiv geladene Ionen in das negative geladene Innere der Geschmacksrezeptorzellen transportiert [Smith, 2001]. Durch die resultierende Depolarisation der Rezeptorzellen werden Ca^{2+} -leitende Ionenkanäle geöffnet. Der resultierende Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels führt zur Freisetzung von Neurotransmittern, die Nervenzellen aktivieren und so das Signal zum Gehirn weiterleiten [Smith, 2001].

Als molekulare Grundlage des Sauergeschmacks werden derzeit noch diverse Ionenkanäle diskutiert [DeSimone, 2001; Lindemann, 2001]. Zwei Kanäle der HCN-Familie stellen aber derzeit mit Abstand die besten Kandidaten für die Vermittlung des Sauergeschmacks dar. Dafür spricht eine Vielzahl von Befunden: So wurden diese Kanäle in einem Teil der Rezeptorzellen der Geschmacksknospen nachgewiesen [Stevens, 2001]. Durch *in vitro* Expressionsexperimente konnte gezeigt werden, dass die beiden Kanäle tatsächlich durch extrazelluläre Protonen aktivierbar sind [Stevens, 2001]. Stimuliert man Geschmacksknospen im Gewebeverband mit Protonen, so antwortet ein Teil der Rezeptorzellen mit dem für diese Kanalfamilie typischen I_h Strom [Stevens, 2001]. Die weiteren molekularen Mechanismen der Signaltransduktion, wie der benutzte Neurotransmitter oder der beteiligte Ca^{2+} -Kanal, sind bislang unbekannt [Lindemann, 1996].

1.5.3 Molekulare Grundlagen des Süßgeschmacks

Der Süßgeschmack wird durch eine ganze Reihe unterschiedlichster chemischer Verbindungen ausgelöst [Schiffman, 1993b]. Besonders wichtig sind natürlich die Kohlenhydrate, wie Glucose, Saccharose und Fructose. Aber auch Aminosäuren wie D-Tryptophan und Glycin, oder sogar Proteine wie Monellin und

Thaumatococcus schmecken süß. Weiterhin gibt es eine Vielzahl künstlicher Süßstoffe, wie Aspartam, Cyclamat und Saccharin [Schiffman, 1993b]. All diese Substanzen aktivieren einen G-Protein gekoppelten Rezeptor [Nelson, 2001; Li, 2002]. Die Aktivierung des G-Proteins führt dann über eine intrazelluläre Signalkaskade zur Produktion von intrazellulären Botenstoffen. Diese aktivieren einen Ca^{2+} -Kanal, was den Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels bewirkt. Dadurch kommt es zur Freisetzung von Neurotransmittern und zur Weiterleitung des Signals zum Gehirn.

In Nagern konnte gezeigt werden, dass ein Teil der Geschmacksrezeptorzellen die Rezeptoren TAS1R3 und TAS1R2 koexprimiert [Max, 2001; Montmayeur, 2001]. Ein aus diesen beiden Rezeptoren bestehendes Dimer wird durch süß schmeckende Kohlenhydrate, (z. B. Saccharose), Aminosäuren (z.B. D-Tryptophan), sowie künstliche Süßstoffe (z. B. Saccharin) aktiviert [Nelson, 2001; Li, 2002]. Die drei bekannten Rezeptoren der TAS1R-Familie der Maus befinden sich auf Chromosom 4. Genetische Studien an Mäusen zeigen, dass der entsprechende Abschnitt von Chromosom 4 für Variationen des Saccharose- und Saccharin-Geschmacks verantwortlich ist [Lush, 1989; Lush, 1995]. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Dimer aus TAS1R3 und TAS1R2 sowohl beim Menschen, als auch bei Nagern den Süß-Rezeptor darstellt. Es ist noch nicht genau bekannt welchen G-Protein-Komplex der Rezeptor aktiviert. Trotzdem konnte durch genetisch veränderte Mäuse schon gezeigt werden, dass die Aktivierung des Rezeptors zu einer Aktivierung der Phospholipase-C-beta-2 und des TRPM5 Kanals führt [Zhang, 2003]. Dieser ist ein Kationenkanal und seine Aktivierung führt zur Depolarisation der Zellen [Zhang, 2003]. Es ist möglich, dass dieser Kanal direkt den Einstrom von Ca^{2+} in die Zellen verursacht und daher für die Ausschüttung des Neurotransmitters sorgt [Perez, 2002]. Allerdings sind widersprüchliche Daten bezüglich dessen Calciumleitfähigkeit publiziert [Zhang, 2003; Perez, 2002].

1.5.4 Molekulare Grundlagen des Umamigeschmacks

Der Umamigeschmack wird vor allem durch den "Geschmacksverstärker" Natriumglutamat ausgelöst [Yamaguchi, 2000]. Die Gegenwart von Nukleotiden wie z. B. Inosinmonophosphat (IMP) verstärkt den Umamigeschmack [Bellisle, 1999]. Natriumglutamat aktiviert einen G-Protein gekoppelten Rezeptor [Lindemann, 2001]. Dies führt über eine intrazelluläre Signalkaskade zur Produktion von Botenstoffen, was den Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels und Freisetzung von Neurotransmittern bewirkt.

In Nagern werden in einem Teil der Geschmacksrezeptorzellen die Rezeptoren TAS1R1 und TAS1R3 koexprimiert [Nelson, 2001]. Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere Glutamat ein aus diesen beiden Rezeptoren bestehendes Dimer aktiviert [Nelson, 2002; Li, 2002]. Die gleichzeitige Gabe von IMP verstärkt die Rezeptoraktivierung [Nelson, 2002; Li, 2002]. Diese Ergebnisse zeigen, dass dieses Dimer beim Menschen den Umami-Rezeptor darstellt. Bei Nagern stellt dieses Dimer einen Aminosäurerezeptor dar, da er neben Glutamat auch auf andere Aminosäuren reagiert. In Nagern wird neben dem Dimer aus TAS1R1 und TAS1R3 wird auch noch eine N-terminal verkürzte Variante des metabotropen Glutamatrezeptors 4 als zusätzlicher Umami-Rezeptor diskutiert [Chaudhari, 2000; Chaudhari, 1998; Chaudhari, 1996]. Ob dieser Rezeptor für den Umamigeschmack eine bedeutende Rolle spielt ist derzeit jedoch unklar.

Es ist noch nicht geklärt, welcher G-Protein-Komplex durch den Rezeptor aktiviert wird, welche intrazellulären Botenstoffe produziert und welche Neurotransmitter ausgeschüttet werden. Anhand genetisch veränderter Mäuse kann jedoch gezeigt werden, dass die Phospholipase-C-beta-2 und der TRPM5-Kanal auch in der Signaltransduktion des Umamigeschmacks eine wichtige Rolle spielen [Zhang, 2003]. Falls seine Ca^{2+} -Leitfähigkeit ausreicht, könnte dieser Kanal direkt den Einstrom von Ca^{2+} in die Zellen verursacht und daher für die Ausschüttung des Neurotransmitters sorgen [Zhang, 2003; Perez, 2002].

1.5.5 Molekulare Grundlagen des Bittergeschmacks

Aufgrund vieler Entdeckungen vor allem in den letzten drei Jahren sind die molekularen Mechanismen des Bittergeschmacks im Vergleich zu den anderen Geschmacksqualitäten schon weitgehend bekannt. So führen Bitterstoffe zur Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Dies löst sehr wahrscheinlich folgende intrazelluläre Signalkaskade aus (Abb. 1.2):

Der Rezeptor aktiviert einen G-Protein-Komplex aus den Untereinheiten Alpha-Gustducin, Beta-1 oder Beta-3 und Gamma-13 [Yan, 2001; Huang, 1999]. Dieser dissoziiert in eine Alpha- und sowie eine Beta-Gamma-Untereinheit. Das Alpha-Gustducin führt über die Phosphodiesterase-1A zu einer Reduktion des zyklischen Adenosinmonophosphat-Spiegels (cAMP) [Margolskee, 2002]. Der Beta-Gamma13-Komplex aktiviert die Phospholipase C Beta-2 [Zhang, 2003]. Dies führt zur Aktivierung des TRPM5 Kanals [Zhang, 2003], was die Depolarisation der Geschmacksrezeptorzelle und die Ausschüttung des noch unbekanntes Neurotransmitters bewirkt.

Ein Meilenstein für die Erforschung des Bittergeschmacks war die Entdeckung der TAS2R-Rezeptorfamilie von Mensch und Nagern [Adler, 2000; Matsunami, 2000]. Bislang wurden 19 menschliche TAS2R-Rezeptorgene, 28 Gene der Maus, sowie 14 Gene der Ratte identifiziert [Adler, 2000]. Alle bisherigen Mitglieder dieser Familie liegen auf Chromosomen, die mit Variationen des Bittergeschmacks assoziiert sind [Adler, 2000]. In den Geschmacksknospen von Nagern werden diese Rezeptorgene in ca. 20% der Geschmacksrezeptorzellen exprimiert [Adler, 2000]. Für drei dieser Rezeptoren konnte auch gezeigt werden, dass sie tatsächlich durch Bitterstoffe aktiviert werden können [Chandrashekar, 2000]. So reagiert der Rezeptor mTAS2R5 der Maus auf den Bitterstoff Cycloheximid [Chandrashekar, 2000]. Variationen in der Struktur dieses Rezeptors scheinen auch die Ursache für die unterschiedliche Sensitivität von bestimmten Mausstämmen gegenüber Cycloheximid zu sein [Chandrashekar, 2000]. All diese Befunde zeigen, dass zumindest einige TAS2R-Mitglieder Bitterrezeptoren sind.

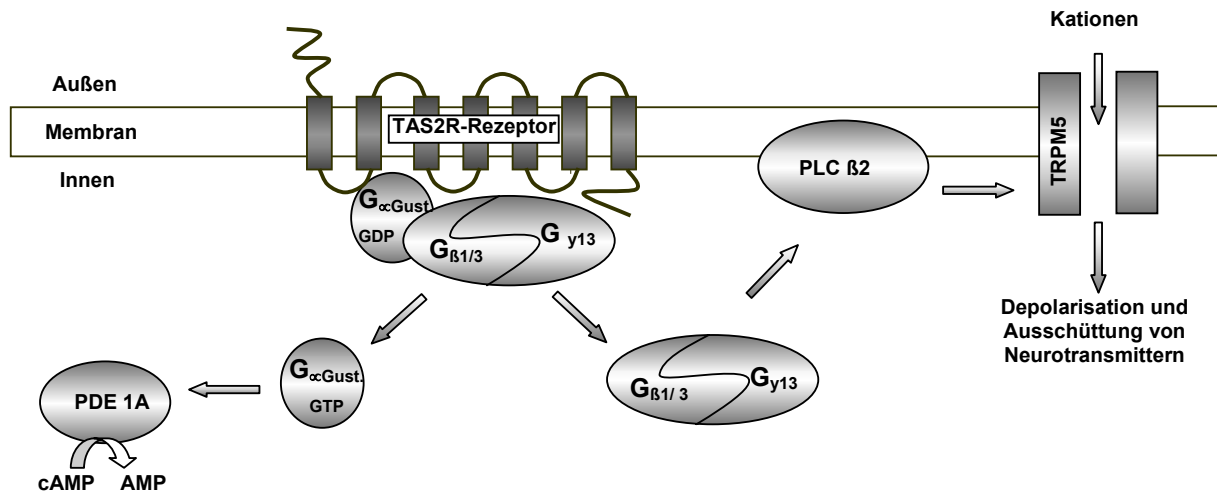


Abb. 1.2 Signaltransduktion der TAS2R-Rezeptoren in Geschmacksrezeptorzellen

G α Gust.: G-Protein- Alpha-Untereinheit Gustducin; G β 1/3: G-Protein-Beta-Untereinheit Beta 1 oder Beta 3; G γ 13: G-Protein-Gamma-Untereinheit Gamma-13; PLC β 2: Phospholipase C beta-2; PDE 1A: Phosphodiesterase-1A; TRPM5: TRPM5-Ionenkanal. GDP: Guanosindiphosphat; GTP: Guanosintriphosphat; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; AMP: Adenosinmonophosphat.

1.6 Ziele dieser Arbeit

Um den menschlichen Bittergeschmack besser verstehen und beeinflussen zu können, sind detaillierte Kenntnisse der menschlichen Bitterrezeptoren und ihrer Interaktion mit den Bitterstoffen notwendig. Dafür war die Entdeckung der Bitterrezeptoren eine wichtige Voraussetzung. Allerdings wurden fast alle bisherigen Untersuchungen der TAS2R-Rezeptoren an Mäusen und Ratten durchgeführt. Nur 3 TAS2R-Rezeptoren wurden bisher in menschlichen Zungen durch PCR nachgewiesen [Ueda, 2001]. Funktionell wurde bislang nur für zwei Rezeptoren der Maus (mTAS2R5 + mTAS2R8), sowie einen einzigen menschlichen Rezeptor (hTAS2R4) eine Aktivierung durch Bitterstoffe gezeigt [Chandrashekar, 2000]. Die dafür verwendeten Konzentrationen der Bitterstoffe lagen mit Ausnahme der Kombination mTAS2R5/Cycloheximid erheblich höher als die Wahrnehmungsschwellwerte dieser Substanzen in den betreffenden Spezies [Chandrashekar, 2000]. Dies trifft besonders auf die funktionelle Expression des menschlichen Rezeptors zu. Die Konzentrationen an Denatoniumbenzoat, die notwendig waren, um eine schwache Aktivierung des Rezeptors hTAS2R4 zu erreichen, lagen ca. 100 000-fach über dem Schwellwert des Menschen [Schiffman, 1993a]. Insofern fehlt bislang der Nachweis, dass die TAS2R-Rezeptoren auch beim Menschen Bitterrezeptoren darstellen [Margolskee, 2002]. Die bisherigen Resultate zur Größe und Spezifität der TAS2R-Rezeptorfamilie werfen aber auch weitere Fragen auf. Menschen können tausende von Stoffen als bitter wahrnehmen [Keast, 2002]. Die chemische Struktur der verschiedenen Bitterstoffe ist dabei sehr vielfältig [Keast, 2002; Delwiche, 2001]. Sie reicht von kleinen Molekülen wie Kaliumchlorid oder Harnstoff, bis zu sehr komplexen organischen Verbindungen wie Strychnin, Kolchizin, Amygdalin oder Salicin (Abb. 1.3). Die Größe der menschlichen TAS2R-Familie wird

dagegen nur auf ca. 80-120 Mitglieder, 1/3 davon Pseudogene, geschätzt [Adler, 2000]. Dies ist in Anbetracht der großen Zahl und Komplexität der Bitterstoffe eine erstaunlich geringe Zahl von Rezeptoren. Zwei, der drei bislang funktionell untersuchten TAS2R-Rezeptoren, reagieren jeweils spezifisch nur auf einen von 55 getesteten Geschmacksstoffen [Chandrashekar, 2000]. Nur der Rezeptor mTAS2R8 reagierte neben Denatoniumbenzoat auch auf PROP [Chandrashekar, 2000]. Dies deutet an, dass die TAS2R-Rezeptoren vielleicht nur durch wenige Substanzen aktiviert werden können. Sollte dieses Verhalten typisch für TAS2R-Rezeptoren sein, so wäre die derzeit geschätzte Zahl der TAS2R-Rezeptoren bei weitem zu klein, um alle Bitterstoffe wahrnehmen zu können. Dies führt natürlich zu einer Reihe weiterer Fragen: Wie viele Mitglieder hat die menschliche TAS2R-Genfamilie? Wie viele verschiedene Substanzen können denselben Rezeptor aktivieren? Ist die Zahl der TAS2R-Rezeptoren ausreichend, um alle Bitterstoffe wahrnehmen zu können oder muss es noch andere Bitterrezeptorfamilien geben? Um diese Fragen zu beantworten, ist es Ziel dieser Arbeit, menschliche Bitterstoff-Rezeptor-Kombinationen zu identifizieren und zu charakterisieren, sowie die Expression dieser Rezeptoren in menschlichen Geschmacksknospen nachzuweisen.

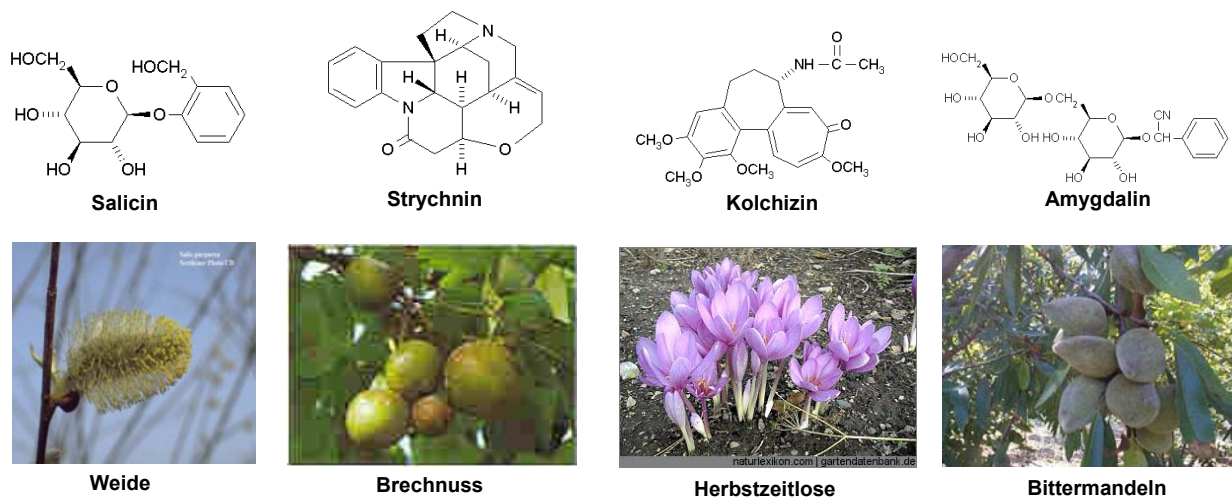


Abb. 1.3 Chemische Struktur einiger in Pflanzen vorkommenden Bitterstoffe

Salicin kommt in der Rinde vieler Weidenarten (*Salix spec.*) vor. Strychnin wird von der Brechnuss (*Nux vomica*) produziert. Kolchizin ist das Gift der Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*). Amygdalin ist ein Giftstoff in Bittermandeln (*prunus dulcis var. amara*) das aber auch in Apfeln vorkommt. Oben: chemische Struktur der Bitterstoffe *Quelle: www.sigmaaldrich.com*. Unten: Pflanzen, in den diese Stoffe vorkommen *Quelle: Herbstzeitlose: www.natur-lexikon.com; Brechnuss www.drinkease.com; Weide: pharmazie.uni-greifswald.de; Mandeln: jouet.roger.free.fr*.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

2.1.1.1 Chemikalien

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Chemikalien von Sigma, Merck oder Fluka bezogen.

2.1.1.2 Enzyme

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Enzyme von MBI-Fermentas, Roche, Eppendorf, Invitrogen oder NEB bezogen.

2.1.2 Puffer und Lösungen

50 x TAE	2 M Tris-Base; 0,1 M Essigsäure; 0,05 M EDTA; pH 8,0; autoklavieren.
20 x SSC	3 M NaCl; 0,3 M Na ₃ Citrat; pH 7,0; autoklavieren.
Trypsin-Lösung	0,05% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS; pH7,4.
B1	0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; pH 7,5.
B3	0,1 M Tris; 0,1 M NaCl; 0,05 M MgCl ₂ ; pH 9,5.
PBS	8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na ₂ HPO ₄ ; 0,24 g KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4.
C1	130 mM NaCl; 5 mM KCl; 10 mM HEPES; 2 mM CaCl ₂ ; 10 mM Glucose; pH 7,4.
C2	10 ml serumfreies Zellkulturmedium; 10 µl Fluo-4-AM; 100 µl Probenicid.
Probenicid	0,1 g Probenicid in 1 ml 0,5 M NaOH lösen.
Fluo-4-AM	50 mg in 22 µl DMSO lösen; bei -20°C lagern; innerhalb von 3 Tagen verbrauchen.
DEPC-Wasser	0,1 % Diethylpyrocarbonat in Wasser lösen, eine Stunde inkubieren, autoklavieren.
50x Denhardt's Lösung	5 g Ficoll (Typ 400); 5 g Polyvinylpyrrolidon; 5 g BSA (Fraktion V) in 500 ml Wasser gelöst.

2.1.3 Medien

2.1.3.1 Medien für Bakterien

LB	10 g/l Caseinhydrolysat; 5 g/l Hefextrakt; 10 g/l NaCl; pH 7,5; autoklavieren.
LB-Agar	10 g/l Caseinhydrolysat; 5 g/l Hefextrakt; 10 g/l NaCl; 1,5% Agar; pH 7,5; autoklavieren.
SOC	20 g/l Caseinhydrolysat; 5 g/l Hefextrakt; 0,5 g/l NaCl; 10 ml/l 0,25 M KCl; pH 7,0; autoklavieren; dann steril 5 ml/l 2M MgCl ₂ und 20 ml/l 1M Glucose zugeben.

2.1.3.2 Medien für Zellkultur

DMEM serumfrei	Dulbecco's Modified Eagle Medium; 4,5 g/l Glucose (Invitrogen).
DMEM + Serum	Dulbecco's Modified Eagle Medium; 4,5 g/l Glucose (Invitrogen); 100 ml/l Fötale Kälber Serum (Biochrom), hitzeinaktiviert, 10 ml/l Penicillin (10 000 Units/ml) Streptomycin-Lösung (10 mg/ml; Sigma); 10 ml/l L-Glutamin-Lösung (200 mM; Biochrom).

2.1.4 Antibiotika

2.1.4.1 Antibiotika für Bakterienkultur

Ampicillin (Sigma)	Stammlösung: 50 mg/ml in Wasser gelöst; sterilfiltriert, bei -20°C gelagert; Endkonzentration 50 µg/ml.
Kanamycin (Sigma)	Stammlösung: 50 mg/ml in Wasser gelöst; sterilfiltriert, bei -20°C gelagert; Endkonzentration 50 µg/ml.
Tetracyclin (Sigma)	Stammlösung: 50 mg/ml in Ethanol : Wasser 1:1 gelöst; bei -20°C gelagert; Endkonzentration 50 µg/ml.

2.1.4.2 Antibiotika für Zellkultur

G418 Sulfat (Calbiochem)	Stammlösung: 100 mg/ml; bei -20°C gelagert.
Zeocin (Invitrogen)	Stammlösung: 100 mg/ml; bei -20°C gelagert.
Hygromycin (Invitrogen)	Stammlösung: 100 mg/ml; bei 4°C gelagert.

2.1.5 Bakterien

- E. coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene)
- E. coli* TOP10 (Invitrogen)
- E. coli* DH5α (Invitrogen)

2.1.6 Zelllinien und zugehörige Medien und Antibiotika

HEK293 flp-in (Invitrogen)	DMEM + Serum; 100 µg/ml Zeocin
HEK293 flp-in G15 (Elena Chirokova)	DMEM + Serum; 100 µg/ml Zeocin; 200 µg/ml G418

2.1.7 Plasmide

2.1.7.1 Konstruktion des Expressionsplasmids für die TAS2R-Rezeptoren

Grundlage ist der Vektor pcDNA5_FRT (Invitrogen). In diesem Vektor ist neben der EcoRI Restriktionsschnittstelle in der "Multiple Cloning Site" noch eine zweite EcoRI Schnittstelle im Gen für die Hygromycinresistenz vorhanden. Durch eine Punktmutation wurde diese Schnittstelle zerstört. Unter Nutzung der HindIII und Apal Schnittstelle (kursiv) in der "Multiple Cloning Site" wurde ein DNA-Fragment

eingefügt, das für die 45 N-terminalen Aminosäuren des Somatostatinrezeptor Subtyp 3 der Ratte (SST-Epitop, fett) und das Glycoprotein-D-Epitop des Herpes Simplex Virus (HSV-Epitop, unterstrichen) kodiert:

```

HindIII
aagcttggatccgccaccatggccgctgttacctatccttcacccgtgcctacgacctggaccctgggaatgcatcctcagcctggcccct
ggacacgctccctgggaatgcatctgctggcactagcctggcaggactggctgtcagtgggcgaattctgcagatatccatcacactggcgg
EcoRI                               NotI
ccgccagcctgaactcgctcctgaagaccggaagattaatctagagggccc
Apal

```

Anschließend wurde die komplette kodierende Region der TAS2R-Rezeptoren unter Erhaltung des Leserahmens zum SST- und HSV-Epitop zwischen die EcoRI und NotI Schnittstellen (kursiv) eingefügt.

2.1.7.2 Plasmide zur Klonierung von DNA Fragmenten aus PCR-Reaktionen

DNA-Fragmente, die sequenziert werden sollten, wurden in die Plasmide pCR-TOPO2.1 (Invitrogen), pCR-TOPOII (Invitrogen) oder pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen) kloniert.

2.2 Grundlegende molekularbiologische Methoden

2.2.1 Phenol-Chloroform Extraktion

RNA- oder DNA-Lösungen wurden 1:1 mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (50:49:1) versetzt, kräftig gemischt und zentrifugiert (10 Min.; 14000 U/Min.). Der wäßrige Überstand wurde abgenommen und 1:1 mit Chloroform versetzt, gemischt und zentrifugiert (10 Min.; 14000 U/Min.).

2.2.2 DNA Fällung

Die wässrige DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und dem 2,5-fachen Volumen an Ethanol versetzt, gemischt und 30 Min. bei -20°C inkubiert. Nach der Zentrifugation (10 Min.; 14000 U/Min.) wurde das Pellet zweimal mit 80% Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und dann im gewünschten Volumen gelöst.

2.2.3 Bestimmung von RNA- / DNA-Konzentrationen

Die RNA bzw. DNA wurde in geeigneter Verdünnung in Quarzküvetten bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen. Die Gesamtausbeute wurde nach folgender Formel berechnet:

Ausbeute [µg/ml] = Extinktion 260 nm x Verdünnungsfaktor x Probenvolumen (ml) x Absorptionskoeffizient.

Als Absorptionskoeffizient wurden folgende Werte benutzt: für doppelsträngige DNA 50 µg/ml, für einzelsträngige DNA 33 µg/ml, für RNA 40 µg/ml [Sambrook, 1989].

Durch Bestimmung des A_{260}/A_{280} Quotienten, der bei 1,6-1,8 liegen sollte, wurde die DNA auf Proteinverunreinigungen hin untersucht [Sambrook, 1989].

2.2.4 Agarosegelelektrophorese

Je nach Größe der DNA-Fragmente wurde 0,8 -2% Agarose in 1 x TAE-Puffer angesetzt, aufgeköcht und je 100 ml mit 3 µl einer Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) versetzt. Nach dem Aushärten des Gels, wurde eine elektrophoretische Größentrennung der DNA-Fragmente in 1 x TAE-Puffer + Ethidiumbromid durchgeführt.

2.2.5 Isolation von Plasmid-DNA

Analytische Mengen von Plasmid-DNA (1 -10 µg) wurden mit Hilfe des JETquick Plasmid Miniprep Spin Kits (Genomed) nach Anleitung des Herstellers isoliert.

Präparative Mengen von Plasmid-DNA (200 -500 µg) wurden mit Hilfe des NukleoBond Plasmid Maxi Kits (Clontech) nach Anleitung des Herstellers isoliert.

2.2.6 Verdau von DNA durch Restriktionsenzyme

Üblicherweise wurde ~1 µg Plasmid-DNA mit einem 5-fachem Überschuss an Enzymaktivität bei den vom Hersteller angegebenen Temperaturen und Pufferbedingungen für 2 Stunden verdaut.

2.2.7 Isolation von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente und geschnittene Plasmide wurden vor der Klonierung auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die gewünschte Bande wurde ausgeschnitten und die DNA mit dem QIAquick Gelextraktions Kit (Quiagen) nach Anleitung des Herstellers eluiert.

2.2.8 Klonierung

2.2.8.1 Ungerichtete Klonierung von DNA aus PCR-Reaktionen

PCR-Reaktionsprodukte von Taq-DNA-Polymerase wurden durch das TOPO T/A Cloning Kit (Invitrogen) nach Anweisung des Herstellers kloniert. Pfu-DNA-Polymerase PCR-Reaktionsprodukte wurden durch das TOPO blunt end Cloning Kit (Invitrogen) nach Anweisung des Herstellers kloniert.

2.2.8.2 Gerichtete Klonierung

Zur gerichteten Klonierung wurden Plasmid und DNA-Insert mit Enzymen verdaut, die komplementäre DNA-Überhänge erzeugen, geluliert und dann in äquimolaren Mengen mit Fast Link Ligase (Biozym) nach Anweisung des Herstellers ligiert. Abweichend von der Empfehlung des Herstellers wurde die Ligationsreaktion aber erst nach mindestens einstündiger Reaktion transformiert.

2.2.9 Transformation

Für Transformationen von Ligationsreaktionen in Bakterien wurden hochkompetente Zellen (Kompetenz~ 10^9 Kolonien/µg DNA) *E. coli* TOP10 (Invitrogen) nach Anweisung des Herstellers

verwendet. Für die Transformation von vorhandenen Plasmiden wurde *E. coli* DH5 α (Kompetenz $\sim 10^6$ Kolonien/ μ g DNA) benutzt.

2.2.10 Die Poymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

2.2.10.1 Design von Oligonukleotiden

Oligonukleotidsequenzen wurden so gewählt, dass deren physikalische Schmelztemperatur üblicherweise bei 68°C lag. Zur Berechnung der Schmelztemperatur von Oligonukleotidsequenzen wurde die „Nearest Neighbour“ Methode [Breslauer, 1986] verwendet. Restriktionsschnittstellen und Kozak-Sequenz, die zur Klonierung und Expression der durch PCR amplifizierten DNA Sequenzen nötig sind, wurden bei der Berechnung der Schmelztemperatur nicht berücksichtigt. Die in der PCR-Reaktion verwendete Hybridisierungstemperatur lag meist bei 64°C. Soweit möglich, wurden Oligonukleotide mit einem G/C Gehalt von $\sim 50\%$ verwendet.

2.2.10.2 Liste der benutzten Oligonukleotide

Tabelle 2.1 Oligonukleotidsequenzen

Oligonummer + Name	Zielgen	Spezies	Sequenz
91 hT2R16 F	hTAS2R16	Homo sapiens	GGCCAATTGGAATTCATGATACCCATCCAACACTCACTGTCTTCT
92 hT2R16 R845	hTAS2R16	Homo sapiens	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCCGCACTTTCCCTTTAGAATCCTTTTCAAC
109 hT2RP26 F1	hTAS2R38	Homo sapiens	GGCCAATTGGAATTCATGTTGACTCTAACTCGCATCCGCA
110 hT2RP26 R 1001	hTAS2R38	Homo sapiens	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCCGCACAGTGTCCGGGATCTG
111 hT2RP24 R971	hTAS2R40	Homo sapiens	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCCAGAGTCTGCCCTTTAGGTAAAGAGG
112 hT2RP24 F1	hTAS2R40	Homo sapiens	GGCCAATTGGAATTCATGGCAACGGTGAACACAGATGC
113 hT2RP10 R1022	hTAS2R42	Homo sapiens	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCCAAAGGTAAAGCATTGGTGTTTTGTATAGTT
114 hT2RP10 F1 (SmaI)	hTAS2R42	Homo sapiens	GGCCAATTGGGGCCCAATGCTCTTCTGCAATGGTTTGATTGTAAATTTATTAA
117 hT2RP27 R923	hTAS2R41	Homo sapiens	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCCGCCACCCAGAAGCCCT
118 hT2RP27 F1	hTAS2R41	Homo sapiens	GGCCAATTGGAATTCATGCAAGCAGCACTGACGGCCTTCTCGTGTTG
119 hT2R8 F1 (SmaI)	hTAS2R8	Homo sapiens	GGCCAATTGGGGCCCAATGTTTCAGTCTGCAGATAACATCTTTATAATC
201 hT2R8 F1 SmaI EcoRV	hTAS2R8	Homo sapiens	GGCCAATTGCCGGGCGATGTTTCAGTCTGCAGATAACATCTTTATAATC
120 hT2R3 F1 (SmaI)	hTAS2R8	Homo sapiens	GGCCAATTGGGGCCCAATGATGGGACTCACCGAGGG
121 hT2RP25 R1016	hTAS2R39	Homo sapiens	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCCAGAGTCCACTCTTTGGGTAAAGATGA
122 hT2RP25 F1	hTAS2R39	Homo sapiens	GGCCAATTGGAATTCATGCTAGGGAGATGTTTTCTCCAGACAC
141 hT2R4 F1	hTAS2R4	Homo sapiens	GGCCAATTGGAATTCATGCTTCGTTATTCTATTTCTCTGCTATTAT
142 hT2R4 R900	hTAS2R4	Homo sapiens	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCTTTTTTGAACAAAGATCTTCTTTGCTGT
143 hT2R1 F1	hTAS2R1	Homo sapiens	GGCCAATTGGAATTCATGCTAGAGTCTCACCTCATTATCTATTTCTTC
144 hT2R1 R900	hTAS2R1	Homo sapiens	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCTGACAGCACTTACTGTGGAGGAG

145 hT2X4,X1 F1	hTAS2R43	Homo sapiens	GGCCAATTGGAATTCATGATAACTTTTCTACCCATCATT TTTCCA
147 hT2X1 R930	hTAS2R43	Homo sapiens	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCCGCTGGAGATGAAGTCTTC TCTCCTTTCAC
148 hT2RX9 R900	hTAS2R45	Homo sapiens	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCCGCTGACCTCATTGCCAC AAACTGAAAG
149 hT2RX9 F1	hTAS2R45	Homo sapiens	GGCCAATTGGAATTCATGATAACTTTTCTGCCCATCATATTT TCC
150 hT2RX2 F1 (=hT2RX2 R)	hTAS2R44	Homo sapiens	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCCGCTGGAGATGAAGGCTT CTCTCCTTTC
151 hT2RX2 F1	hTAS2R44	Homo sapiens	GGCCAATTGGAATTCATGACAACCTTTTATACCCATCATT TTTCCA
152 hT2RX3 R930	hTAS2R47	Homo sapiens	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCCGCTGGAGACGAAGGCTT CTGTCT
153 hT2RX3 F1	hTAS2R47	Homo sapiens	GGCCAATTGGAATTCATGATAACTTTTCTGCCCATCATT TTTTC
156 hT2RX6 R900	hTAS2R48	Homo sapiens	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCCGCTGTCATCTGCCAC AAAAC
157 hT2RX6 F1	hTAS2R48	Homo sapiens	GGCCAATTGGAATTCATGATGTGTTTTCTGCTCATCATTT CAAT
158 hT2RX7 R900	hTAS2R50	Homo sapiens	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCCGCACCTAATCTGACAC AAAATCAAAGAA
159 hT2RX7 F1	hTAS2R50	Homo sapiens	GGCCAATTGGAATTCATGATAACTTTTCTATACATTTTT TTTTCAATCTAATAATGG
160 hT2RX8 R930	hTAS2R49	Homo sapiens	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCCGCTGGAGTTGACTGGT TCTGCTCTTT
161 hT2RX8 F1	hTAS2R49	Homo sapiens	GGCCAATTGGAATTCATGATGAGTTTTCTACACATTGTT TTTTTCCAT
162 hT2R9 R908	hTAS2R9	Homo sapiens	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCCGCTGGAACAAAAGGCT TTCTTCTAAGG
163 hT2R9 F	hTAS2R9	Homo sapiens	GGCCAATTGGAATTCATGCCAAGTGAATAGAGGCAATAT ATATTATT
164 hT2R8 R899	hTAS2R8	Homo sapiens	CCTCAATTGTCATCAGCGGCCCGCTATCATGCAGGCAAT TTTCTACATGTC
165 hT2R8 F	hTAS2R8	Homo sapiens	GGCCAATTGGAATTCATGTTTCTGCTGAGATAACATCTT TATAATC
166 hT2R7 R922	hTAS2R7	Homo sapiens	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCCGGATTTGTTTATGTT GTTGGAATTTTCTTCTT
167 hT2R7 F	hTAS2R7	Homo sapiens	GGCCAATTGGAATTCATGGCAGATAAAGTGCAGACTACT TTTATTGTT
168 hT2R5 R881	hTAS2R5	Homo sapiens	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCCGCTGGCCCCAGCATCT CTC
169 hT2R5 F	hTAS2R5	Homo sapiens	GGCCAATTGGAATTCATGCTGAGCGCTGGCCTAG
170 hT2R3 R925	hTAS2R3	Homo sapiens	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCCGCAGAAAAATGGTCC CTTGGACT
171 hT2R3 F	hTAS2R3	Homo sapiens	GGCCAATTGGAATTCATGATGGGACTCACCGAGGG
172 hT2R10 R892	hTAS2R10	Homo sapiens	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCCGCTGTGACTCTGAGAT TTTCTCTTCTCAC
173 hT2R10 F	hTAS2R10	Homo sapiens	GGCCAATTGGAATTCATGCTACGTGTAGTGAAGGCATCT T
174 hT2R13 R910	hTAS2R13	Homo sapiens	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCCGCTCGTTTAGCCATACC TTAGCTGC
175 hT2R13 F1	hTAS2R13	Homo sapiens	GGCCAATTGGAATTCATGGAAAGTGCCCTGCCG
176 hT2R14 R954	hTAS2R14	Homo sapiens	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCCGCAGATGATTCTCTAA ATCTTTGTGACCTGAG
177 hT2R14 F1	hTAS2R14	Homo sapiens	GGCCAATTGGAATTCATGGGTGGTGTATAAAGAGCATATT TACA
202 hT2R3 F1 Smal EcoRV	hTAS2R3	Homo sapiens	GGCCAATTGCCCGGGCGATGATGGGACTCACCGAGGG
203 hT2RP10 F1 Smal EcoRV	hTAS2R24	Homo sapiens	GGCCAATTGCCCGGGCGATGCTCTTCTGCAATGGTTTGAT TAAATTTATTAAT
211 hT2R3 F1n Smal/EcoRV	hTAS2R3	Homo sapiens	GGCCAATTGCCCGGGCGTGTGGGACTCACCGAGGG
212 hT2R3 R951n	hTAS2R3	Homo sapiens	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCCGCAGAAAAATGGTCC CTTGGATC
194 mT2R5 R903	mTAS2R5	Mus musculus	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCCGCAAAGAACTTTAATCCT TGCAGTACCTTTA

195 mT2R5 F1	mTAS2R5	Mus musculus	GGCCAATTGGAATTCATGCTGAGTGCGGCAGAAG
190 mT2R8 R894	mTAS2R8	Mus musculus	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCCCTGTAGAAACAGAAA ATCTTCTTTAG
191 mT2R8 F1	mTAS2R8	Mus musculus	GGCCAATTGGAATTCATGCTCTGGGAACTGTATGTATTT
192 mT2R19 R1008	mTAS2R19	Mus musculus	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCCAGATGGCATTATACAG GCTTCTGA
193 mT2R19 F1	mTAS2R19	Mus musculus	GGCCAATTGGAATTCATGATGGAAGGTCATATGCTCTTCTT
137 rT2R1 F1	rTAS2R1	Rattus norvegicus	GGCCAATTGGAATTCATGATGGAAGGGCATATACTCTTCTT CT
138 rT2R1 R1008	rTAS2R1	Rattus norvegicus	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCCGGATGGCATTATACAG GCTTCTGAG
139 rT2R2 F1	rTAS2R2	Rattus norvegicus	GGCCAATTGGAATTCATGTTCTCACAGAAAACAACTACAG CCA
140 rT2R2 R1002	rTAS2R2	Rattus norvegicus	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCCGAAAACGACAGTGTC CATATCTTTGGA
186 rT2R3 R900	rTAS2R3	Rattus norvegicus	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCCGGAAGACTCTGGGCT CCAGAAC
187 rT2R3 F1	rTAS2R3	Rattus norvegicus	GGCCAATTGGAATTCATGGTGCCAACCCAAGTCAC
184 rT2R4 R927	rTAS2R4	Rattus norvegicus	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCCCTGTGACTGAGAGATTT CTTTTGTCTC
185 rT2R4 F1	rTAS2R4	Rattus norvegicus	GGCCAATTGGAATTCATGCTGAGTGACAGCAGAAGG
188 rT2R5 R930	rTAS2R5	Rattus norvegicus	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCCCTGTGTTTCTGAATTCTT TTCTTCC
189 rT2R5 F1	rTAS2R5	Rattus norvegicus	GGCCAATTGGAATTCATGCTGGGTGCAATGGAAGGT
180 rT2R7 R930	rTAS2R7	Rattus norvegicus	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCCATCCTTTTCTTACATC TCAGATAGTTATC
181 rT2R7 F1	rTAS2R7	Rattus norvegicus	GGCCAATTGGAATTCATGGGAAGCAGCCTGTATGATATCTT
182 rT2R8 R945	rTAS2R8	Rattus norvegicus	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCCGTTAATTGGTTTGCCA GATGGAGTTA
183 rT2R8 F1	rTAS2R8	Rattus norvegicus	GGCCAATTGGAATTCATGGAACCTGTCATTACGTCTTT
178 rT2R9 R930	rTAS2R9	Rattus norvegicus	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCCCTGTGGCCCTGAGATCT TTTCC
179 rT2R9 F1	rTAS2R9	Rattus norvegicus	GGCCAATTGGAATTCATGCTCAGTGACAGCAGAAGGCA
135 rT2R12 F1	rTAS2R12	Rattus norvegicus	GGCCAATTGGAATTCATGCTATCAACTGTATCAGTTTTCTTC ATGTC
136 rT2R12 R927	rTAS2R12	Rattus norvegicus	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCCGGTCAACCAGAATCC CCTG

2.2.10.3 Amplifizierung von DNA-Fragmenten aus cDNA

Die Erzeugung von DNA-Fragmenten aus cDNA wurde mit Hilfe von Taq-DNA-Polymerase (Eppendorf) oder Advantage-DNA-Polymerase (Clontech) im Puffersystem des jeweiligen Herstellers und mit den jeweils vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Soweit notwendig, wurden die Reaktionsbedingungen durch Variation der $MgCl_2$ -Konzentration oder der Hybridisierungstemperatur optimiert. Ein typisches PCR-Protokoll sah dabei wie folgt aus:

- 1) Vordenaturierung: 2 Min.; 94°C
- 2) Denaturierung: 1 Min.; 94°C
- 3) Hybridisierung: 1 Min.; Temperatur vom Oligonukleotid abhängig (meist 64°C)
- 4) Synthese: 1 Min. Synthesezeit für je 1000 Basenpaare (bp) die amplifiziert werden sollen; 68°C (Advantage-DNA-Polymerase), 72°C (Taq-DNA-Polymerase); 35 x Wiederholung der Schritte 2-4.

5) Auffüllen: 5 Min. 68°C (Advantage-DNA-Polymerase), 72°C (Taq-DNA-Polymerase)

2.2.10.4 Klonierung von TAS2R-Rezeptoren aus genomischer DNA

Für die Klonierung der putativen Bitterrezeptoren konnte genomische DNA als Ausgangsmaterial verwendet werden. Dies ist möglich, da die kodierende Region dieser Gene nicht durch Introns unterbrochen wird. Um das Risiko zu minimieren, durch die PCR Punktmutationen zu erzeugen, wurde Pfu-DNA-Polymerase verwendet. Dieses Enzym besitzt eine deutlich geringere Fehlerrate als Taq-DNA-Polymerase. Um die erzeugten DNA Fragmente gezielt in die Expressionsvektoren klonieren zu können, wurden gleichzeitig vor und hinter die zu amplifizierende Sequenz Restriktionschnittstellen in die benutzten Oligonukleotide eingefügt. Dieser Teil des Oligonukleotids hat jedoch keine homologe Sequenz auf dem entsprechenden Abschnitt der genomischen DNA und kann daher keinen Doppelstrang ausbilden. Bei der Verwendung von Pfu-DNA-Polymerase wurde mit solchen Primern eine stark verminderte Ausbeute an amplifizierten DNA-Fragmenten beobachtet. Um bei einer geringen Fehlerrate eine hohe Ausbeute an amplifizierten DNA Fragmenten zu erreichen, wurde in dieser Arbeit ein aus zwei Reaktionen bestehendes PCR-Protokoll entwickelt. Als erstes wird eine normale PCR-Reaktion mit Advantage Polymerase (Clontech) nach Anleitung des Herstellers mit 1,5 µg genomischer DNA als Ausgangsmaterial, durchgeführt:

- 1) Vordenaturierung: 2 Min.; 94°C
- 2) Denaturierung: 1 Min.; 94°C
- 3) Hybridisierung: 1 Min.; Temperatur vom Oligonukleotid abhängig (meist 64°C)
- 4) Synthese: 1 Min. pro 1000 bp, 68°C; 3 x Wiederholung Schritt 2-4

Der Sinn dieser ersten Reaktion ist es mit einem Enzym ohne „Proof Reading“- Aktivität vollständig zum Oligonukleotid passendes Ausgangsmaterial zu erstellen. In einer zweiten PCR-Reaktion wird dann Pfu-DNA-Polymerase (Promega) nach Anleitung des Herstellers zusammen mit 5 µl des ersten Reaktionsansatzes als Ausgangsmaterial eingesetzt:

- 1) Vordenaturierung: 2 Min.; 94°C
- 2) Denaturierung: 1 Min.; 94°C
- 3) Hybridisierung: 1 Min.; Temperatur vom Oligonukleotid abhängig (meist 64°C)
- 4) Synthese: 2 Min. pro 1000 bp; 72°C; 35 x Wiederholung Schritt 2-4
- 5) Auffüllen: 5 Min.; 72°C

2.2.10.5 Erzeugung von Punktmutationen

Punktmutationen wurden, soweit notwendig, durch das Quick Change Kit (Stratagene) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Abweichend von dem Protokoll wurde Pfu-DNA-Polymerase von Promega und eine Synthesezeit von 2 Min. pro 1000 bp benutzt.

2.2.11 Herstellung von cDNA aus mRNA

Die Synthese von cDNA erfolgte nach dem Protokoll für das Smart cDNA Kit (Clontech) nach Anweisung des Herstellers.

2.3 Analyse der Sequenzdaten der Genomprojekte

2.3.1 Identifizierung neuer TAS2R-Sequenzen in den Datenbanken des öffentlichen humanen Genomprojekt

Um unbekannte Mitglieder der TAS2R-Rezeptorfamilie zu finden, wurden zunächst aus der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) alle schon identifizierten TAS2R-Rezeptorsequenzen gesammelt. Um möglichst alle Mitglieder der TAS2R-Rezeptorfamilie aufspüren zu können, wurden die Aminosäuresequenzen aller bekannten TAS2R-Rezeptoren zu einer so genannten „tblastn-Suche“ in der Datenbank des humanen Genomprojektes verwendet. Bei diesem Suchverfahren werden die Aminosäuresequenzen der Rezeptoren mit der in allen 6 Leserahmen translatierten Sequenz des humanen Genomprojektes verglichen. Dieses Verfahren ist einer Suche mit den Nukleinsäuresequenzen der Rezeptoren überlegen, da aufgrund des degenerierten genetischen Codes der Konservierungsgrad der Aminosäuresequenz höher ist, als der Konservierungsgrad der Nukleinsäuresequenz. Mit den neu identifizierten Sequenzen wurde die Suche wiederholt, bis keine weiteren neuen Sequenzen mehr zu finden waren. Für die Vollständigkeit dieses Analyseverfahrens spricht, dass selbst zu den TAS2R-Rezeptoren entfernt verwandte Sequenzen, wie olfaktorische Rezeptoren oder metabotrophe Glutamatrezeptoren identifiziert wurden.

2.3.2 Dendrogramme, Sequenzvergleiche und Sequenzanalysen

Alle Dendrogramme und Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm AlignX von Vektor NTI durchgeführt. Die Analyse dieser Sequenzen auf Transmembranregionmotive erfolgte mit dem Programm Tmpred (EMBnet.org). Die Analyse der Sequenzen auf Glykosylierungs-, Phosphorylierungs-, und „Myristoylierungsmotive“ erfolgte mit dem Programm PredictProtein (columbia.edu).

2.3.3 Identifizierung von Genpolymorphismen (SNPs)

Die Identifizierung von SNPs (**S**ingle **N**ukleotid **P**olymorphism's) erfolgte durch Analyse SNP-Datenbank (ncbi.nlm.nih.gov). Weitere SNPs wurden durch die Sequenzierung von PCR amplifizierten DNA-Fragmenten ermittelt.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Passagieren der Zellen

Die HEK293 Zellen werden in DMEM + Serum ausgesät, so dass sie 10-15 % der Bodenfläche einer 10 cm Schale bedecken. Sobald sie eine Dichte von ca. 90 % erreicht haben, werden sie durch 2-minütige

Inkubation mit Trypsin-Lösung vom Boden der Schale abgelöst und durch 15-faches Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von DMEM + Serum gestoppt, die Zellen durch Zentrifugieren (5 Min., 1000 U/Min.) pelletiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 10 ml frischem DMEM + Serum durch 15-faches Auf- und Abpipettieren resuspendiert und ein Aliquot der vereinzelt Zellen in eine neue Kulturschale überführt. Es wurde darauf geachtet, die Zellen niemals eine Dichte von 100% erreichen zu lassen, da sonst durch Kontaktinhibition eine permanente Veränderung des Zellmetabolismus erfolgen kann. Nach 25-30 Passagen wurden die Zellen verworfen. Als ersatz wurde ein neues Zellaliquot aufgetaut und kultiviert.

2.4.2 Beschichten von Platten

Um eine bessere Haftung der Zellen auf Glasplättchen und 96-Lochplatten zu erreichen, wurden diese vor dem Aussähen der Zellen durch eine 30-minütige Inkubation mit 10 mg/ml Poly-D-Lysin in PBS beschichtet. Die Kulturschalen, in denen Zellen für FLIPR-Experimente gehalten wurden, waren mit 1 µg/ml Poly-D-Lysin beschichtet.

2.4.3 Lagerung von Zelllinien

Zunächst wurden die Zellen in einer 150 cm² Flasche bis zu einer Konfluenz von ca. 90% herangezogen. Danach werden sie durch Trypsin-Lösung vom Schalenboden gelöst, vereinzelt, abzentrifugiert und in 20 ml DMEM + Serum + 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert. Die so behandelten Zellen wurden in 1 ml Aliquots portioniert und langsam bei -80°C eingefroren. Die dauerhafte Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

2.4.4 Auftauen einer Zelllinie

Zum Auftauen der Zellen wurde eine 10 cm Schale mit DMEM + Serum vorbereitet und dann ein Aliquot kurz angetaut. Das noch halb gefrorene Pellet wurde dann in die Schale transferiert. Nach dem Adhieren der Zellen (2-4 Stunden) wurde das Medium abgesaugt und durch neues ersetzt um DMSO und tote Zellen zu entfernen.

2.4.5 Transfektion von Zellen

Zellen aus einer 10 cm Kulturschale wurden zunächst abgelöst, resuspendiert (Kapitel 2.4.1) und dann in einer Dichte von 20 -30 % auf Platten ausgesäht, die mit 10 µg/ml Poly-D-Lysin beschichtet waren. Danach wurden die Zellen ca. 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Zur Transfektion sollten die Zellen eine Dichte von 50-60 % besitzen. Ist die Zelldichte noch unter 40 %, so wird die Transfektion um einen Tag verschoben. Die Transfektion bei zu geringer Zelldichte verursacht ein Absterben vieler Zellen.

Zur Transfektion einer 96-Loch-Platte wurden pro Loch 0,3 µg Plasmid-DNA in 25 µl serumfreiem DMEM gelöst. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 0,6 µl Lipofektamin 2000 (Invitrogen) in 25 µl serumfreiem DMEM genau 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden beide Komponenten vereinigt, durch Pipettieren gemischt und dann für 20 -30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit bildet sich der DNA-Lipofektamin Komplex. In der Zwischenzeit wurde das Kulturmedium der Zellen

entfernt und durch serumfreies DMEM (100 µl/Loch) ersetzt. 20 Minuten später wurde in jedes Loch der Platte 50 µl des DNA-Lipofektamin-Komplex pipettiert und diese im Brutschrank inkubiert. Nach 4 - 6 Stunden wurde das Medium abgesaugt und durch serumhaltiges Kulturmedium ersetzt. Zellen in anderen Plattentypen wurden äquivalent behandelt. Nur die benutzten Volumina der einzelnen Komponenten variierten (Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2 Pipettierschema für Lipofektamin bei Benutzung unterschiedlicher Plattentypen

Plattentyp	Menge Lipofektamin [µl]	Menge DNA [µg]	Menge Medium zur Lösung von DNA oder Lipofektamin [µl]	Menge DNA-Lipofektamin Komplex [µl]	Menge DMEM serumfrei [µl]
96 Loch	0,6	0,3	25	50	50
24 Loch	3	1,5	50	100	500
6 Loch	15	7,5	250	500	2500
10 cm Schale	84	42	1400	2800	14000

2.5 Einzelzell-Calcium-Imaging

Die Zellen wurden 24 - 30 Stunden nach der Transfektion gemessen. Vor dem Beginn der Messungen wurde das Kulturmedium gegen 2 mM Fura-2-AM in serumfreiem Medium ersetzt und im Inkubator 60 Min. mit dem Farbstoff beladen. Anschließend wurde die Lösung entfernt und die Zellen mindestens, 10 Min. bis maximal 3 Stunden in 3 ml C1 bei Raumtemperatur äquilibriert.

Fura-2-AM ist ein Ca^{2+} -bindender Fluoreszenzfarbstoff der in Ca^{2+} -freiem Zustand bei einer Wellenlänge von 380 nm sein Anregungsmaximum hat. Nach Ca^{2+} -Bindung verschiebt sich sein Anregungsmaximum auf 340 nm. Die Beobachtung der Änderung der Ca^{2+} -Konzentration in einer Zelle kann daher besonders gut anhand des Quotienten der Wellenlängen bei 340 nm/380 nm beobachtet werden.

Die Einzelzell-Calcium Imaging-Versuche wurden mit der Polychrome II-Lichtquelle (TILL Photonics) und der Imago CCD-Kamera (TILL Photonics) an einem inversen Mikroskop (Olympus) mit UApo/340 40x Ölimmersionsobjektiv (Olympus) durchgeführt. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit der Software TILLvisION 4.0 (TILL Photonics).

Alle 5 Sekunden wurde ein Bildpaar bei einer Anregung von 340 nm bzw. 380 nm und einer realen Auflösung von 1280 x 1024 Pixel aufgenommen. Um die Messsignale zu verstärken, wurden je 4x4 Pixel zu einem Bildpixel zusammengefasst, dadurch lag Auflösung des Messsignals bei 320 x 256 Pixel. Die Belichtungsdauer für die einzelnen Bilder wurde, abhängig vom Beladungszustand der Zellen und der Qualität der jeweiligen Fura-2-AM-Charge vor jedem Experiment eingestellt. Sie lag üblicherweise bei 3-10 ms. Die Fluoreszenzintensitäten wurden in 4096 Graustufen dargestellt und die Zellantworten aus der Änderung der Lichtintensität der Zellen im 340 nm bzw. 380 nm Bild ermittelt. Die Berechnung der Intensitätsänderung erfolgte aus den gemittelten Grauwerten der markierten Einzelzellen nach einer Kompensation des Hintergrundes. Zur Darstellung der Messergebnisse wurde der Quotient aus dem 340

nm und dem 380 nm Bild benutzt. Die Detektion der Messsignale erfolgte bei einer Wellenlänge von 510 nm

2.6. Calcium-Imaging im Fluoreszenz-Platten-Lese-Gerät

24 - 33 Stunden nach der Transfektion wurde das Kulturmedium entfernt und gegen 50 µl der Lösung C2 ausgetauscht. In dieser Lösung wurden die Zellen dann 45 Min. im Inkubator mit dem Farbstoff beladen. Danach wurde die Farbstofflösung durch waschen (1 ml C1-Lösung/Loch) mit dem Cellwasher (Denley) entfernt. Der Waschvorgang ist so eingestellt, dass 100 µl C1 in jedem Loch der Messplatte verbleiben. Der Waschvorgang wurde noch 2 x im Abstand von je 30 Minuten wiederholt, um von den Zellen ausgeschiedene Farbstoffreste zu entfernen. Direkt nach dem letzten Waschen wurden die Zellen im FLIPR (Fluorescence Imaging Plate Reader, Molecular Devices) vermessen. Die Liganden wurden 3-fach konzentriert in C1-Lösung hergestellt, um den Verdünnungseffekt von 50 µl Ligandenkonzentrat auf 100 µl C1-Lösung zu berücksichtigen. Für die Messung wurde folgendes Programm verwendet:

Blendenöffnungszeit 0,4 Sekunden; Laser 0,35 Watt im „Constant Light“ Modus.

- 1) Aufzeichnen der Basislinie: 10 Bilder im Abstand von 6 Sekunden.
- 2) Applikation erster Ligand: Volumen 50 µl, Pipettiergeschwindigkeit 25 µl / Sek., 120 Bilder im Abstand von 1 Sekunde.
- 3) Aufzeichnung der Basislinie 20 Bilder im Abstand von 6 Sekunden.
- 4) Applikation zweiter Ligand: Volumen 50 µl, Pipettiergeschwindigkeit 25 µl / Sek., 120 Bilder im Abstand von 1 Sekunde.
- 5) Aufzeichnung der Basislinie 20 Bilder im Abstand von 6 Sekunden.

Als erste Ligandenapplikation wurde üblicherweise ein Bitterstoff als Testsubstanz zugegeben. Als zweite Applikation wurde Isoproterenol in einer Endkonzentration von 10 µM als Kontrolle verwendet. Isoproterenol aktiviert in HEK293 Zellen endogen vorhandene β-adrenerge Rezeptoren. Dies führt normalerweise zu einer Aktivierung von $G_{\alpha s}$ -Proteinen und damit zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP Spiegels. Da diese Effekte in nativen HEK293 Zellen keine Änderung des intrazellulären Calciumspiegels verursachen, sind sie im Calcium-Imaging nicht messbar. In HEK293/ $G_{\alpha 15}$ Zellen koppelt der β-adrenerge Rezeptor auch an $G_{\alpha 15}$ [Offermanns, 2001 #10] und aktiviert den IP_3 Pfad. Die daraus resultierenden Änderungen des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels kann im FLIPR beobachtet werden. Die Aufzeichnung eines Calciumsignals nach Stimulation mit Isoproterenol zeigt daher nicht nur, dass die Zellen geladen und responsiv sind sondern auch, dass $G_{\alpha 15}$ sowie die gesamte benutzte intrazelluläre Signalkaskade intakt sind. Diese Kontrolle ist besonders in Fällen wichtig, bei denen nach Applikation der ersten Testsubstanz kein Signal gemessen wurde. Sie erlaubt eine Reihe technischer Mängel wie z. B. Beladungsfehler, Variationen der Zellzahl oder Schädigung der Zellen als Ursachen auszuschließen.

2.7 Planung, Durchführung und Analyse von Dosiswirkungskurven im FLIPR

Für typische Experimente zur Bestimmung von Dosiswirkungskurven wird das in Abb. 2.1 A gezeigte Schema zur Transfektion benutzt. In einer 96-Loch-Platte wird als Negativkontrolle, in die Löcher A, B, C der Zeile 1-12 mit dem jeweils benutzten Expressionsplasmid ohne Rezeptorgen, transfiziert. Die Löcher D, E, F, G, H der Zeilen 1-11 werden mit dem zu untersuchenden Rezeptor transfiziert. Die Löcher D, E, F, G, H der Zeile 12 werden mit dem als Positivkontrolle verwendeten Rezeptor mTAS2R5, der auf Cycloheximid reagiert, transfiziert.

Für die Messung wurden die Zellen wie in Kapitel 2.6. beschrieben mit Fluo-4-AM beladen und dann getestet. Bei der Messung werden in jedes Loch der Messplatte nacheinander zwei Substanzen appliziert. In der ersten Applikation wird ein Ligand für den transfizierten Rezeptor in verschiedenen Konzentrationen getestet (Abb. 2.1 B) und dabei die dosisabhängige Vergrößerung der Signalamplitude gemessen. In der zweiten Applikation werden alle Löcher der Messplatte mit 10 μ M Isoproterenol stimuliert. Isoproterenol aktiviert den in HEK293 Zellen vorhandenen β -adrenergen Rezeptor (Kapitel 2.6). Die Größe des Calciumsignals nach Stimulation mit Isoproterenol ist daher proportional zu Anzahl der Zellen in jedem Loch der Messplatte. Daher kann dieses Signal benutzt werden, um die Messsignale auf Schwankungen der Zellzahlen zwischen den Löchern hin zu normalisieren. Um diese Variationen der Zellzahlen in der Auswertung zu berücksichtigen, wurden zur Berechnung der Dosiswirkungskurve nicht die Signalamplituden des TAS2R-Rezeptors verwendet, sondern für jedes Loch der Messplatte wurde der Quotient aus der Signalamplitude des TAS2R-Rezeptors und der Signalamplitude des β -adrenergen Rezeptors, berechnet (Abb. 2.1 C und Tabelle 2.3). Durch dieses Verfahren wird für das Signal jedes Loches der Messplatte auf die Zellzahl normiert.

Durch die Zugabe von Flüssigkeit während der Messung können z. B. durch mechanischen oder osmotischen Stress in Zellen Änderungen des intrazellulären Calciumspiegels hervorgerufen werden. Auch einige der getesteten Bitterstoffe können in Abhängigkeit von der benutzten Konzentration den intrazellulären Calciumspiegel beeinflussen. Um die Experimente auf solche Effekte hin zu kontrollieren, wurde die gleiche Konzentration der zu testenden Substanz in alle 8 Löcher einer Zeile appliziert. Da die Zellen in den Löchern A, B, C jeder Zeile keinen TAS2R-Rezeptor enthalten kann so für jede Substanzkonzentration kontrolliert werden, ob diese auch in Abwesenheit des TAS2R-Rezeptors Signale erzeugt. Nur für die Löcher D, E, F, G, H einer Zeile sind TAS2R-Rezeptor abhängige Signale zu erwarten. Zur Berechnung des Hintergrundsignals wird deshalb für jede Zeile der Mittelwert der drei Kontrollen (A, B, C) gebildet. Dieser ist das Maß für unspezifische Effekte der jeweils benutzten Ligandenkonzentration. Für die fünf mit Rezeptor-DNA transfizierten Löcher derselben Zeile (D, E, F, G, H) wird ebenfalls ein Mittelwert gebildet. Dieses Signal ist ein Gemisch aus dem spezifischen Signal des TAS2R-Rezeptors und dem unspezifischen Hintergrundsignal. Um das Rezeptorsignal zu erhalten, wird dann der Mittelwert der Kontrollen (A - C) vom Mittelwert des Signals der mit TAS2R-Rezeptor transfizierten Zellen (D - H) abgezogen. So normierte Messwerte sind die Grundlage für die Berechnung der Dosiswirkungskurven. Dies erfolgte mit der Regressionsfunktion des Programms Sigma Plot anhand der Formel $f(x) = 100 / [1+(EC_{50}/x)^{nH}]$; wobei x der Substanzkonzentration und nH dem Hill Koeffizient

entspricht. Anhand der errechneten Kurve wurde der Schwellwert und EC_{50} -Wert ermittelt. Soweit in dieser Arbeit Schwellwert und EC_{50} mit einem Messfehler angegeben werden, ist diese Angabe ein Mittelwert aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

Beispielrechnung zur Ermittlung des Basislinien und des rezeptorspezifischen Signals (Messwerte aus Tabelle 2.3 entnommen):

Mittelwert Zeile 10 A-C = 0,0270 Basislinie bei Applikation von 30 mM Salicinkonzentration.

Mittelwert Zeile 10 D-H = 0,1532 entspricht Rezeptorsignal auf 30 mM Salicin ohne der Basislinie um Basislinie korrigiertes Rezeptorsignal: $0,1532 - 0,0270 = 0,1262$

Abb. 2.1 C zeigt einen typischen Versuch zur Ermittlung einer Dosiswirkungskurve im FLIPR. Die Zellen wurden wie in Abb. 2.1A beschrieben transfiziert und die Ligandenstimulation erfolgte bei der ersten Applikation wie in Abb. 2.1B. In Zeile 12 wurde 10 μ M Cycloheximid appliziert, was den als Positivkontrolle verwendeten Rezeptor mTAS2R5 aktiviert. In allen mit Rezeptor transfizierten Zellen (Zeile 12 D, E, F, G, H), nicht aber in der Negativkontrolle (Zeile 12 A, B, C) sind deutliche Signale zu sehen. Dadurch kann in Fällen, bei denen keine Signale für die getestete Rezeptor-Liganden-Kombination aufgezeichnet werden, technische Mängel wie z. B. ungenügende Transfektionseffizienz oder geringe Zellvitalität als Ursache ausgeschlossen werden. Auch die mit dem zu untersuchenden Rezeptor transfizierten Zellen zeigen in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentrationen (Reihe 9, 10, 11; D, E, F, G, H) deutliche Signale. Diese sind nicht in den Löchern mit den Negativkontrollen (Reihe A, B, C) sichtbar. Nach Stimulation der Zellen mit Isoproterenol ist in allen Löchern der Messplatte eine Zellantwort zu sehen. Allerdings fällt diese in einigen Löchern z. B. 11A und 12A geringer aus, was auf eine geringere Zelldichte in diesen Löchern hin deutet.

Tabelle 2.3_Messwerte für Zeile 10 des in Abb 2.1 gezeigten FLIPR Experiments

Loch Nr.	Salicin-Amplitude Zeile10	Isoproterenol-Amplitude Zeile10	Quotient Salicin / Isoproterenol Zeile 10
A	916.8	26821	0.0341
B	713.6	27240	0.0262
C	508.8	24435	0.0207
D	4246	27344	0,1553
E	3493	24168	0.1445
F	4213	24307	0.1733
G	4458	31035	0.1436
H	4605	30874	0.1492

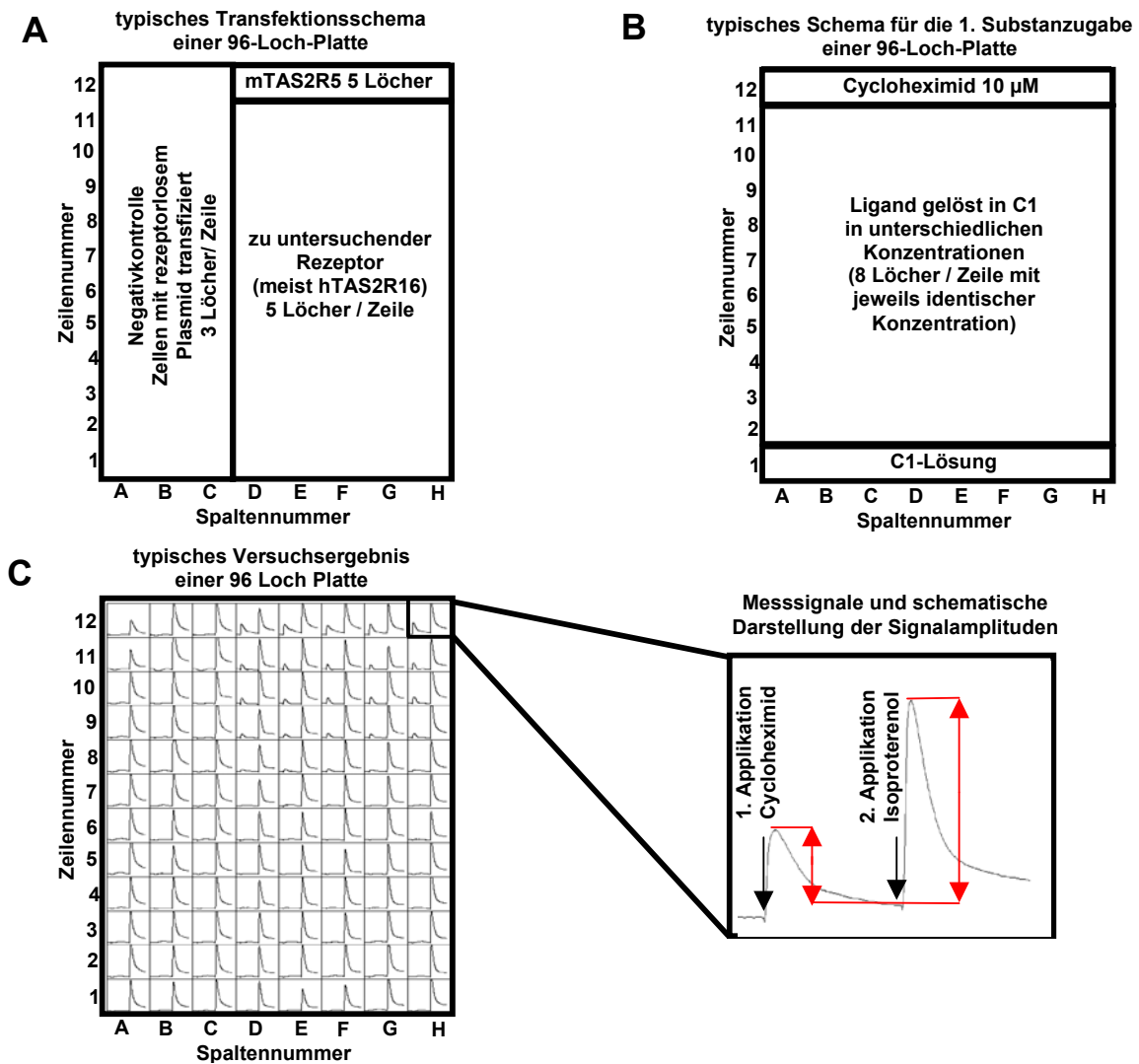


Abb. 2.1 Schemata der Transfektion, Liganden-Applikation und resultierende Meßergebnisse

A: Typisches Transfektionsschema einer 96-Loch-Platte für eine Dosiswirkungskurve. B: Schema der Liganden-Applikation. C: Typisches Versuchsergebnis. In der Vergrößerung ist eine typische Signalantwort einer mit mTAS2R5-Rezeptor transfizierten Zellpopulation in einem einzelnen Loch der Messplatte dargestellt. Das Signal nach der ersten Applikation (erster schwarzer Pfeil) zeigt die Zellantwort, die eine Stimulation durch den Bitterstoff Cycloheximid in den mit mTAS2R5 transfizierten Zellen auslöst. In der zweiten Applikation (zweiter schwarzer Pfeil) werden die Zellen mit Isoproterenol stimuliert. Dies ist ein Maß für die Zellzahl bzw. Zellvitalität in jedem Loch der Meßplatte. Die roten Pfeile zeigen schematisch die Signalamplituden, die zur Berechnung der Dosiswirkungskurven benutzt wurden.

2.8 Immunologische Arbeiten

2.8.1 Nachweis HSV-epitopmarkierter Rezeptoren in HEK293 Zellen

Zunächst wurden die Zellen in 24-Loch-Platten, wie in 2.4.5 beschrieben, auf mit 10 µg / ml Poly-D-Lysin beschichteten Glasplättchen ausgesät und nach 48 Stunden wie in 2.4.6 beschreiben, transfiziert. 24 -30 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen 5 Min. mit 0,5 ml einer 1:1 Aceton-Methanol-Lösung bei Raumtemperatur fixiert und 4 Min. mit 0,25 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Nach 3-maligem Waschen mit jeweils 0,5 ml PBS für je 5 Min. erfolgte eine 30 minütige Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation mit 0,5 ml 5 % hitzeinaktiviertem Ziegenserum (Biochrom) in PBS. Die Detektion des HSV-Epitops erfolgte durch Zugabe von 0,3 ml eines monoklonalen Maus-Anti-HSV-Antikörpers (Novagen) 1:10000 in PBS + 2% hitzeinaktiviertem Ziegenserum entweder eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Nach 3-maligem Waschen mit je 0,5 ml PBS für je 5 Min. erfolgte die Fluoreszenzmarkierung durch einen polyklonalen Ziegen Anti-Maus-Alexa-488-Antikörper (Molecular Probes) 1:1000 in PBS + 2% hitzeinaktiviertem Ziegenserum für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach 3-maligem Waschen mit je 0,5 ml PBS für je 5 Min. wurden die Gläschen mit Einbettmedium (Fluorescent Mounting Medium, DAKO) versehen und nach frühestens einer Stunde Aushärtezeit im Mikroskop analysiert.

2.8.2 Colokalisation von Rezeptor und Plasmamembran durch Fluoreszenzmarkierung

Um nachzuweisen, dass die Rezeptoren in der Plasmamembran lokalisiert sind, wurden Rezeptor und Plasmamembran mit unterschiedlichen Farbstoffen fluoreszenzmarkiert und Überlagerungsbilder erzeugt. Für die erfolgreiche Durchführung des Protokolls ist es wichtig, bis zur Fixierung der Zellen alle Inkubations- und Waschrinne auf Eis und mit gekühlten Lösungen durchzuführen. Dadurch wird verhindert, dass sich von Membranoberfläche Vesikel abschnüren und ins Zellinnere wandern können. Solche Internalisierungsprozesse können dazu führen, dass auch Strukturen im Cytosol durch das Concanavalin markiert werden. Die Zellen wurden zunächst 3 x mit PBS gewaschen, 10 Min. auf Eis inkubiert und dann eine Stunde in PBS + 20 µg/ml Concanavalin A-Biotin (Sigma) auf Eis inkubiert. In dieser Zeit bindet das zu den Lectinen gehörende Concanavalin A an glykosierte Proteine auf der Zelloberfläche. Nach 3-maligem Waschen mit je 0,5 ml PBS wurden die Zellen für 5 Min. mit 0,5 ml 1:1 Aceton-Methanol auf Eis fixiert und 4 Min. mit 0,25 % Triton-X-100 in PBS bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach 3-maligem Waschen mit 0,5 ml PBS für je 5 Min., erfolgte eine 30-minütige Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation mit 0,5 ml 5 % hitzeinaktiviertem Ziegenserum (Biochrom) in PBS. Die Detektion von biotinyliertem Concanavalin A erfolgte durch Zugabe von 0,3 ml eines Avidin-Texas-Red (Vektor) 1:200 in PBS + 2% zusammen mit der Detektion des HSV-Epitops des Rezeptors, wie in 2.6.1 beschrieben.

2.8.3 Konfokale Laserscan Mikroskopie.

Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit einem Leica TCS/SP2. Der Farbstoff Alexa 488 wurde bei 488 nm mit einem Argon Krypton Laser angeregt und bei 510-560 nm detektiert. Der Farbstoff Texas Red wurde bei 543 nm mit einem grünen Helium Neon Laser angeregt und bei 580-660 nm detektiert. Da Texas Red auch bei 488 nm noch schwach angeregt werden kann, wurde jeder Farbstoff einzeln angeregt und detektiert. Danach wurde zur Dokumentation des Kollokalisierungsgrades ein Überlagerungsbild erzeugt.

2.9 *in situ* Hybridisierung

2.9.1 Material

Für die *in situ* Hybridisierung wurde menschliches Zungenmaterial der Wallpapillen verwendet. Das Material stammt von Patienten mit Tumoren im Zungen- oder Mundhöhlenbereich. Es wurde nur Material verwendet, das von nicht chemotherapierten Patienten stammt, da die Chemotherapie zu einer drastischen Reduktion der Geschmacksknospen führen kann [Nelson, 1998]. Das Material stammt ausschließlich aus Nachsorgeuntersuchungen und enthält kein entartetes Gewebe. Direkt nach der Entnahme wurden die Gewebeproben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Die Gewinnung des Materials erfolgte durch Dr. Raguse am Virchow Klinikum Berlin.

2.9.2 Herstellung von Gewebeschnitten

Direkt vor der Verwendung wurde das Gewebe in das auf -21°C temperierte und gereinigte Microtom HM 505E (Microm) eingebracht und mit Einbettmedium (Tissue Tag, Jung) in geeigneter Orientierung auf dem Schneideblock befestigt. Der komplette Gewebeblock wurde dann in seriellen 15 µm Schnitten verarbeitet und auf Superfrost Plus Objektträgern (Menzel) durch kurzes antauen fixiert und dann bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.9.3 Herstellung der Sonde

Die komplette kodierende Region von hTAS2R16 wurde zunächst in das Plasmid pBlueskript KS (Stratagen) kloniert. Dieses Plasmid wurde dann als Matrize für eine PCR-Reaktion verwendet, in der die mit Hilfe eines T7 und T3 Oligonukleotids die komplette kodierende Region amplifiziert und dann mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) nach Anweisung des Herstellers aufgereinigt wurde. Mit jeweils 200 ng des aufgereinigten DNA-Fragments als Matrize wurde dann Dioxigenin markierte cRNA in T7 (kodierender Strang = Negativkontrolle) und T3 Richtung (nicht kodierender Strang = Probe) in *einer in vitro* Transkriptionsreaktion mit Hilfe des DIG RNA Labeling Kits (Roche) nach Anweisung des Herstellers produziert und durch Agarosegelelektrophorese auf Qualität und Menge kontrolliert. Danach wurde die cRNA als Sonde eingesetzt (Kapitel 2.8.4).

2.9.4 Durchführung

Um Kontaminationen mit Ribonukleasen (RNAsen) zu vermeiden wurden alle Lösungen mit DEPC-Wasser angesetzt und nach Möglichkeit hitzesterilisierte Gefäße verwendet. Kammern und andere Gefäße, die nicht hitzesterilisierbar waren, wurden mit 3 % H₂O₂ oder RNase Zap (Invitrogen) behandelt. Alle Chemikalien waren entweder RNase-frei oder vom Reinheitsgrad "für Molekularbiologie".

Objektträger mit den Gewebeschnitten (Kapitel 2.8.2) wurden zunächst in einer auf 4°C gekühlten 4% Paraformaldehyd in PBS 10 Min. fixiert. Nach zweimaligem Waschen (1 Min. in PBS) wurde durch Behandlung mit 0,2 M HCl, 10 Min. in Wasser alle im Gewebe vorhandenen alkalischen Phosphatasen inaktiviert, und dann das Gewebe durch zweiminütige Inkubation mit 1% Triton-X-100 in PBS permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen (1 Min. in PBS) wurden in einer Acetylierungsreaktion unspezifische RNA Bindungsstellen abgesättigt. Dazu werden in 150 ml Wasser 2 ml Triethanolamin und 262 µl rauchende Salzsäure gelöst. In dieser Lösung werden die Schnitte 5 Min. vorinkubiert. Anschließend werden 375 µl Essigsäureanhydrid unter leichtem Schütteln über einen Zeitraum von 10 Min. langsam zugegeben. Die so behandelten Objektträger werden dann umgedreht auf Färbebänken positioniert, mit der Vorhybridisierungslösung (5 x SSC, 5 x Denhardt's-Lösung, 250 µg/ml Hefe tRNA, 500 µg Herringssperma-DNA, 50 % Formamid, 0,1 % Tween 20) unterschichtet und in einer dicht verschlossenen Kammer inkubiert. Die Kammer enthielt Filterpapier das mit ca. 50 ml 2 x SSC + 50 % Formamid Lösung getränkt war, um ein Verdunsten von Vorhybridisierungs- oder Hybridisierungslösung zu verhindern. Nach 2 Stunden bei Raumtemperatur wurde die Vorhybridisierungslösung gegen Hybridisierungslösung (Vorhybridisierungslösung + 200 ng/ml cRNA Sonde, 10 Min. bei 85°C vorinkubiert) ersetzt und dann über Nacht bei 65°C im Hybridisierungsöfen (Hybaid) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger gewaschen, um nicht gebundene cRNA-Sonde zu entfernen: 2 Min., 5 x SSC, Raumtemperatur; 5 x SSC, 65°C, 30 Min.; zweimal 0,2 x SSC, 65°C, 30 Min.

2.9.5 Detektion

Der Nachweis der Sonden erfolgte durch eine so genannte TSA-Amplifikation. Der Vorteil dieses Verfahrens ist eine um bis zu einhundertfach höhere Sensitivität gegenüber einer konventionellen Detektion mit alkalischer-Phosphatase-F_{ab}-Fragmenten (Roche). Das Prinzip der Methode beruht auf einer mehrfachen Signalverstärkung. Der primäre Anti-Biotin-Antikörper wird zunächst mit einem sekundären biotinyliertem Antikörper detektiert. An diesen können dann mehrere Peroxidasekomplexe binden und lösliches biotinyliertes Tyramid in ein sehr reaktives Zwischenprodukt umwandeln. Dieses vernetzt sich sofort mit umliegenden Proteinen. Dadurch bildet sich um den Enzymkomplex ein Ring aus mit aus mit biotinyliertem Tyramid vernetzten Proteinen. Danach werden die Biotingruppen mit alkalischer Phosphatase gekoppelt und die eine Färbereaktion durchgeführt. Die Objektträger wurden zunächst 1 Stunde in 1% Blocking Reagenz in B1 (Boehringer) und danach mit Maus-Anti-Digoxigenin-Antikörper (Boehringer) 1:1000 in Blocking über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS für 1 Min. wurden die Schnitte 30 Min. in Tyramidblockierungslösung (NEN/ TSA Kit) inkubiert, erneut 2 mal mit

PBS für 1 Min. gewaschen und dann der primäre Mausantikörper durch einen biotinylierten Anti-Maus-Antikörper (Vektor) 1:200 in PBS + 2 % fötales Kälberserum + 0,1 % Triton X-100 für 60 Min. bei Raumtemperatur detektiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für 1 Min. wurden die Schnitte mit Meerrettich-Peroxidase-Avidin (NEN/ TSA Kit) 1:100 in PBS für 60 Min. inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für 5 Min. werden die Schnitte zuerst in Amplifizierungslösung (NEN/ TSA Kit) und dann mit biotinyliertem Tyramid (NEN/ TSA Kit) 1:100 für 15 Min. im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für 5 Min. erfolgt eine 60 minütige Inkubation mit alkalischer-Phosphatase-Avidin-D (Sigma) 1:1000 in PBS. Danach werden die Schnitte dreimal mit B1 gewaschen, 5 Min. und mit B3 inkubiert. Die Färbereaktion wird durch Zugabe von BCIP/NBT Lösung + 24 mg /ml Levamisol gestartet und die Reaktion nach 16 Stunden gestoppt. Die so behandelten Schnitte werden durch Einbettmedium (Flourescent Mounting Medium, DAKO) und Deckgläser geschützt und können im Mikroskop analysiert werden.

2.10 Ermittlung von Schwellwerten, Dosiswirkungskurven und Adaptation beim Menschen

2.10.1 Bestimmung menschlicher Geschmacksschwellwerte

Zur Bestimmung der menschlichen Schwellwerte der in dieser Arbeit untersuchten Bitterstoffe wurde der Dreieckstest benutzt. Bei diesem Test wurde jedem trainierten Probanden, in einem Sensoriklabor bei Raumtemperatur drei Becher mit Lösungen in willkürlicher Reihenfolge gereicht. Zwei der Becher enthalten Leitungswasser, einer dagegen eine geringe Konzentration des zu untersuchenden Bitterstoffs in Leitungswasser gelöst. Als Schwellwert wird die Konzentration bezeichnet, bei der es einer Versuchsperson in 67% aller Fälle gelingt, den Becher mit dem Bitterstoff zu identifizieren. Die in dieser Arbeit angegebenen Schwellwerte sind Mittelwerte der Messergebnisse von 15 Versuchspersonen an drei verschiedenen Tagen.

2.10.2 Bestimmung von Dosiswirkungskurven beim Menschen

Zur Bestimmung von Dosiswirkungskurven für Bitterstoffe beim Menschen wurde ein so genannter Ranking-Test benutzt. Bei diesem Test werden jedem trainierten Probanden vom jeweiligen Bitterstoff mehrere Becher mit unterschiedlich konzentrierten Lösungen in willkürlicher Reihenfolge gereicht. Zunächst musste der Proband die Becher in aufsteigender Konzentrationsreihenfolge ordnen und dann die Bitterintensität der einzelnen Lösungen auf einer 0 - 5 Skala beurteilen. Die in dieser Arbeit angegebenen Schwellwerte sind die Mittelwerte der Messergebnisse von 10 Versuchspersonen an drei verschiedenen Tagen. Die individuellen Schwankungen jedes Probanden zwischen den verschiedenen Versuchstagen lagen unter $\pm 0,5$ Einheiten.

2.10.3 Messung der Adaptation und Kreuzadaptation beim Menschen

Zur Bestimmung der Adaptation nahm jeder trainierten Proband nacheinander von den zu testenden Bitterstoffen jeweils 5 ml für 15 Sekunden in den Mund und bewertete danach dessen Bitterintensität auf

einer Skala von 0 - 5. Nach einer Pause von 30 Min. wurden zunächst 5 ml einer 0,0003 mM Denatoniumbenzoat-Lösung für 15 Sekunden in den Mund genommen und auf ihre Bitterintensität hin bewertet. Dann wurden 5 ml des Bitterstoffes, der auf Adaptation getestet werden sollte, in den Mund genommen und dessen Bitterintensität nach 15, 30, 60, 120 und 180 Sekunden bewertet. Danach wurden jeweils 5 ml der auf Kreuzadaptation zu testenden Bitterstoffe für 15 Sekunden in den Mund genommen und auf ihre Bitterintensität hin bewertet. Zum Schluss wurden 5 ml einer 0,0003 mM Denatoniumbenzoat-Lösung für 15 Sekunden in den Mund genommen und erneut auf ihre Bitterintensität hin bewertet. Nach einer erneuten Pause von 30 Minuten wurden die auf Adaptation und Kreuzadaptation zu testenden Bitterstoffe nochmals getestet und bewertet um die Reversibilität der beobachteten Adaptationsphänomene zu zeigen. Die in dieser Arbeit angegebenen Schwellwerte sind die Mittelwerte der Messergebnisse von 8 Versuchspersonen an drei verschiedenen Tagen. Die individuellen Schwankungen jedes Probanden zwischen den verschiedenen Versuchstagen lagen unter $\pm 0,5$ Einheiten.

2.11 Nomenklatur

In dieser Arbeit wurde für alle Bitterrezeptoren die TAS2R Nomenklatur verwendet. Diese ist die offizielle Nomenklatur der Genomprojekte von Mensch und Maus. Sie ersetzt die alte TRB Nomenklatur [Matsunami, 2000] bzw. T2R Nomenklatur [Adler, 2000], den Entdeckern der Bitterrezeptoren. Um eine eindeutige Identifizierung der in der Arbeit angesprochenen TAS2R-Gene zu erleichtern, werden alle in dieser Arbeit beschriebenen Gene zusammen mit ihren Datenbanknummern in Tabelle 2.4 aufgeführt.

Tabelle 2.4 TAS2R-Gene und Datenbanknummern

TAS2R Name	Synonyme	Datenbanknummer.
hTAS2R1	hT2R1, hTRB7	NM019599
hTAS2R3	hT2R3	NM016943
hTAS2R4	hT2R4	NM016944
hTAS2R5	hT2R5	NM018980
hTAS2R7	hT2R7, hTRB5	NM023919
hTAS2R8	hT2R8, hTRB5	NM023918
hTAS2R9	hT2R9, hTRB6	NM23917
hTAS2R10	hT2R10, hTRB2	NM23921
hTAS2R13	hT2R13, hTRB3	NM23920
hTAS2R14	hT2R14, hTRB1	NM23922
hTAS2R16	hT2R16	NM016945
hTAS2R38	hT2RP26	AF494321
hTAS2R39	hT2RP25	AF494230
hTAS2R40	hT2RP24	AF494229
hTAS2R41	hT2RP27	AF494232
hTAS2R42	hT2RP10, hTAS2R24	AX097739
hTAS2R43	hT2RP1	AF494237
hTAS2R44	hT2RP2	AF494228
hTAS2R45	hT2RP9	AF494226
hTAS2R46	hT2RP17	AF494227
hTAS2R47	hT2RP3	AF494233
hTAS2R48	hT2RP6	AF494234
hTAS2R49	hT2RP8	AF494236
hTAS2R50	hT2RP7	AF494235
mTAS2R2	mT2R2	AX097802
mTAS2R3	mT2R3	AX097804
mTAS2R4	mT2R4	AX097806
mTAS2R5	mT2R5	AX097808
mTAS2R6	mT2R6	AX097810
mTAS2R7	mT2R7	AX097812

mTAS2R8	mT2R8	AX097814
mTAS2R9	mT2R9	AX097816
mTAS2R13	mT2R13	AX097824
mTAS2R14	mT2R14	AX097826
mTAS2R15	mT2R15	AX097828
mTAS216	mT2R16	AX097830
mTAS2R17	mT2R17	AX097832
mTAS2R18	mT2R18	AX097834
mTAS2R19	mT2R19	AX097836
mTAS2R20	mT2R20	AX097838
mTAS2R21	mT2R21	AX097840
mTAS2R22	mT2R22	AX097842
mTAS2R23	mT2R23	AX097844
mTAS2R24	mT2R24	AX097846
mTAS2R25	mT2R25	AX097848
mTAS2R26	mT2R26	AX097850
mTAS2R29	mT2R29	AX097855
mTAS2R30	mT2R30	AX097857
mTAS2R31	mT2R31	AX097859
rTAS2R1	rT2R1	AX097772
rTAS2R2	rT2R2	AX097774
rTAS2R3	rT2R3	AX097776
rTAS2R4	rT2R4	AX097778
rTAS2R5	rT2R5	AX097780
rTAS2R6	rT2R6	AX097782
rTAS2R7	rT2R7	AX097784
rTAS2R8	rT2R8	AX097786
rTAS2R9	rT2R9	AX097788
rTAS2R12	rT2R12	AX097794
rTAS2R13	rT2R13	AX097796

3. Ergebnisse

3.1. Identifizierung und chromosomale Lokalisierung der humanen TAS2R-Familie

Nach der Entdeckung der TAS2R-Rezeptoren [Adler, 2000; Matsunami, 2000] wurde deren Anzahl beim Menschen zunächst auf 80 - 120 Mitglieder geschätzt. Es wird vermutet, dass es sich bei einem Drittel dieser Gene um Pseudogene handelt, da deren Leserahmen vorzeitig durch Stopkodons unterbrochen wird [Adler, 2000]. Eine in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Analyse, der zu 97,8% fertig gestellten öffentlichen humanen Genomdatenbank, ergab jedoch nur eine Zahl von 39 TAS2R-Genen. Von diesen umfassen nur 24 eine intakte kodierende Region mit sieben Transmembrandomänen. Bei den restlichen 15 Genen handelt es sich um Pseudogene, da deren Leserahmen durch Stopkodons unterbrochen wird. 15 der TAS2R-Gene und 13 Pseudogene liegen in einem Gencluster auf Chromosom 12 (Abb. 3.1). Auf Chromosom 7 sind acht TAS2R-Gene und zwei Pseudogene lokalisiert (Abb. 3.1). Auf Chromosom 5 befindet sich nur ein einziges TAS2R-Gen (Abb. 3.1).

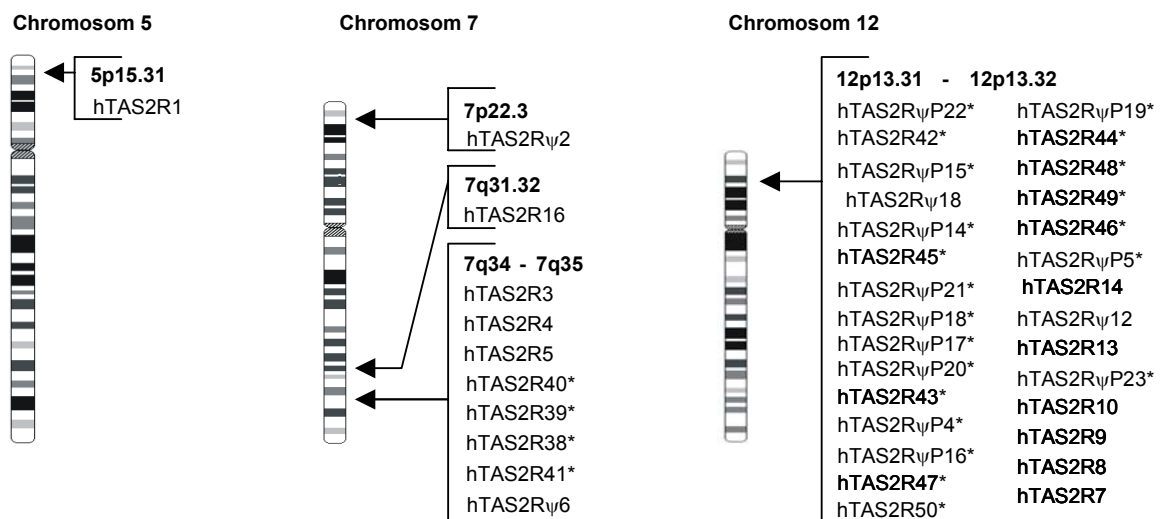


Abb. 3.1 Lokalisation der humanen TAS2R-Gene und Pseudogene auf den Chromosomen

Chromosomale Lokalisation der humanen TAS2R-Gene und Pseudogene (ψ) in der Reihenfolge ihrer Anordnung auf den jeweiligen Chromosomen. Mit * gekennzeichnete Gene und Pseudogene wurden in dieser Arbeit neu identifiziert.

Ein weiteres Merkmal der Rezeptorfamilie ist ihre große Sequenzdivergenz (Tab. 3.1). So zeigen die Mitglieder der Rezeptorfamilie nur eine durchschnittliche Aminosäureidentität von 34%. Die Aminosäuresequenzen von hTAS2R10 und hTAS2R16, den zwei divergentesten Mitgliedern der Rezeptorfamilie, sind nur zu 17% identisch. Im Gegensatz dazu zeigt eine aus den Mitgliedern hTAS2R43 - 50, bestehende Rezeptorfamilie eine ungewöhnlich hohe Sequenzverwandtschaft. hTAS2R43 und hTAS2R44, die beiden Rezeptoren mit der höchsten Sequenzverwandtschaft in dieser Subfamilie sind zu 89% identisch. TAS2R48 und hTAS2R43 sind die beiden am wenigsten homologen Rezeptoren dieser

Subfamilie. Sie zeigen eine Aminosäureidentität von 66%. Dagegen sind hTAS2R40 und hTAS2R39 die beiden nächst verwandten Mitglieder, aller anderen TAS2R-Rezeptoren nur zu 56% identisch.

Die chromosomale Lage der Rezeptorgene ist auch ein Spiegel ihrer Sequenzverwandtschaft (Abb. 3.2 + Tab. 3.1). So besitzen die Gene von Chromosom 12 untereinander eine durchschnittliche Sequenzidentität von 46%. Zu den Genen von Chromosom 7 zeigen sie dagegen nur eine durchschnittliche Sequenzidentität von 26%. Die Gene von Chromosom 7 zeigen sowohl untereinander, als auch zu den Genen von Chromosom 12 nur eine Sequenzidentität von 26%. hTAS2R1, das einzige Rezeptorgen auf Chromosom 5 zeigt ebenfalls eine durchschnittliche Sequenzidentität von 26 % zu allen Genen von Chromosom 12 und 7.

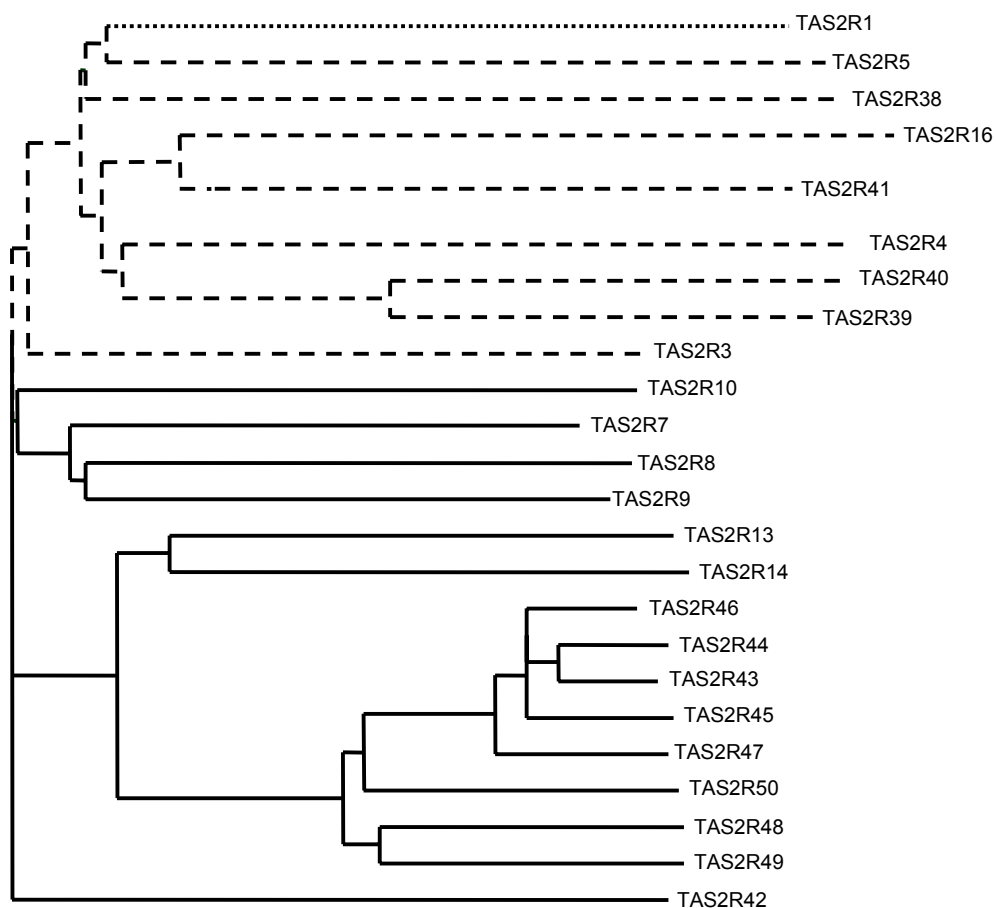


Abb. 3.2 Dendrogramm aller Rezeptoren der TAS2R-Familie des Menschen

Das Dendrogramm zeigt die Verwandtschaft der Aminosäuresequenzen der menschlichen TAS2R-Rezeptor Genfamilie (ohne Pseudogene). Rezeptoren auf Chromosom 12; — — — — — Rezeptoren auf Chromosom 7; — — — — — Rezeptor auf Chromosom 5 ·····.

Tabelle 3.1 Vergleich der Sequenzidentität von TAS2R-Rezeptoren

Rez.	1	5	38	16	41	4	40	39	3	10	7	8	9	13	14	46	44	43	45	47	50	48	49	42
1	100	27	25	23	28	22	27	26	32	26	28	28	29	26	26	26	26	27	24	27	24	27	26	26
5	27	100	25	21	23	23	24	25	25	27	28	24	28	29	24	27	26	26	25	25	26	24	27	23
38	25	25	100	18	24	23	23	22	29	25	28	24	25	25	24	25	25	26	25	25	26	23	24	24
16	23	21	18	100	33	19	24	23	23	17	22	23	24	23	20	21	18	20	19	20	21	21	20	21
4	22	23	23	19	28	100	26	29	28	25	30	25	28	22	22	24	25	24	25	23	26	23	25	23
40	27	24	23	24	26	26	100	56	26	24	29	29	30	25	24	23	23	23	20	23	22	22	24	23
39	26	25	22	23	29	29	56	100	26	27	28	27	29	26	25	24	24	24	24	24	23	23	23	26
41	28	23	24	33	100	28	26	29	31	24	30	28	30	28	24	29	26	29	28	27	29	24	26	28
3	32	25	29	23	31	28	26	26	100	37	40	40	37	32	30	32	32	32	31	31	31	30	31	33
10	26	27	25	17	24	25	24	27	36	100	39	36	39	32	34	33	34	33	32	32	31	33	31	35
7	28	28	28	22	30	30	29	28	40	39	100	46	47	39	35	36	35	36	35	34	34	35	36	39
8	28	24	24	23	28	25	29	27	40	36	46	100	45	31	31	35	30	31	32	32	33	36	32	34
9	29	28	25	24	30	28	30	29	37	39	47	45	100	36	30	37	37	35	34	35	34	36	36	34
13	26	29	25	23	28	22	25	26	32	32	39	31	36	100	47	43	42	42	41	42	42	41	40	32
14	26	24	24	20	24	22	24	25	30	34	35	31	30	47	100	42	42	42	41	41	41	42	39	31
46	26	27	25	21	29	24	23	24	32	33	36	35	37	43	42	100	85	89	86	86	71	70	70	33
44	26	26	25	18	26	25	23	24	32	34	35	30	37	42	42	85	100	89	85	80	69	68	66	32
43	27	26	26	20	29	24	23	24	32	33	36	31	35	42	42	89	89	100	86	81	68	66	67	32
45	24	25	25	19	28	25	20	24	31	32	35	32	34	41	41	86	85	86	100	81	69	66	68	33
47	27	25	25	20	27	23	23	24	31	32	34	32	35	42	41	86	80	81	82	100	69	68	68	31
50	24	26	26	21	29	26	22	23	31	31	34	33	34	42	41	71	69	68	69	69	100	65	64	33
48	27	24	23	21	24	23	22	23	30	33	35	36	36	41	42	70	68	66	66	68	65	100	70	31
49	26	27	24	20	26	25	24	23	31	31	36	32	36	40	39	70	66	67	68	68	64	70	100	31
42	26	23	24	21	28	23	23	26	33	35	39	34	34	32	31	33	32	32	33	31	33	31	31	100

Die Nummern der einzelnen TAS2R-Rezeptoren sind fett gedruckt. Die Angaben geben die prozentuale Aminosäureidentität wieder.

Interessant ist auch ein Vergleich der 24 menschlichen TAS2R-Sequenzen mit den bisher identifizierten Genen von Maus und Ratte (Abb. 3.3). Die TAS2R-Rezeptoren beider Spezies zeigen ebenfalls eine geringe Sequenzverwandtschaft. So sind mTAS2R26 und hTAS2R41, die zwischen den beiden Spezies die höchste Sequenzverwandtschaft aufweisen, nur zu 69% identisch. Die zwischen Maus und Mensch divergentesten Rezeptoren hTAS2R1 und mTAS2R22 weisen nur eine Identität von 23% auf. Meist sind die Rezeptoren so divergent, dass sie bei der jeweils anderen Spezies keinem einzelnen Rezeptor sondern nur noch einer Gruppe von Rezeptoren zugeordnet werden können. So zeigt z. B. die ganze Gruppe der menschlichen Rezeptoren hTAS2R43 - 50 Sequenzhomologie zum Maus-Rezeptor mTAS2R20, während die Gruppe der Maus-Rezeptoren mTAS2R4 - 7 mit dem menschlichen Rezeptor hTAS2R10 entfernt sequenzverwandt ist (Abb. 3.3). Im Gegensatz dazu sind alle bisher bekannten TAS2R-Rezeptorgene der Ratte zu 80 - 90% mit entsprechenden Rezeptoren der Maus verwandt (Abb. 3.3). Jedem Rezeptor der Ratte kann ein eindeutig sequenzverwandter Rezeptor der Maus zugeordnet werden. Die hohe Divergenz der Rezeptoren von Maus und Mensch lässt vermuten, dass diese Rezeptoren unterschiedliche funktionelle Eigenschaften besitzen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die Rezeptoren funktionell exprimiert.

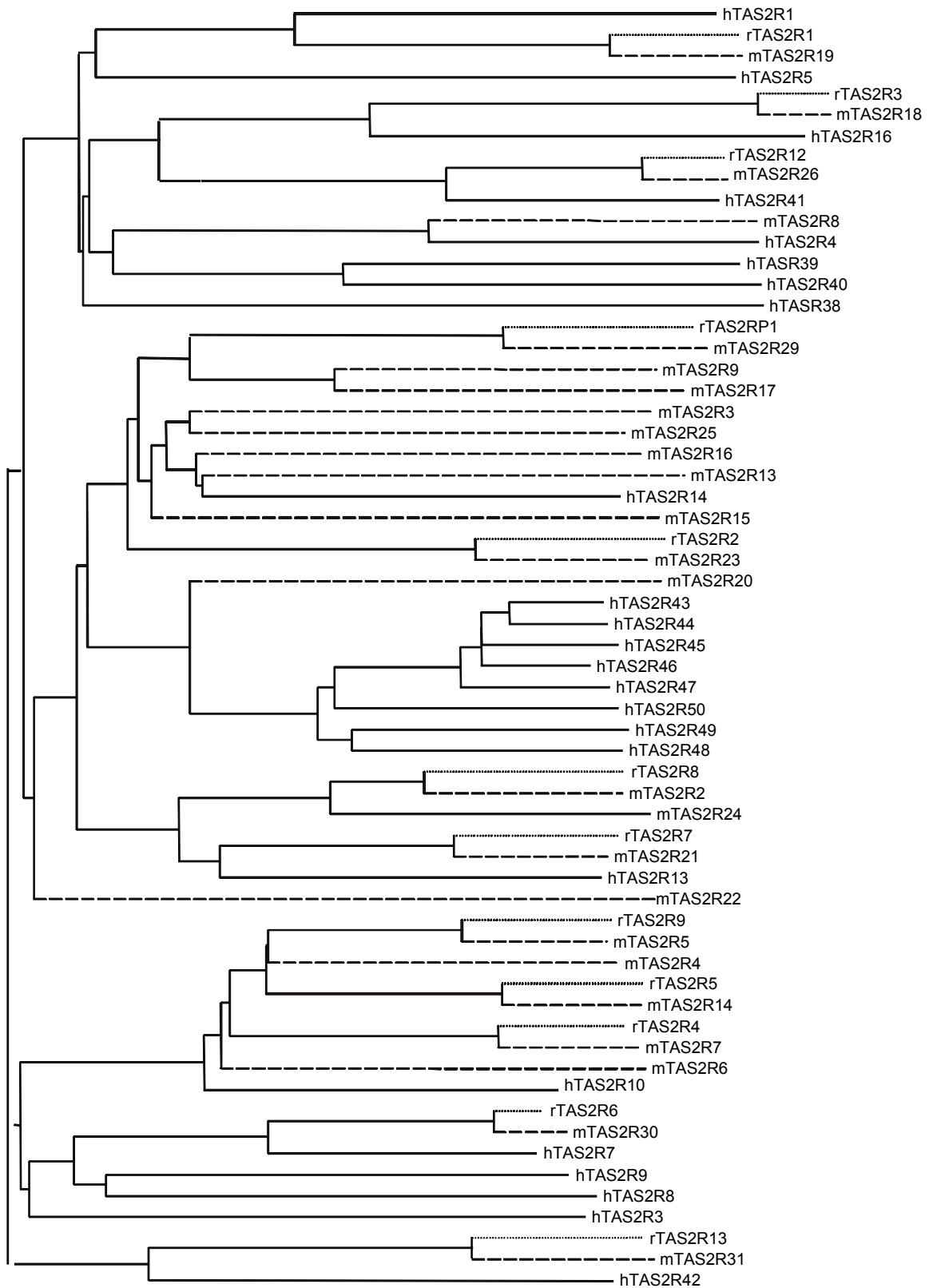


Abb. 3.3 Dendrogramm der bekannten Mensch-, Maus- und Ratten-TAS2R-Rezeptoren

Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen von Mensch- und Maus-Rezeptoren zeigt sich einen geringer Konservierungsgrad. Zwischen Ratte und Maus ist der Konservierungsgrad dagegen relativ hoch. Schwarze Linien: menschliche Rezeptoren, gestrichelte Linien: Maus-Rezeptoren, gepunktete Linien Ratten-Rezeptoren.

3.2 Funktionellen Expression von TAS2R-Rezeptoren

3.2.1 Entwicklung eines Epitops für den verbesserten Membranexport

Ein großes Problem der heterologen Expression von Geruchs- und Geschmacksrezeptoren ist es, einen ausreichenden Transport der Rezeptoren an die Zelloberfläche zu erreichen. Durch Fusion der Rezeptoren mit dem N-Terminus des Rhodopsin- oder Serotoninrezeptors kann eine Verbesserung des Transports zur Plasmamembran erreicht werden [Chandrashekar, 2000; Krautwurst, 1998; Wellerdieck, 1997]. Auch bei der ersten erfolgreichen funktionellen Expression der TAS2R-Rezeptoren wurde ein Epitop auf Basis des Rhodopsin-Rezeptors (RHO-Epitop) verwendet [Chandrashekar, 2000].

Deshalb wurden auch in dieser Arbeit die TAS2R-Rezeptoren mit einem N-terminalen Epitop fusioniert. Es handelt sich um die ersten 45 Aminosäuren des Somatostatin-Rezeptors 3 (SST-Epitop). Dieses Epitop scheint zur Verbesserung der Membrantransports besonders geeignet, da vorherige Arbeiten zeigten, dass die ersten 45 N-terminalen Aminosäuren des Somatostatin-Rezeptors 3 für dessen gute Lokalisation an der Plasmamembran verantwortlich sind [Ammon, 2002]. Zusätzlich sind die TAS2R-Rezeptoren mit dem Herpes Simplex Virus Glycoprotein D Epitop (HSV-Epitop) fusioniert, um sie immunologisch in den Zellen nachweisen zu können (Abb. 3.4). Diese Markierung des Rezeptors wurde C-terminal vorgenommen, da vermutet wurde, dass ein N-terminales Anfügen des HSV Epitops den Transport des Rezeptors in die Cytoplasmamembran stören könnte. Damit der Antikörper zum HSV-Epitop vordringen kann, müssen die Zellen permeabilisiert werden. Dadurch werden jedoch nicht nur plasmamembranständige Rezeptoren, sondern auch alle noch im Zellinneren verbliebenen Rezeptoren detektiert. Um eine sichere Aussage über die Membranständigkeit des Rezeptors machen zu können, wurden Kolkolisierungsexperimenten durchgeführt. Dazu wird zunächst die Cytoplasmamembran der noch nicht permeabilisierten Zellen detektiert. Dann werden die Zellen permeabilisiert, das Rezeptorprotein mit einem epitopspezifischen primären Antikörper detektiert und dann fluoreszenzmarkiert. Der Nachweis des Rezeptors in der Plasmamembran erfolgt im Konfokalen Mikroskop durch Erstellung eines Überlagerungsbildes. Ist der Rezeptor membranständig, so kommt es im Überlagerungsbild zu einer Mischung des Rezeptorsignals (grün) mit dem Membransignal (rot). Im Falle einer Kolkolisierung von Membran und Rezeptor erhält man ein gelbes Überlagerungssignal.

Um den Einfluss des N-terminalen Epitops auf den Membrantransport zu studieren, wurde ein Rezeptor mTAS2R5 als Modell ausgewählt, da für diesen Rezeptor unter Verwendung eines N-terminalen Rhodopsin-Epitop die Lokalisation in der Plasmamembran schon nachgewiesen worden war [Chandrashekar, 2000]. Die Ergebnisse der immunocytochemischen Untersuchungen zeigen klar, dass für mTAS2R5 ohne N-terminalen Epitop keine Membranständigkeit nachweisbar ist (Abb. 3.5). Der Rezeptor wird zwar gebildet, scheint aber im Zellinneren zu verbleiben. Dagegen ist sowohl bei Fusion des Rezeptors mit einem N-terminalen RHO- als auch mit einem SST-Epitop ein Teil des Rezeptors in der Cytoplasmamembran deutlich nachweisbar (Abb. 3.5). Daher ist zumindest für mTAS2R5 das Anfügen eines N-terminalen Exportepitops eine wichtige Voraussetzung, um größere Mengen des Rezeptors an die Zelloberfläche zu transportieren.

Eine Quantifizierung der Oberflächenexpression des Rezeptors anhand der Fluoreszenzintensität ist in Kolokalisierungsexperimenten kaum möglich, da die experimentell bedingte Abweichungen sehr groß sein können. Ursachen sind Variationen der Transfektions- oder der Immunfluoreszenz sowie Variationen der Aufnahmeintensität zwischen verschiedenen Experimenten. Daher ist ein Vergleich des Membrantransport-Wirkungsgrades von SST- bzw. RHO-Epitop fusioniertem mTAS2R5 nicht möglich.

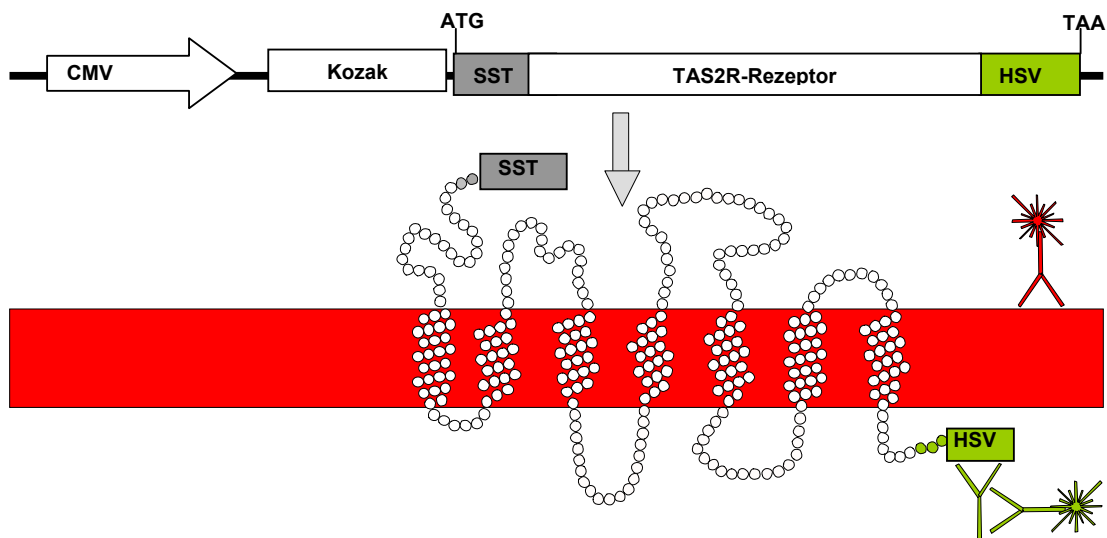


Abb. 3.4 Schematische Darstellung der Plasmid Expressionskassette und des entstehenden Fusionsproteins

CMV: CMV Promotor zur Genexpression in Säugetierzellen; Kozak: Kozak-Sequenz zur optimalen Genexpression; ATG: Startcodon; SST: Epitop aus den ersten 45 Aminosäuren des Somatostatin-Rezeptors Subtyp 3 zur Vereinfachung der Membranintegration der Rezeptoren; TAS2R-Rezeptor: komplette kodierende Region der TAS2-Rezeptoren ohne Stopkodon; HSV: Herpes Simplex Virus Glycoprotein D Epitop als Epitop für den immunologischen Nachweis des Fusionsproteins; TAA: Stopkodon.

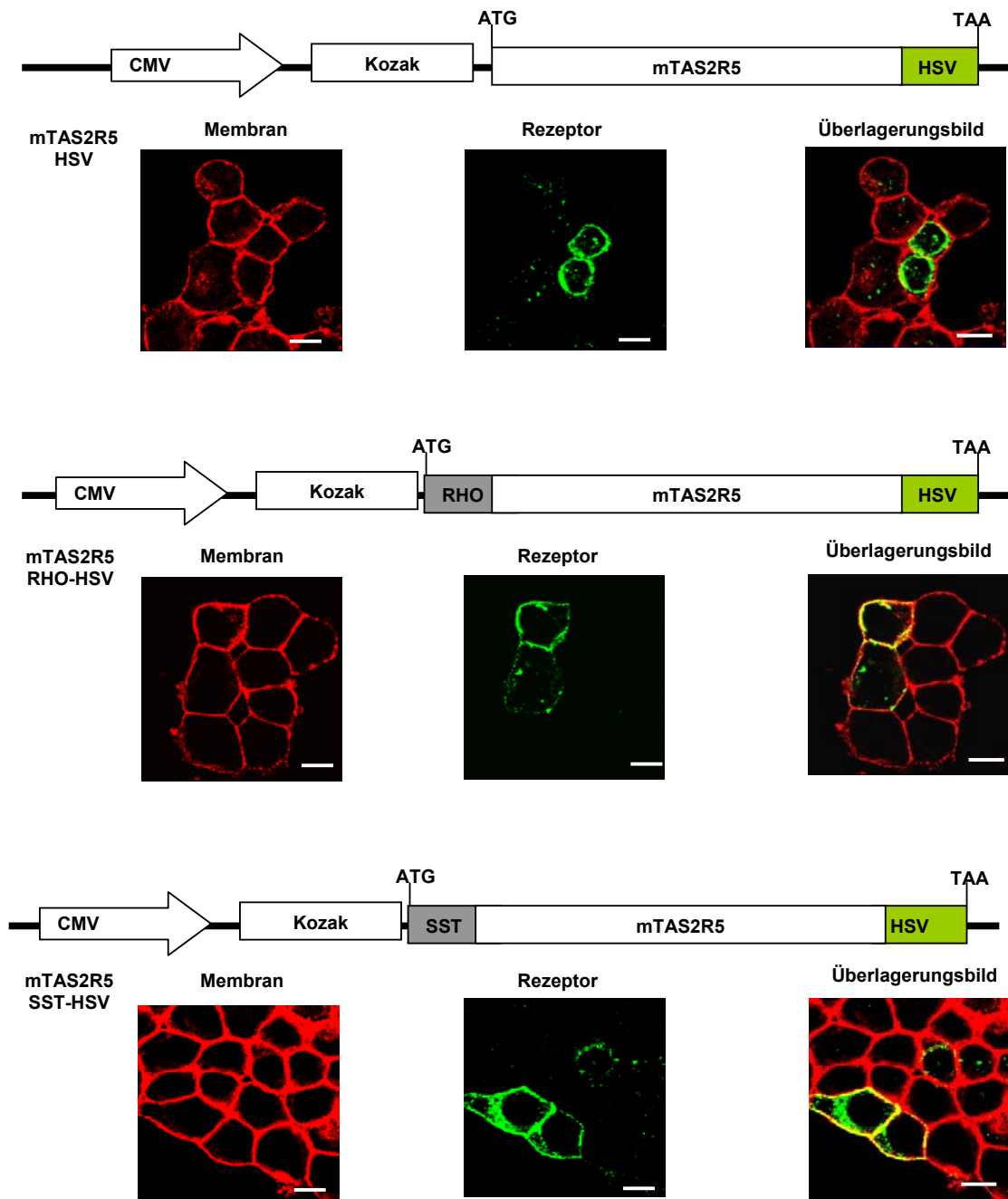


Abb. 3.5 Nachweis der Rezeptorexpression und Untersuchung der Kolkalisierung von Rezeptor und Cytoplasmamembran am Beispiel von mTAS2R5 ohne Epitop und mit Rhodopsin (RHO)- bzw. Somatostatin (SST)-Epitop

Schematische Darstellung der zur Expression benutzten Rezeptorkonstrukte: CMV: CMV Promotor; Kozak: Kozak-Sequenz; ATG: Startkodon; SST: SST-Epitop; RHO: RHO-Epitop; HSV: HSV-Epitop; TAA: Stopkodon.

Konfokale Aufnahmen von mTAS2R5 mit und ohne N-terminales Transport-Epitop 24 Stunden nach der transienten Transfektion in HEK293 Zellen. Weißer Balken 10 μ m. Membran (rot): Cytoplasmamembran nach Concanavalin A-Biotin / Avidin-D-Texas-Red Detektion; Rezeptor (grün): mTAS2R5 nach Maus-Anti-HSV / Anti-Maus-Alexa-488 Detektion; Überlagerungsbild: Überlagerungsaufnahme von Membran und Rezeptor. Eine Gelbfärbung zeigt die Kolkalisierung von Membran und Rezeptor.

3.2.2 Funktionelle Expression von mTAS2R5

Für einige TAS2R-Rezeptoren war es zuvor durch Calcium-Imaging schon gelungen, eine Aktivierung durch Bitterstoffe in HEK293 Zellen zu detektieren [Chandrashekar, 2000]. Daher wurden die Rezeptoren, auch in dieser Arbeit, in HEK293 Zellen exprimiert und dann versucht ihre Aktivierung nach Ligandenstimulation durch Calcium-Imaging nachzuweisen.

Die Detektion der Rezeptoraktivierung im Calcium-Imaging-System erfolgt, indem die Rezeptoren über das G-Protein die Phospholipase C (PLC) aktivieren (Abb. 3.6). Dies führt zur Produktion von Inositoltrisphosphat (IP_3). Durch den erhöhten intrazellulären IP_3 Spiegel werden Ca^{2+} -Kanäle in Ca^{2+} -Speichern des Endoplasmatischen Reticulums geöffnet. Der dadurch verursachte Anstieg des cytoplasmatischen Ca^{2+} -Spiegels kann durch Ca^{2+} -bindende Fluoreszenzfarbstoffe detektiert werden. Ein Nachteil dieser Methode ist es, dass nur die Aktivierung von Rezeptoren nachgewiesen werden kann, die IP_3 als „Botenstoff“ verwenden. Um diese Limitation zu umgehen, wurden die Rezeptoren in Zellen transfiziert, die die G-Protein Alpha Untereinheit G15 ($G_{\alpha 15}$) stabil exprimieren. $G_{\alpha 15}$ ist dafür bekannt, mit vielen Rezeptoren zu interagieren, die normalerweise G-Proteine vom $G_{\alpha s}$ oder $G_{\alpha i}$ Typ aktivieren und gilt daher als ein "universales" G-Protein [Offermanns, 2001, Offermanns, 1995]. Die Aktivierung von $G_{\alpha 15}$ führt über die PLC zur Produktion von IP_3 .

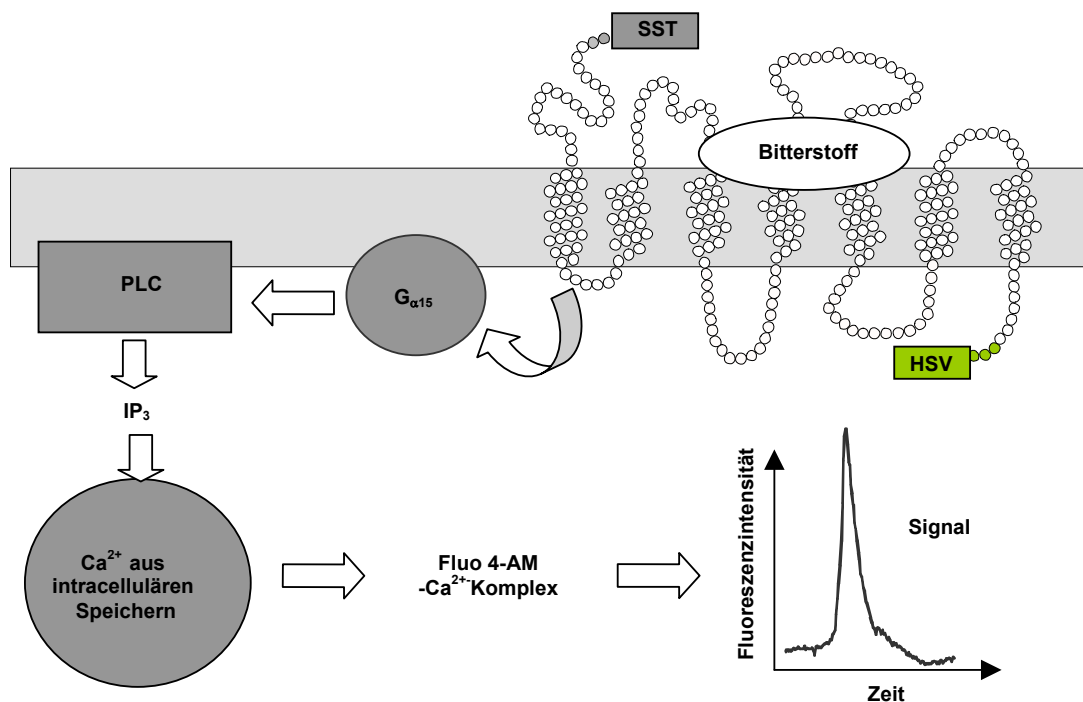


Abb. 3.6 Schematische Darstellung des Detektionssystems

SST: Epitop aus den ersten 45 Aminosäuren des Somatostatinrezeptors Subtyp 3 HSV: Herpes Simplex Virus Glycoprotein D Epitop; $G_{\alpha 15}$: G-Protein Alpha Untereinheit $G_{\alpha 15}$; PLC: Phospholipase C; IP_3 : Inositoltrisphosphat. Fluo-4-AM: benutzter Fluoreszenzfarbstoff.

Auch zur Etablierung des Meßsystems wurde der Rezeptor mTAS2R5 ausgewählt. Für diesen Rezeptor wurde schon gezeigt, dass er in HEK293/G15 Zellen exprimiert werden kann. Außerdem ist bekannt, dass Cycloheximid diesen Rezeptor aktiviert [Chandrashekar, 2000].

Die Analyse der Daten des humanen Genomprojektes hat eine von 24 TAS2R-Rezeptoren ergeben. Da tausende verschiedener Bitterstoffe existieren ergibt sich eine sehr hohe Kombination möglicher Rezeptor/Bitterstoff Paare. Deshalb schien es ratsam, ein Verfahren zu etablieren, das einen hohen Messdurchsatz erlaubt. Ein solches Messsystem ist Calcium-Imaging auf Basis eines Fluoreszenzplatten-Lese-Gerätes (Fluorescence Imaging Plate Reader, FLIPR). Mit diesem Gerät können in einer Messplatte bis zu 96 verschiedenen Rezeptor-Liganden-Kombinationen in einem einzigen Experiment von ca. 15 Minuten Dauer getestet werden. Ein weiterer Vorteil dieses Systems ist es, dass die Signale einer ganzen Zellpopulation gemessen werden. Dadurch werden Variationen der Signalstärke auf Einzelzellebene ausgeglichen, die Analyse vereinfacht, und statistisch besser gesicherte Messwerte erzeugt.

Mit Hilfe einer HEK293 Zelllinie, die die G-Protein Untereinheit $G_{\alpha 15}$ stabil exprimiert, konnten im FLIPR nach Stimulation mit Cycloheximid Signale aufgezeichnet werden. Das Signal ist dosisabhängig und sättigbar (Abb. 3.7). Es wurde nur in mTAS2R5 transfizierten Zellen beobachtet. Die Kontrollen ohne transfizierten Rezeptor zeigten bei keiner Konzentration ein Signal. Anhand der Messdaten konnte eine erste Dosiswirkungskurve für die mTAS2R5 berechnet werden (Abb. 3.7). Die ermittelten halbmaximale Aktivierung des Rezeptors (EC_{50}) von $0,4 \mu\text{M}$ entspricht dabei sehr gut dem schon publizierten EC_{50} -Wert von ca. $0,3 \mu\text{M}$ für diesen Rezeptor [Chandrashekar, 2000].

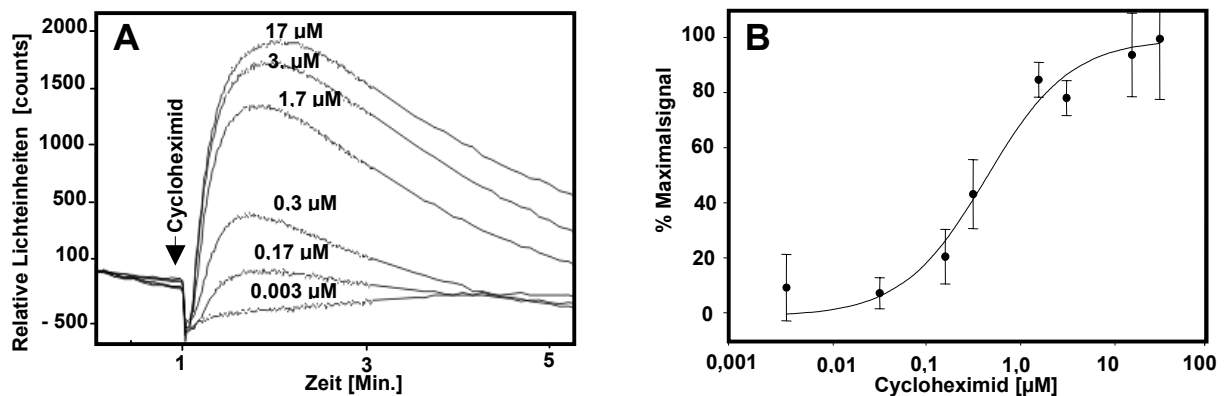


Abb. 3.7 Dosis-Wirkungskurve von mTAS2R5 bei Stimulation mit verschiedenen Cycloheximidkonzentrationen

A: FLIPR Spuren von mit mTAS2R5-DNA transfizierten HEK293- $G_{\alpha 15}$ Zellen nach Applikation unterschiedlichen Cycloheximidkonzentrationen. Die einzelnen Kurven sind Mittelwerte von je 4 Messlöchern, in denen dieselben Cycloheximidkonzentration getestet wurde. B: Aus den Messdaten errechnete Dosis-Wirkungskurve. Bei der Analyse der Messdaten wurden Schwankungen der Zellzahlen durch Normalisierung auf das Isoproterenolsignal (Kapitel 2.7) berücksichtigt. Die Angaben beziehen sich prozentual auf das in diesem Versuch gemessene Maximalsignal und sind um die Basislinie korrigiert.

3.2.3 Vergleich des Rezeptor mTAS2R5 mit verschiedenen N-terminalen Epitops

Veränderungen der Rezeptorstruktur können zu einer Veränderung der Rezeptoraktivität führen. So könnte das Anfügen eines N-terminalen Membrantransport-Epitops die Ligandenbindung beeinflussen. Deshalb ist es wichtig, zu untersuchen, ob das N-terminale Epitop einen Einfluss auf die Signalantwort besitzt. Um dieser Frage nachzugehen, wurden mTAS2R5-Varianten mit verschiedenen N-Termini funktionell untersucht. Sowohl der Rezeptor mit SST-Epitop, als auch der Rezeptor mit RHO-Epitop reagieren im gleichen Konzentrationsspektrum auf Cycloheximid (Abb.3.8A). Die benutzten Epitope sind in ihrer Länge, als auch in ihrer Aminosäuresequenz sehr unterschiedlich (Sequenz RHO-Epitop: MNGTEGPNFYVPFSNKTGVV; Sequenz SST-Epitop: MAAVTYPSSVPTTLDPGNASSAWPLDTS LGNAS AGTSLAGLAVSG). Auch die errechneten Dosiswirkungskurven beider Rezeptorvarianten sind sehr ähnlich (Abb. 3.8B). Der EC_{50} -Wert für mTAS2R5 mit SST-Epitop ist $0,1 \pm 0,08 \mu\text{M}$. Der EC_{50} -Wert von mTAS2R5 mit RHO-Epitop ist $0,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$. Der einzige Unterschied zwischen den Rezeptorvarianten liegt in der Größe der Signalamplituden. Für den Rezeptor mit SST-Epitop ist sie um ca. 30% größer (3.8A).

Auch bei Expression des Rezeptors, ohne N-terminales Epitop, sind kleine Signale zu detektieren (Abb. 3.8A). Im Vergleich zu Rezeptoren mit einem N-terminalen Transport-Epitop zeigen sie nur eine Signalamplitude 3 - 5 % (Abb. 3.8A). Da die Signale des Rezeptors ohne N-terminales Epitop selbst bei maximaler Stimulation nahe des Detektionslimits liegen, kann eine schwache Aktivierung des Rezeptors bei geringen Ligandenkonzentrationen nicht gemessen werden. Deshalb ist für mTAS2R5 ohne N-terminales Epitop die Berechnung einer Dosiswirkungskurve nicht möglich. Soweit beobachtbar spricht der Rezeptor auf die gleichen Cycloheximidkonzentrationen an, wie die modifizierten Rezeptoren und erreicht auch bei den gleichen Konzentrationen sein Maximalsignal.

Um Schwankungen der Transfektionseffizienz als Ursache für beobachtete Unterschiede in den Signalamplituden auszuschließen, wurden parallel zur Transfektion der Zellen in den FLIPR Platten, weitere Zellen transfiziert. Diese erhielten ein 1:1 Gemisch aus Rezeptor kodierendem Plasmid und einem Plasmid, das für Enhanced Green Fluorescence Protein (EGFP) kodiert. 24 Stunden nach der Transfektion wurde die Gesamtzahl der Zellen sowie der Anteil an EGFP positiven Zellen bestimmt. Die, als Quotient beider Werte, ermittelte Transfektionseffizienz für die verschiedenen Rezeptorplasmide lag bei 25 - 40% (Tabelle 3.2). Zur Bestimmung der Expressionseffizienz wurde in einem weiteren Ansatz die Zahl der mTAS2R5 exprimierenden Zellen immunologisch ermittelt. Je nach Konstrukt lag die Expression bei 0,8 - 1,2% (Tabelle 3.2). Die bei Transfektions- und Expressionsraten beobachteten Schwankungen betrug bis zu 45%. Die maximal möglichen Schwankungen der Transfektionseffizienz ist groß genug, um den Unterschied in der Signalstärke von mTAS2R5 mit RHO- und SST-Epitop erklären zu können. Da die Effektivität des SST-Epitops gegenüber der des RHO-Epitops keinesfalls als schlechter ist, wurde das SST-Epitop in allen weiteren Arbeiten als verwendet.

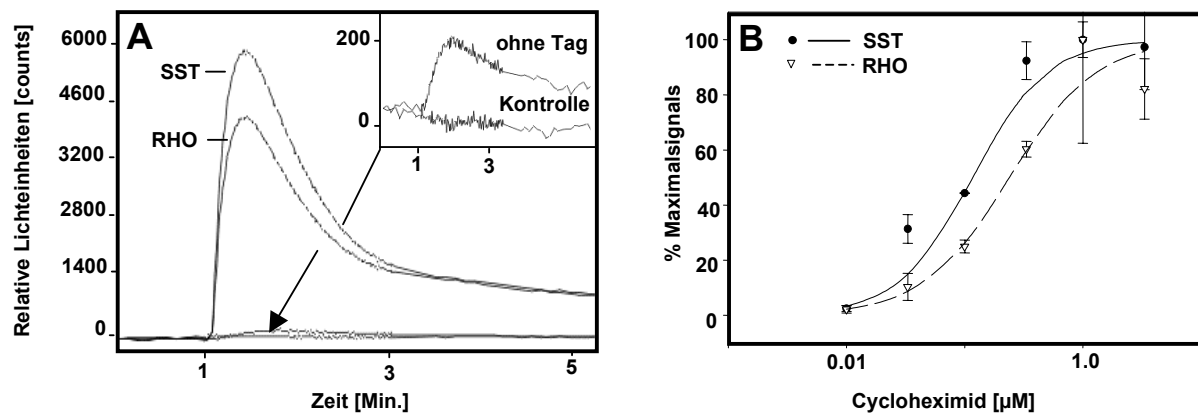


Abb. 3.8 Signale und Dosiswirkungskurven von mTAS2R5 mit verschiedenen N-terminalen Epitopen

A: Signale der mit verschiedenen mTAS2R5 Varianten transfizierten HEK293-G_{α15} Zellen nach Applikation von 10 µM Cycloheximid. SST-Epitop: mTAS2R5 mit N-terminalem SST-Epitop; RHO-Epitop: mTAS2R5 mit N-terminalem RHO-Epitop. Einschub: vergrößerte Darstellung des Signals von mTAS2R5 ohne N-terminales Epitop und der nur mit Kontrollplasmid transfizierten Negativkontrolle. B: Dosiswirkungskurven von mTAS2R5 mit N-terminalem SST-Epitop und mTAS2R5 mit N-terminalem RHO-Epitop. Die Messwerte beziehen sich auf das gemessene Maximalsignal. Sie sind um die Basislinie korrigiert und auf das Signal des β-adrenergen Rezeptors nach Stimulation mit Isoproterenol normalisiert.

Tabelle 3.2 Transfektions- und Expressionseffizienz der mTAS2R5 Varianten

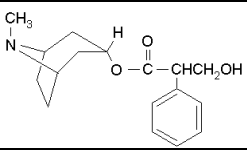
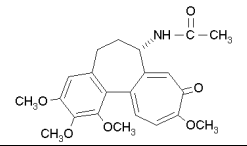
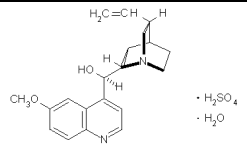
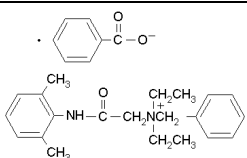
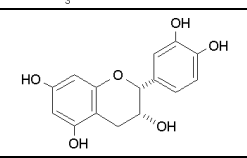
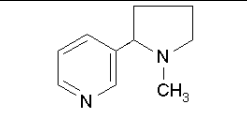
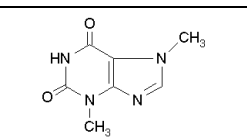
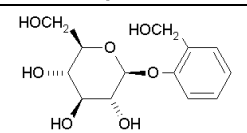
Plasmid	Zellen gesamt	EGFP Expression	EGFP exprimierende Zellen [%]	Zellen gesamt	mTAS2R5 Expression	mTAS2R5 exprimierende Zellen [%]
Kontrolle	770 ± 76	213 ± 36	28	689 ± 41	--	----
mTAS2R5 SST	696 ± 37	197 ± 15	28	744 ± 108	9 ± 1	1,2
mTAS2R5	715 ± 71	291 ± 33	40	860 ± 85	9 ± 4	1,0
mTAS2R5 RHO	870 ± 57	204 ± 43	25	870 ± 57	7 ± 4	0,8

3.3 Identifizierung eines neuen Rezeptor-Liganden Paares

Parallel zum Aufbau des Messsystems (Kapitel 3.2) wurden alle 24 menschlichen TAS2R-Rezeptoren (hTAS2R1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 16, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 19, 50), sowie 3 Rezeptoren der Maus (mTAS2R5, 8, 19) und 9 Rezeptoren der Ratte (rTAS2R1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 12) kloniert. Nachdem mTAS2R5 im FLIPR sicher nachgewiesen werden konnte, wurden schon klonierte Rezeptoren mit einer Reihe von Bitterstoffen getestet, um neue Rezeptor Liganden Paare zu identifizieren. Bei der Auswahl, der verwendeten Bitterstoffe (Tabelle 3.3), wurde besonders auf eine unterschiedliche chemischen Struktur Wert gelegt, um ein möglichst breites Spektrum an Bitterstoffe zu testen. Die Testsubstanzen wurden mindestens 10-fach höher, als ihre im Menschen ermittelte Wahrnehmungsschwelle, eingesetzt. Es wurden Bitterstoffe bevorzugt, die vom Menschen schon in niedrigen Konzentrationen wahrgenommen werden. Diese Strategie ermöglichte es, mit geringen Substanzkonzentrationen arbeiten zu können. Dadurch können einige bei hohen Substanzkonzentrationen auftretende technische Probleme vermieden werden. So sind viele Bitterstoffe aufgrund ihrer Hydrophobizität in hohen Konzentrationen nur schwer löslich. Hohe Substanzkonzentrationen ändern auch die Osmolarität der Messlösung, was zu osmotischem Stress für die Zellen führt. Für viele Bitterstoffe wurde insbesondere in hohen Konzentrationen auch in Zellen, ohne transfizierten TAS2R-Rezeptor, Änderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration beobachtet.

Die Tests ergaben, dass hTAS2R16 transfizierte HEK293 Zellen auf Stimulation durch D-(-)-Salicin mit einer transienten Erhöhung des intrazellulären Calcium-Spiegels reagieren (Abb.3.9.A + B). Eine genaue Charakterisierung zeigte, dass es sich um ein dosisabhängiges Signal handelt (Abb. 3.9B). Die zur Aktivierung des Rezeptors notwendige Minimale Salicinkonzentration liegt bei ca. 0,1 mM. Das Signal ist sättigbar und erreicht seine Maximalamplitude bei einer Konzentrationen von ca. 10 mM. (Abb. 3.9B). Das Signal ist in seinem transienten Verlauf sehr ähnlich zum Signal des Rezeptors mTAS2R5. Es ist spezifisch für TAS2R16. Weder Zellen ohne TAS2R-Rezeptor, noch Zellen, die mit anderen TAS2R-Rezeptoren transfiziert waren zeigen eine Antwort auf Salicin-Stimulation (Abb. 3.9A + C). Anhand der Dosiswirkungskurve wurde ein EC_{50} -Wert von 1,4 mM ermittelt (Abb. 3.9D).

Tabelle 3.3 Zur Suche nach neuen Liganden Rezeptor Paaren ausgewählte Bitterstoffe

Name	Struktur	Testkonzentration [mM]	humaner Schwellwert [mM]
Atropin		0,007	0,0007
Kolchizin		0,3	0,03
Chininsulfat		0,04	0,004
Denatoniumbenzoat		0,1	0,00001
Epicatechin		10	0,1
Nicotin		2	0,02
Theobromin		3	0,3
Salicin		10	0,2

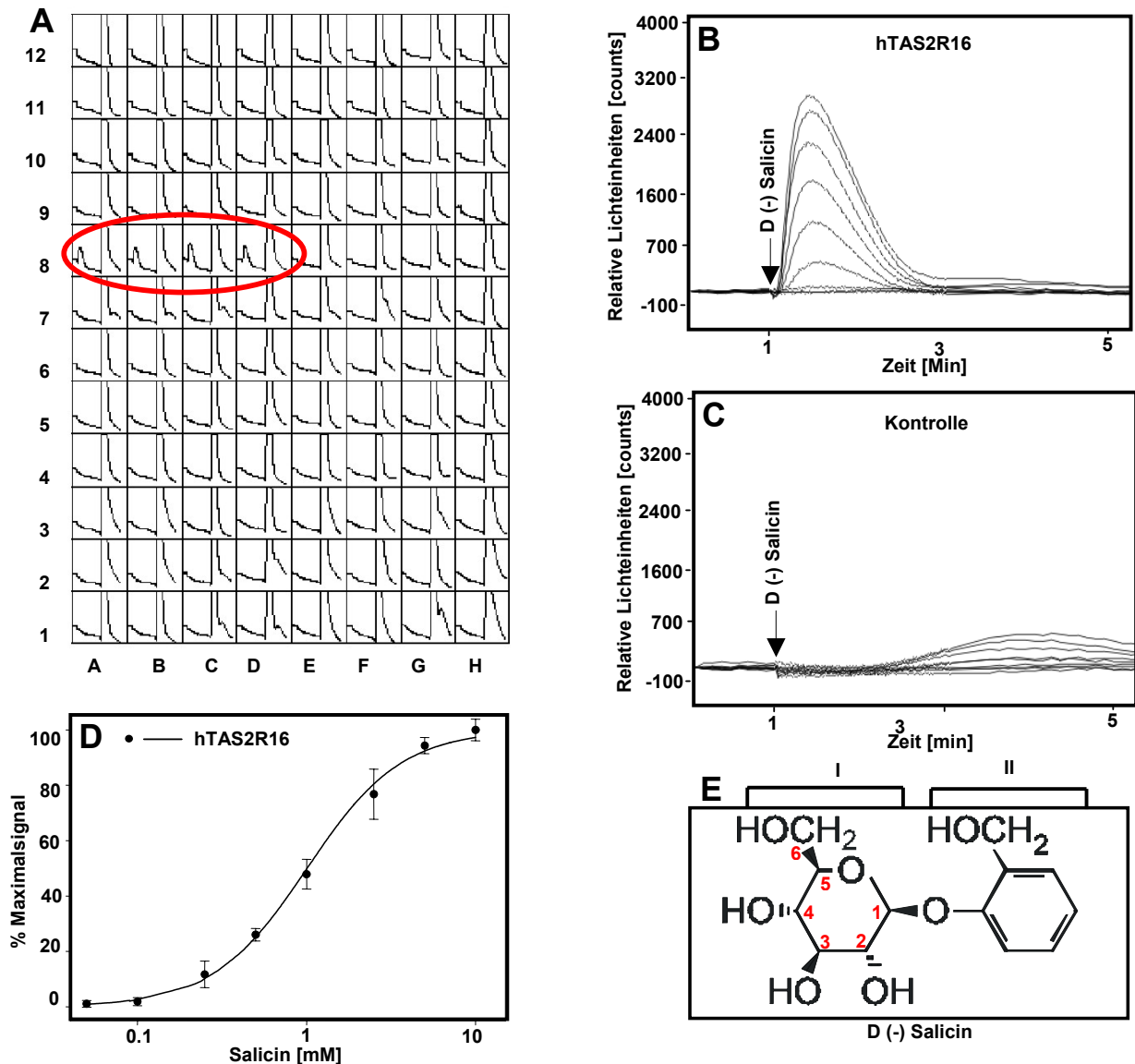


Abb. 3.9 Signale und Dosiswirkungskurve von hTAS2R16 exprimierenden Zellen nach Stimulation mit D(-)-Salicin

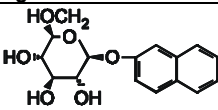
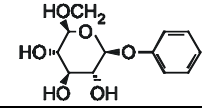
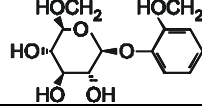
A.: 96-Loch-Platte mit HEK293-G_{α15} Zellen, in die alle 24 hTAS2Rs in jeweils 4 neben einander liegende Löcher der Messplatte transfiziert wurden. Auf die ganze Platte wurde zunächst 10 mM Salicin und dann 10 μM Isoproterenol appliziert. Nur in Reihe 8 A, B, C, D in die hTAS2R16-DNA transfiziert wurde, sind Signale nach Stimulation mit Salicin zu sehen. In allen Löchern der Platte ist dagegen ein Signal auf die Positivkontrolle Isoproterenol zu sehen. B: -Messsignale, der hTAS2R16 exprimierenden HEK293-G_{α15} Zellen nach Applikation verschiedener Konzentrationen von D(-)-Salicin (0 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,3 mM, 0,6 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM). Die einzelnen Kurven sind Mittelwerte von je 5 Messlöcher, in denen dieselben Salicinkonzentration getestet wurde C: Messsignale von mit Plasmid ohne Rezeptoren transfizierten HEK293-G_{α15} Zellen nach Applikation derselben Konzentrationen von D(-)-Salicin, als Negativkontrolle. Die einzelnen Kurven sind Mittelwerte von je 3 Messlöcher, in denen dieselben Salicinkonzentration getestet wurde D: Dosiswirkungskurve von hTAS2R16 nach Abzug der Basislinie und Normalisierung auf das Isoproterenolsignal. Der errechnete EC₅₀ liegt bei 1,4 mM und der Schwellwert bei 0,07 mM. E: Strukturformel von D(-)-Salicin bestehend aus I: Glucosegruppe, II: 2-Acetoxybenzoyl-Substitution an C1 in β Stellung. Die Zahlen 1-6 geben die Position der C-Atome im Glucosemolekül an.

3.4 Analyse der Ligandspezifität von hTAS2R16

Sollte die TAS2R-Familie die einzige Familie von Bitterrezeptoren sein, so wäre aufgrund dieser Beobachtung zu erwarten, dass ein Rezeptor durch viele Substanzen aktiviert werden muss. Dem entgegen steht jedoch die Beobachtung, dass die bisher funktionell exprimierten Rezeptoren, obwohl sie mit Dutzenden von Bitterstoffen getestet wurden, jeweils sehr spezifisch nur durch einen einzigen Agonisten aktiviert wurden [Chandrashekar, 2000]. Sollte dieses Verhalten typisch für die TAS2R-Rezeptoren sein, so wäre die Familie der TAS2R-Rezeptoren bei weitem zu klein, um alle bekannten Bitterstoffe detektieren zu können. Deshalb ist die Frage, wie viele Bitterstoffe einen humanen TAS2R-Rezeptor aktivieren können, sehr wichtig.

Die chemische Struktur des Salicins ist bekannt. Salicin besteht aus einem Glucosering, der über eine β -glykosidische Bindung an C1 mit einem Phenolderivat verbunden ist (Abb. 3.9E). Anhand der Strukturformel ist es möglich, chemisch verwandte Substanzen auszuwählen. Diese wurden im FLIPR mit hTAS2R16 exprimierenden HEK293-G $_{\alpha 15}$ Zellen getestet, um herauszufinden, ob weitere Substanzen den Rezeptor aktivieren. Tatsächlich konnten durch Messung von Strukturderivaten des Salicins noch 12 andere hTAS2R16-Agonisten identifiziert werden (Tab. 3.4A, B). Dies zeigt, dass zumindest hTAS2R16 durch ein breites Spektrum strukturverwandter Substanzen aktiviert werden kann. Alle bisher bekannten hTAS2R16 Agonisten besitzen ein Pyranose-Grundgerüst, das an C1 substituiert ist. Die EC $_{50}$ -Werte sowie die Aktivierungsschwellen der Substanzen zeigen erhebliche Unterschiede (Tab. 3.4). So besitzen gute Agonist wie Salicin, Phenyl- β -D-Glycosid und Naphtyl- β -D-Glycosid einen EC $_{50}$ -Wert von ~ 1 mM. Ein schlechter Agonist wie Amygdalin besitzt dagegen einen EC $_{50}$ -Wert von 20 mM. Die Höhe der EC $_{50}$ -Werte ist dabei mit der Hydrophobizität der Substitution an C1 korreliert. Anderen strukturverwandte Moleküle wie β -D-Glucose, Phenyl- β -D-Galaktosid und Phenyl- α -D-Glucosid sind keine hTAS2R16 Agonisten (Tab. 3.4C), Auch die für die Suche nach neuen Rezeptor Liganden Kombinationen verwendeten Bitterstoffe aktivieren den Rezeptor nicht (Tabelle 3.3). Deshalb müssen TAS2R16 Agonisten einige gemeinsame Schlüsseleigenschaften besitzen, die notwendig sind um den Rezeptor zu aktivieren.

Tab 3.4 Charakterisierung der hTAS2R16 Ligandenstruktur

Name	Strukturformel	Schwellwert [mM]	EC $_{50}$ [mM]
A: Liganden mit Variationen der C1 Substitution			
Naphtyl- β -D-Glucosid		0,4 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1
Phenyl - β -D-Glucosid		0,07 \pm 0,02	1,1 \pm 0,1
Salicin		0,07 \pm 0,02	1,4 \pm 0,2

Helicin		0,3 ± 0,1	2,3 ± 0,4
Arbutin		0,5 ± 0,2	5,8 ± 0,9
2-Nitrophenyl-β-D-Glucosid		0,3 - 1	k. D.
4-Nitrophenyl-β-D-Glucosid		1 - 3	k. D.
Methyl-β-D-Glucosid		15 ± 6	k. D.
Esculin		4 ± 2	k. D.
B: Agonisten mit Variationen anderer Positionen			
4-Nitrophenyl-β-D-Thioglucosid		1 - 5	k. D.
4-Nitrophenyl-β-D-Mannosid		1 - 3	k. D.
Amygdalin		2,3 ± 0,9	20 ± 3,4
C: kein Agonist			
Phenyl-β-D-Galaktosid		k. A.	k. A.
Phenyl-α-D-Glucosid		k. A.	k. A.
β-D-Glucose		k. A.	k. A.

A: Alle bisher identifizierten TAS2R16 Agonisten, die eine Variation der Substitution an C1 aufweisen. B: TAS2R16 Agonisten mit einer Variation an anderen Positionen. C: Zu TAS2R16-Agonisten strukturverwandte Substanzen, die den Rezeptor nicht aktivieren. Schwellwert: niedrigste Konzentration in der im FLIPR eine Aktivierung von hTAS2R16 transfizierten Zellen beobachtet wurde (Mittelwert aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten). Wichtige Unterschiede zwischen den chemischen Strukturen wurden rot hervorgehoben. k. D.: keine Daten wegen Messproblemen, wie z. B. osmotischen Stress, Toxizität, Unlöslichkeit der Substanzen in hohen Konzentrationen oder endogenen Zellantworten auch in Abwesenheit des Rezeptors. k. A.: kein Agonist bis zur Konzentration von 150 mM. Höhere Konzentrationen wurden nicht mehr getestet, da bei diesen Konzentrationen eine starken Reduktion der zellulären Antwort (vermutlich durch osmotischen Stress) beobachtet wurde.

3.5 Vergleich der im FLIPR und beim Menschen ermittelten Schwell- und EC₅₀-Werte

Nach der Identifizierung eines menschlichen Rezeptors und seiner Liganden in einem *in vitro* System (Kapitel 3.4) stellt sich die Frage, ob diese Ergebnisse auf menschliche Sinneswahrnehmungen übertragbar sind. Schmecken die anhand der chemischen Struktur ausgewählten Substanzen, die im FLIPR den Rezeptor aktivieren, für Menschen überhaupt bitter? Wenn ja, in wie weit sind dann die Konzentrationen, die hTAS2R16 aktivieren mit denen vergleichbar, in denen Menschen diese Substanzen als bitter empfinden?

Um diese Fragen zu klären, wurden psychophysikalische Experimente am Menschen durchgeführt. So wurde durch Verdünnungsreihen die Bestimmung der menschlichen Wahrnehmungsschwellwerte für die von uns identifizierten TAS2R16 Agonisten bestimmt. Zusätzlich wurden für die Substanzen soweit möglich auch Dosiswirkungskurve und EC₅₀-Werte für die Bitterintensität der Substanzen beim Menschen ermittelt. (Kapitel 2.10.1). Für die Bitterstoffe Phenyl-β-D-Glucosid, Salicin, Arbutin und Helicin wurde auch der Verlauf der gesamten Dosiswirkungskurven zwischen den menschlichen und im FLIPR erhaltenen Daten verglichen (Abb. 3.10).

Alle in Humanversuchen getesteten Substanzen, die im FLIPR als TAS2R16 Agonisten identifiziert wurden, schmecken für Menschen bitter. Für alle Substanzen ergibt der Vergleich der Schwell- und EC₅₀-Werte des Menschen mit den im FLIPR gemessenen Werten eine sehr gute Korrelation (Tabelle 3.6). So liegt zum Beispiel der Schwellwert für Salicin im FLIPR bei $0,07 \pm 0,02$ mM und im humanen Experiment bei $0,2 \pm 0,1$ mM. Der EC₅₀-Wert im FLIPR beträgt $1,4 \pm 0,2$ mM und der entsprechende menschliche EC₅₀-Wert beträgt $1,1 \pm 0,3$ mM. Für Salicin, Helicin und Arbutin sind die im Mensch und im FLIPR ermittelten Dosiswirkungskurven nahezu identisch (Abb. 3.10). Nur den Bitterstoff Phenyl-β-D-Glucosid können Menschen scheinbar etwas besser wahrnehmen, als anhand der FLIPR Messdaten zu erwarten ist. Die Abweichungen sind aber auch hier sehr gering und liegen fast im Bereich des Messfehlers. So liegt der EC₅₀-Wert für Phenyl-β-D-Glucosid beim Menschen bei $0,7 \pm 0,2$ mM und der im FLIPR gemessene EC₅₀-Wert bei $1,1 \pm 0,1$ mM.

Tab 3.6 Vergleich der im FLIPR und beim Menschen ermittelten Schwell- und EC₅₀-Werte

Substanz	Schwellwert FLIPR [mM]	Schwellwert Mensch [mM]	EC ₅₀ FLIPR [mM]	EC ₅₀ Mensch [mM]
Naphthyl-β-D-Glucosid	$0,4 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,4$
Phenyl -β-D-Glucosid	$0,07 \pm 0,02$	$0,1 \pm 0,05$	$1,1 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,2$
Salicin	$0,07 \pm 0,02$	$0,2 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,3$
Helicin	$0,3 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,4$	$2,2 \pm 0,7$
Arbutin	$0,5 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,3$	$5,8 \pm 0,9$	$5,4 \pm 1,8$
2-Nitrophenyl-β-D-Glucosid	0,3 - 1	k. D.	k. D.	k. D.
Methyl-β-D-Glucosid	15 ± 6	32 ± 11	k. D.	320 ± 108
Esculin	4 ± 2	4 ± 2	k. D.	k. D.
Amygdalin	$2,3 \pm 0,9$	k. D.	$20 \pm 3,4$	k. D.

k. D.: keine Daten wegen Messproblemen, wie zu hohem osmotischen Stress, Unlöslichkeit der Substanzen in hohen Konzentrationen, endogenen Zellantworten in Abwesenheit des Rezeptors oder Toxizität für den Menschen.

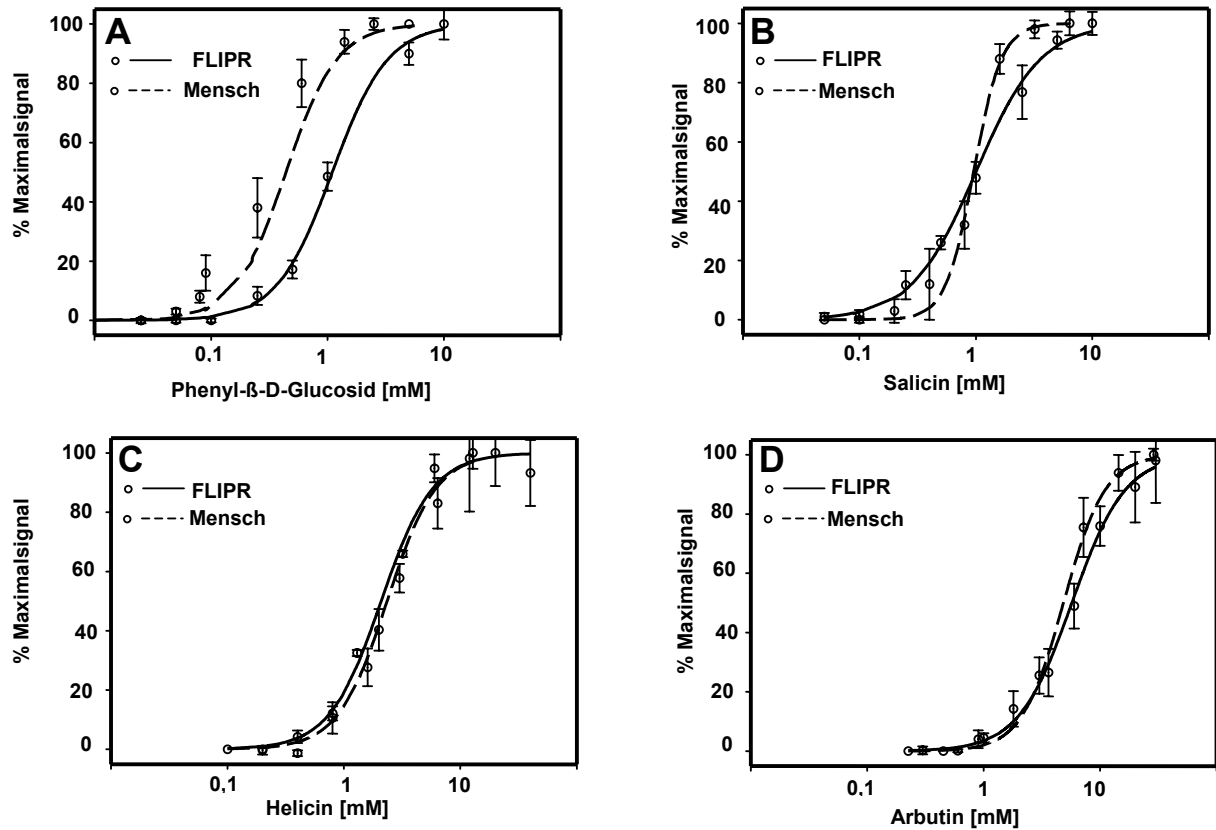


Abb. 3.10 Vergleich der im FLIPR und beim Menschen ermittelten Dosiswirkungskurven

Die FLIPR Dosiswirkungskurven (schwarze Linien) zeigen die Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von hTAS2R16 exprimierenden HEK293- $G_{\alpha 15}$ Zellen in Abhängigkeit von der Stimulation mit den hTAS2R16 Agonisten Phenyl-β-D-Glucosid (A), Salicin (B), Helicin (C) und Arbutin (D) in steigenden Konzentrationen. Diese Daten wurden mit den von uns ermittelten menschlichen psychophysikalischen Daten verglichen (gestrichelte Linie), die die konzentrationsabhängige Änderung der Intensität des Bittergeschmacks der gleichen Substanzen von der menschlicher Probanden zeigen. Alle Kurven sind auf das Maximalsignal normiert.

3.6 Untersuchung der Desensitivierbarkeit des hTAS2R16-Signals im Einzelzell-Calcium-Imaging.

Desensitivierung ist ein typische Eigenschaft vieler G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Deshalb ist es von Interesse, zu untersuchen, in wie weit hTAS2R16 dieses Verhalten zeigt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 3.11 zusammen gefaßt: hTAS2R16 exprimierende Zellen zeigen Desensitivierung, da nach mehrfacher Stimulation mit Phenyl-β-D-Glucosid eine deutlich Reduktion der Signalantwort zu sehen ist. Die Desensitivierung ist reversibel, da nach einiger Zeit nach Stimulation mit Phenyl-β-D-Glucosid wieder starke Signale gemessen werden können. hTAS2R16

exprimierende Zellen zeigen auch Kreuzdesensitivierung, da bei Applikation zweier unterschiedlicher hTAS2R16 Agonisten (z. B. Salicin/Helicin) ebenfalls eine reversible Reduktion der Signalantwort zu sehen ist.

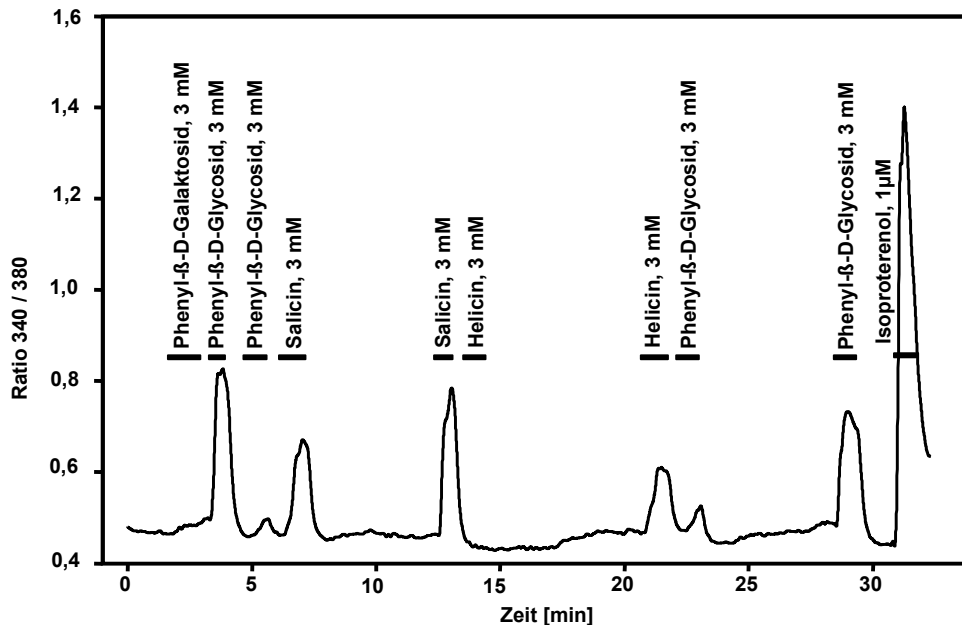


Abb. 3.11 Desensitivierung und Kreuzdesensitivierung von hTAS2R16 exprimierender Zellen im Einzelzell-Calcium Imaging
 Einzelzell-Calcium-Imaging Messsignale aus einem typischen Experiment mit hTAS2R16-DNA transfizierten HEK293-G_{α16} Zellen. In diesem Experiment wurden 60 Zellen untersucht. Die Grafik zeigt das durchschnittliche Signal von 6 auf hTAS2R16 Agonisten reagierenden Zellen. Der schwarze Balken gibt den Zeitpunkt und die Dauer der Applikation an. Phenyl-β-D-Galaktosid (kein TAS2R16 Agonist) wurde als Negativkontrolle zuerst appliziert. Dann die TAS2R16 Agonisten Phenyl-β-D-Glucosid, Salicin und Helicin. Bei wiederholter Applikation von Phenyl-β-D-Glycosid ist anhand der reduzierten Antwort eine deutliche, aber reversible Desensitivierung zu erkennen. Eine reversible Kreuzdesensitivierung kann für Salicin / Helicin und für Helicin / Phenyl-β-D-Glycosid gezeigt werden. Am Ende des Versuchs wird als Positivkontrolle Isoproterenol appliziert. Nach jeder Applikationen wurde durch Waschen mit Barth Lösung die jeweilige Substanz entfernt.

3.7 Adaptation und Kreuzadaptation des Bittergeschmacks von hTAS2R16 Agonisten beim Menschen

Der Bittergeschmack vieler Substanzen ist im Menschen adaptierbar. D. h. nach einer längeren Verkostung schmeckt ein Bitterstoff weniger bitter. Im *in vitro* System konnte gezeigt werden, dass hTAS2R16 desensitivierbar und kreuzdesensitivierbar ist (Kapitel 3.6). daher stellt sich die Frage ob der Bittergeschmack von hTAS2R16 Agonisten im Menschen auch eine spezifische Kreuzadaptation zeigen. Aufgrund der vorhergehenden Ergebnisse (Kapitel 3.6) würde eine solche Beobachtung nahe legen, dass die Kreuzadaptation von hTAS2R16 Agonisten durch die Desensitivierung des hTAS2R16 Rezeptors verursacht wird. Deshalb wurde in psychophysikalischen Experimenten untersucht, ob hTAS2R16 Agonisten im Menschen kreuzadaptieren.

In dem Abb. 3.12 gezeigten Experiment mußten 10 trainierte Probanden zunächst hintereinander Lösungen mit hohen Konzentrationen der hTAS2R16 Agonisten Phenyl-β-D-Glycosid, Salicin und Helicin für 15 Sekunden verkosten und dann die Bitterintensität auf einer 1- 5 Skala bewerten. Nach einer 30

minütigen Pause, in der sich die Probanden von etwaigen Adaptationseffekten erholen konnten, wurde zunächst Denatonium das hTAS2R16 nicht aktiviert (Kapitel 3.4), in einer mäßig bitteren Konzentration verkostet. Dann wurde der hTAS2R16 Agonist Phenyl- β -D-Glucosid verkostet und 2 Minuten im Mund behalten. Die Probanden mussten dabei die Bitterintensität der Substanz nach 15, 30, 60, und 120 Sekunden bewerten. Wie in Abb. 3.12 zu sehen ist, nahm die Bitterintensität der Substanz während dieses Zeitraums stark ab. Es wurde also eine Adaptation beobachtet. Nach 2 Minuten wurde das Phenyl- β -D-Glucosid ausgespuckt und die Probanden hatten die beiden anderen hTAS2R16 Agonisten Salicin und Helicin zu verkosten und nach jeweils 15 Sekunden zu bewerten. Für beide Substanzen konnte eine deutliche Kreuzadaptation festgestellt, da sie, wie das Phenyl- β -D-Glucosid, als nur schwach bitter bewertet wurden (Abb. 3.12). Die Bewertung der Bitterintensität des im Anschluss verkosteten Denatoniums, der kein hTAS2R16 Agonist ist, war jedoch im Vergleich zur vorhergehenden Bewertung nahezu unverändert. Dies zeigt, dass sich die Adaptation auf die hTAS2R16 Agonisten beschränkt. 30 Minuten nach dem Ende des Versuches war die Bewertung der Bitterintensität der hTAS2R16 Agonisten wieder normal (Abb. 3.12). d. h. der Adaptationsprozess ist reversibel. Die gezeigte spezifische Kreuzadaptation von hTAS2R16 Agonisten ein weiterer Beweis, dass hTAS2R16 der menschliche Bitterrezeptor für Salicin und verwandte Substanzen ist. Diese Ergebnisse sind auch erste Hinweise, dass die Desensitivierung von TAS2R-Rezeptoren die Ursache für die Bitteradaptation der Menschen ist.

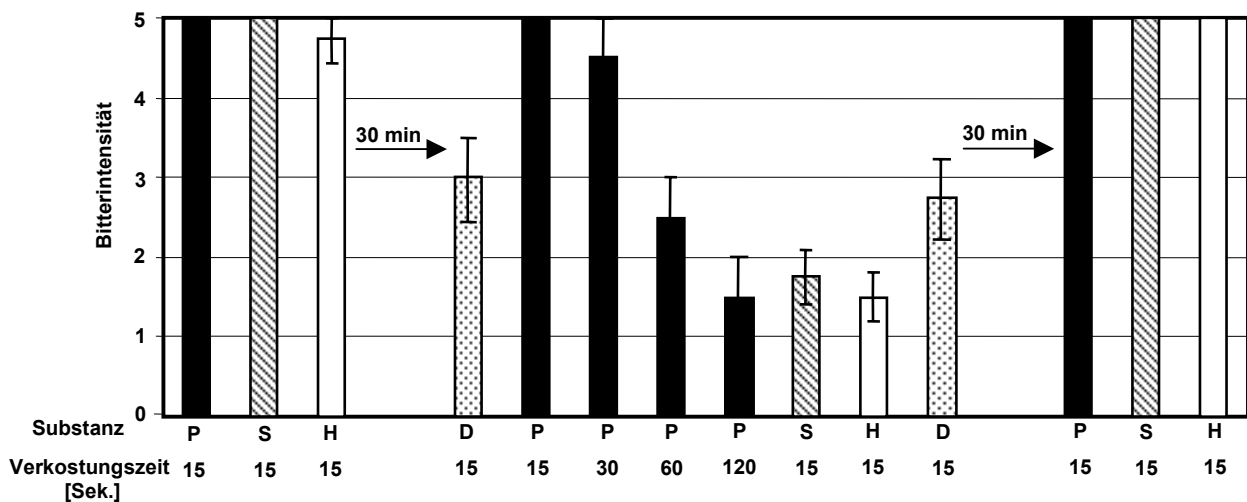


Abb. 3.12 Adaptation und Kreuzadaptation des Bittergeschmacks von hTAS2R16 Agonisten beim Menschen

Die TAS2R16 Agonisten Phenyl- β -D-Glucosid, Salicin und Helicin wurden zunächst einzeln verkostet und ihre Bitterintensität nach 15 Sekunden bewertet. Dann erfolgte eine 2 minütige Verkostung von Phenyl- β -D-Glucosid, dessen Bitterintensität nach 15, 30, 60 und 120 Sekunden bewertet werden musste. Es ist eine deutliche reversible Adaptation der Bitterintensität von Phenyl- β -D-Glucosid zu beobachten. Die beiden TAS2R16 anderen Agonisten Salicin und Helicin zeigen Kreuzadaptation, da sie ebenfalls einen deutlich reduzierten Bittergeschmack aufweisen. Die Bitterintensität der Kontrollsubstanz Denatoniumbenzoat (kein TAS2R16 Agonist) hingegen ist von der Adaptation nicht betroffen.

■ Phenyl- β -D-Glucosid 8 mM (P); ▨ Salicin 8 mM (S); □ Helicin 8 mM (H); ▤ Denatoniumbenzoat 0,0003 mM (D).

3.8 Adaptation und Kreuzadaptation von hTAS2R16 Agonisten und strukturverwandten Nicht-Agonisten beim Menschen

Eine weitere Vorhersage anhand unserer *in vitro* Messdaten war es, dass zu hTAS2R16 Agonisten, strukturverwandte Substanzen, die hTAS2R16 nicht aktivieren, für den Menschen auch nicht bitter schmecken. Dies ist jedoch nicht der Fall, da Phenyl- α -D-Glucosid in sehr hohen Konzentrationen (Schwellwert ca. 10 mM) für Menschen schwach bitter schmeckt. In psychophysikalischen Experimenten zeigen hTAS2R16 Agonisten Kreuzadaptation (Kapitel 3.7). Sollte Phenyl- α -D-Glucosid einen anderen Rezeptor, als hTAS2R16 aktivieren, wäre für diese Substanz keine Kreuzadaptation zu erwarten. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde ein weiteres psychophysikalisches Experiment durchgeführt.

Zehn trainierte Probanden mussten zunächst Lösungen mit hohen Konzentrationen an Phenyl- α -D-Glykosid, sowie den hTAS2R16 Agonisten Salicin und Helicin für 15 Sekunden verkosten und dann die Bitterintensität auf einer 1- 5 Skala bewerten. Nach einer 30 minütigen Pause, in der sich die Probanden von etwaigen Adaptationseffekten erholen konnten, begann das eigentliche Experiment. Zunächst wurde Denatonium in einer mäßig bitteren Konzentration verkostet, . Danach wurde Phenyl- α -D-Glucosid für 3 Minuten verkostet. Die Probanden mußten die Bitterintensität der Substanz nach 15, 30, 60, 120 und 180 Sekunden bewerten. Wie zuvor (Kapitel 3.7) nahm die Bitterintensität der Substanz während dieses Zeitraums stark ab (Abb. 3.13). Nach 3 Minuten wurde das Phenyl- α -D-Glucosid ausgespuckt, und die Probanden hatten die beiden hTAS2R16 Agonisten Salicin und Helicin zu verkosten und nach jeweils 15 Sekunden zu bewerten. Für beiden Substanzen wurde keine Kreuzadaptation mit Phenyl- α -D-Glucosid festgestellt (Abb. 3.13). Auch die Bewertung der Bitterintensität des im Anschluss verkosteten Denatoniums war nahezu unverändert. Damit wurde die Hypothese, dass der Bittergeschmack von Phenyl- α -D-Glucosid adaptiert aber keine Kreuzadaptation mit hTAS2R16 Agonisten beobachtet werden kann, experimentell bestätigt.

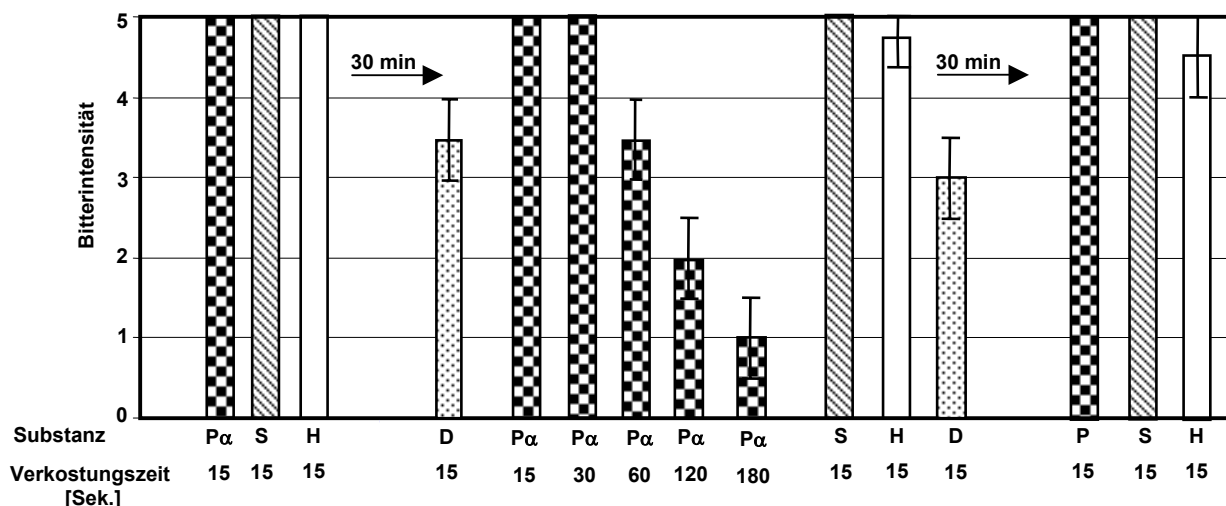


Abb.3.13 Der Bittergeschmack von hTAS2R16 Agonisten und Phenyl- α -D-Glucosid zeigt keine Kreuzadaptation

Die TAS2R16 Agonisten Salicin und Helicin und Phenyl- α -D-Glucosid, wurden zunächst einzeln verkostet und ihre Bitterintensität nach 15 Sekunden bewertet. Dann erfolgte eine 3-minütige Inkubation mit Phenyl- α -D-Glucosid, dessen Bitterintensität nach 15,30, 60, 120 und 180 Sekunden bewertet werden mußte. Der Phenyl- α -D-Glucosid zeigt eine deutliche reversible Adaptation. Die beiden TAS2R16 Agonisten Salicin, Helicin sowie die Kontrollsubstanz Denatoniumbenzoat sind davon nicht betroffen. Phenyl- α -D-Glucosid 150 mM (P α); Salicin 8 mM (S); Helicin 8 mM (H); Denatoniumbenzoat 0,0003 mM (D).

3.9 Nachweis der hTAS2R16 mRNA in menschlichen Geschmacksknospen

Die gute Korrelation aller in unserem *in vitro* System identifizierten hTAS2R16 Agonisten mit der menschlichen Wahrnehmung dieser Substanzen als Bitterstoffe macht es sehr wahrscheinlich, dass TAS2R16 beim Menschen für die Erkennung dieser Bitterstoffe notwendig ist.

Eine wichtige Voraussetzung hierfür ist allerdings, dass der Rezeptor auch in Geschmacksrezeptorzellen gebildet wird. Daher wurden an menschlichem Zungengewebe der Wallpapillen RT-PCR und *in situ* Hybridisierungs Experimente durchgeführt (Abb. 3.14).

Die Ergebnisse der RT-PCR in Abb.3.14A zeigen klar, dass hTAS2R16 in der menschlichen Wallpapille exprimiert wird, da aus Wallpapillen cDNA (Bahn 5) mit Hilfe von hTAS2R16 spezifischen Primern ein Fragment amplifiziert werden konnte. Die Größe des DANN-Fragments von 910 bp entsprach genau den Erwartungen. Anhand der beiden Negativkontrollen in Bahn 3 + 4 ist auszuschließen, dass das PCR-Produkt auf Kontaminationen mit Plasmid-DNA oder genomischer- DNA zurückzuführen ist. Die Expression von hTAS2R16 ist spezifisch, da in keinem anderen der getesteten Gewebe hTAS2R16 mRNA detektiert werden konnte (Abb. 3.14A Bahn 6-14). Eine mangelhafte cDNA-Synthese ist als Ursache auszuschließen, da es möglich war in allen cDNA Präparationen, β -Aktin-cDNA nachzuweisen. In zwei unabhängigen Proben, die aus dem Gewebe der gesamten Zunge (Zungenepithel + Zungenmuskulatur) bestehen, konnte hTAS2R16 nicht nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass die Expression von hTAS2R16 in der menschlichen Zunge auf nur sehr wenige Zellen beschränkt ist, da die hTAS2R16 Konzentration in cDNA aus dem gesamten Zungengewebe unter der Nachweisgrenze liegt (Abb. 3.14A Bahn 6+7). Die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung (Abb. 3.14B) zeigen weiterhin, dass die hTAS2R16-exprimierenden Zellen in Geschmacksknospen liegen.

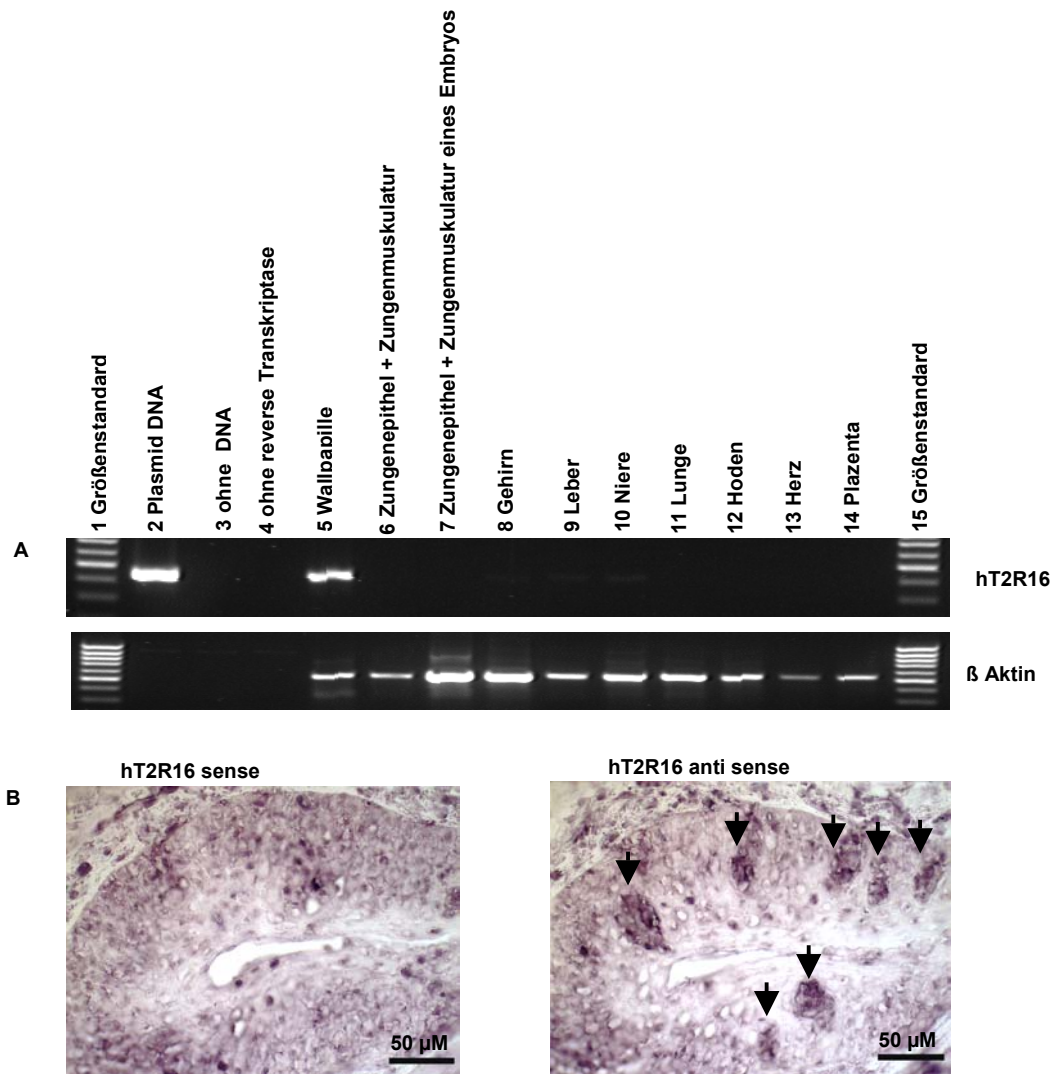


Abb 3.14 Nachweis der hTAS2R16 mRNA in menschlichen Geschmacksknospen durch RT-PCR und *in situ* Hybridisierung

A) RT-PCR Experiment. Bahn 1 + 15: Größenstandard, Bahn 2: Positivkontrolle Amplifikation von hTAS2R16 aus Plasmid-DNA, Bahn 3: Negativkontrolle PCR ohne cDNA um Kontamination der Reaktion durch Plasmid DNA auszuschließen. Bahn 4: Negativkontrolle PCR von cDNA Synthese Ansatz mit Wallpapillen RNA ohne Reverse Transkriptase um auszuschließen, dass die eingesetzte RNA mit genomischer DNA kontaminiert ist. Bahn 5: PCR von cDNA der Wallpapillen. Bahn 6-14: PCR von cDNA aus diversen menschlichen Geweben. Ein hTAS2R16 PCR Produkt ist nur in der Positivkontrolle (Bahn 2) und in der Wallpapille (Bahn 5) nachweisbar. B) *In situ* Hybridisierung von Wallpapillengewebe mit hTAS2R16 Sense und Antisense cRNA. Für die Antisense Proben kann ein deutliches Signal in den Geschmacksknospen detektiert werden (Schwarze Pfeile), während in der Negativkontrolle (Sense cRNA) keine spezifische Färbung zu erkennen ist.

3.10 Identifizierung und Charakterisierung weiterer TAS2R-Rezeptor Ligandenpaare

Während der Charakterisierung des TAS2R16 Rezeptors gelang es, weitere Rezeptor Liganden Kombinationen zu identifizieren. So reagiert der zu mTAS2R5 nächst verwandte Rezeptor der Ratte rTAS2R9 ebenfalls auf Cycloheximid. Trotz einer Aminosäureidentität von nur 86% sind die Dosiswirkungskurven und EC_{50} -Werte von mTAS2R5 (Abb.3.15; EC_{50} : 0.07 μ M) und rTAS2R9 (Abb. 3.15; EC_{50} : 0,1 μ M) nahezu identisch. Die hohe Sequenzverwandtschaft sowie die identische Funktion zeigen, dass es sich bei rTAS2R9 um den zu mTAS2R5 orthologen Rezeptor der Ratte handelt.

Interessanterweise reagiert der zu den beiden Rezeptoren nächst verwandte menschliche Rezeptor hTAS2R10 dagegen auf Strychnin, Brucin und Denatoniumbenzoat (Abb. 3.15). Diese Liganden weisen gegenüber Cycloheximid eine sehr unterschiedliche chemische Struktur auf. Die im FLIPR aufgezeichneten hTAS2R10 Signalantworten sind mit 200 - 500 relativen Lichteinheiten relativ klein. Da eine geringe oder mäßige Aktivierung des Rezeptors wegen des Detektionslimits von ca. 50 - 100 Einheiten nicht gemessen werden kann, ist die Berechnung einer Dosiswirkungskurve nicht sinnvoll. Die Tatsache, dass die maximale Aktivierung des Rezeptors jedoch schon bei ca. für alle drei Substanzen schon bei 100 –200 μ M erreicht zu ist und der menschliche Schwellwert für Strychnin bei 2 μ M liegt deutet darauf hin, dass hTAS2R10 der menschliche Strychnin- bzw. Brucinrezeptor sein könnte.

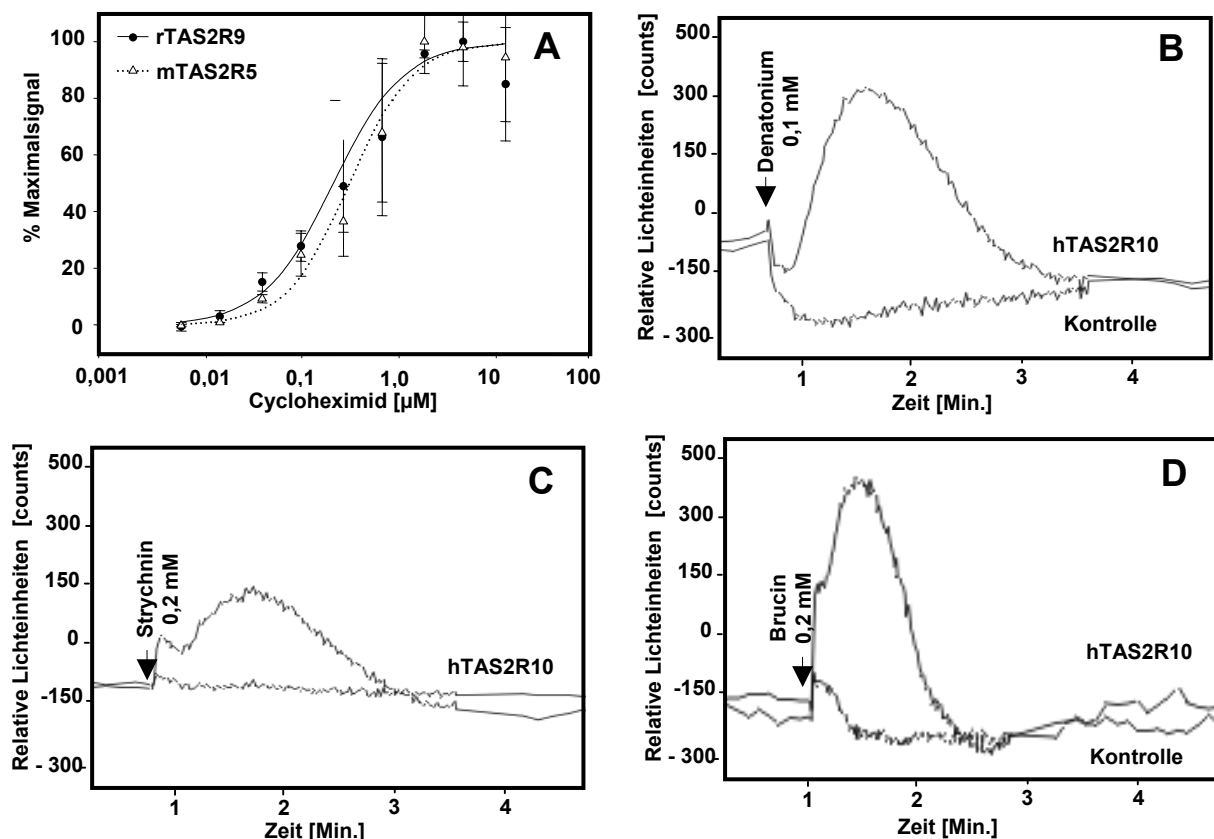


Abb. 3.15 Weitere identifizierte TAS2R Rezeptoren

A: Vergleich der Dosiswirkungskurven mit mTAS2R5- bzw. rTAS2R9-DNA transfizierte HEK293- $G_{\alpha 15}$ Zellen nach Stimulation mit Cycloheximid. Bei der Analyse der Messdaten wurden Schwankungen der Zellzahlen durch Normalisierung Die Angaben beziehen sich prozentual auf das in diesem Versuch gemessene Maximalsignal und sind um die Basislinie korrigiert .B-D: Signalantwort von hTAS2R10-DNA transfizierte HEK293- $G_{\alpha 15}$ Zellen im FLIPR nach Applikation von Denatonium (B), Strychnin (C) und Brucin (D). Die einzelnen Kurven sind Mittelwerte von je 3 Messlöchern, in denen dieselbe Konzentration getestet wurde.

3.11 Charakterisierung der Ligandenspezifität der TAS2R-Rezeptoren

Aufgrund der Sequenzverwandtschaft ist es interessant, ob Cycloheximid auch den Rezeptor TAS2R10 aktivieren kann oder umgekehrt Strychnin den Rezeptor rTAS2R9. Dies führt zu der Frage, ob diese Rezeptoren für die jeweils identifizierten Liganden spezifisch sind, oder ob einige dieser Substanzen in der Lage sind auch mehr als einen Rezeptor zu aktivieren. Daher erfolgte eine Kreuztestung der von uns funktionell identifizierten Rezeptoren rTAS2R9, hTAS2R10 und hTAS2R16 mit Agonisten für andere Rezeptoren. Die Konzentrationen wurden dabei so gewählt, dass der für diese Substanz identifizierte Rezeptor stark aktiviert wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass die Rezeptoren sehr spezifisch nur mit den für sie als Liganden identifizierten Substanzen reagieren (Abb. 3.16). Auch die beiden sequenzverwandten Rezeptoren rTAS2R9 und hTAS2R10 zeigen in den benutzten Konzentrationen keinerlei Kreuzreaktivität. Diese Ergebnisse wurden von zwei weiteren unabhängigen Experimenten bestätigt.

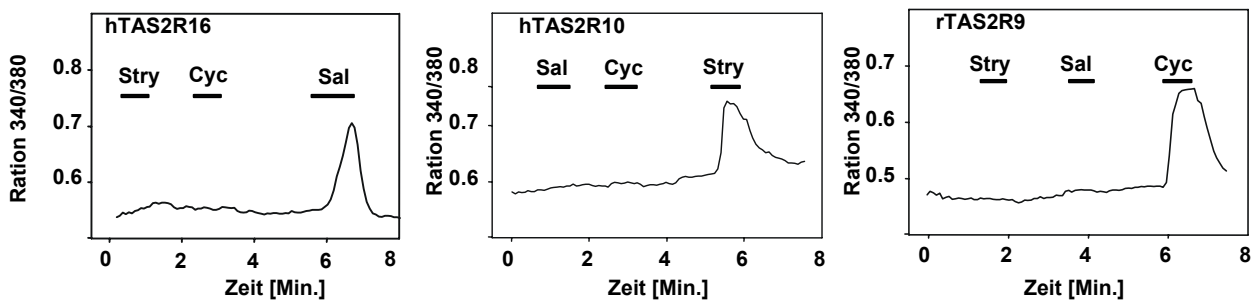


Abb. 3.16 Ligandenspezifität der TAS2R Rezeptoren

Einzelzell-Calcium-Imaging-Experimente von mit TAS2R-Rezeptor-DNA transfizierten HEK293-G₁₅ Zellen nach Applikation von Strychnin (Stry), 0,2 mM; Cycloheximid (Cyc), 0,01 mM Salicin (Sal), 3 mM. Die schwarzen Balken zeigen die Dauer der Applikation. hTAS2R16: Antwort von 5 aus 53 analysierten Zellen. hTAS2R10: Antwort von 9 aus 81 analysierten Zellen. rTAS2R9: Antwort von 8 aus 36 analysierten Zellen.

3.12 Untersuchung der Expression und Lokalisation von TAS2R-Rezeptoren in HEK293 G15 Zellen

Unter der Annahme, dass die TAS2R-Rezeptoren, die einzige Familie der Bitterrezeptoren darstellt, müsste es daher möglich sein, für jeden Bitterstoff einen Rezeptor zu identifizieren. Im Rahmen der Suche nach Liganden wurden alle 24 klonierten TAS2R-Rezeptoren mehrfach mit einer Auswahl von neun für den Menschen bitterer Substanzen getestet (Tab.3.3 + Strychnin). Bislang konnte nur für zwei dieser getesteten Bitterstoffe, ein menschliche Rezeptoren identifiziert werden. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis könnten individuelle Unterschiede in der Expression- oder der Membrantransport der verschiedenen TAS2R-Familienmitgliedern in den HEK293 Zellen sein.

Analysen der Expressionsrate von 22 humanen TAS2R-Rezeptoren sowie von mTAS2R5 und rTAS2R9 zeigt große Unterschiede zwischen den einzelnen Rezeptoren (Tabelle 3.7). So besitzen 60% (13 von 22) der untersuchten menschlichen Rezeptoren sowie rTAS2R9 eine Expressionsrate von mehr als 10%. mTAS2R5 sowie 14% (3 von 22) der hTAS2Rs haben Expressionsraten zwischen 1% - 10%. Nur 18% (4 von 22) Rezeptoren liegt Expressionsrate unter 1%. Für die beiden Rezeptoren hTAS2R47 und hTAS2R49 (9%) konnte keine Expression detektiert werden. Auch die Analyse der Lokalisation der Rezeptoren an der Zelloberfläche ergab deutliche Unterschiede. So ist nur bei 55% (12 von 22) der

hTAS2R-Rezeptoren eine Kolokalisierung des Rezeptors mit der Plasmamembran nachweisbar (Tabelle 3.6). Die in dieser Arbeit funktionell exprimierten TAS2R-Rezeptoren gehören dabei alle in die Gruppe der Rezeptoren mit einer deutlich nachweisbaren Expression an der Zelloberfläche (Abb.3.5 + 3.17; Tabelle 3.7). Variationen in der Expression und subzellulären Lokalisation der einzelnen TAS2R-Rezeptoren in HEK293 Zellen sind also ein Grund, warum bislang nicht für alle Substanzen Rezeptoren identifiziert wurden.

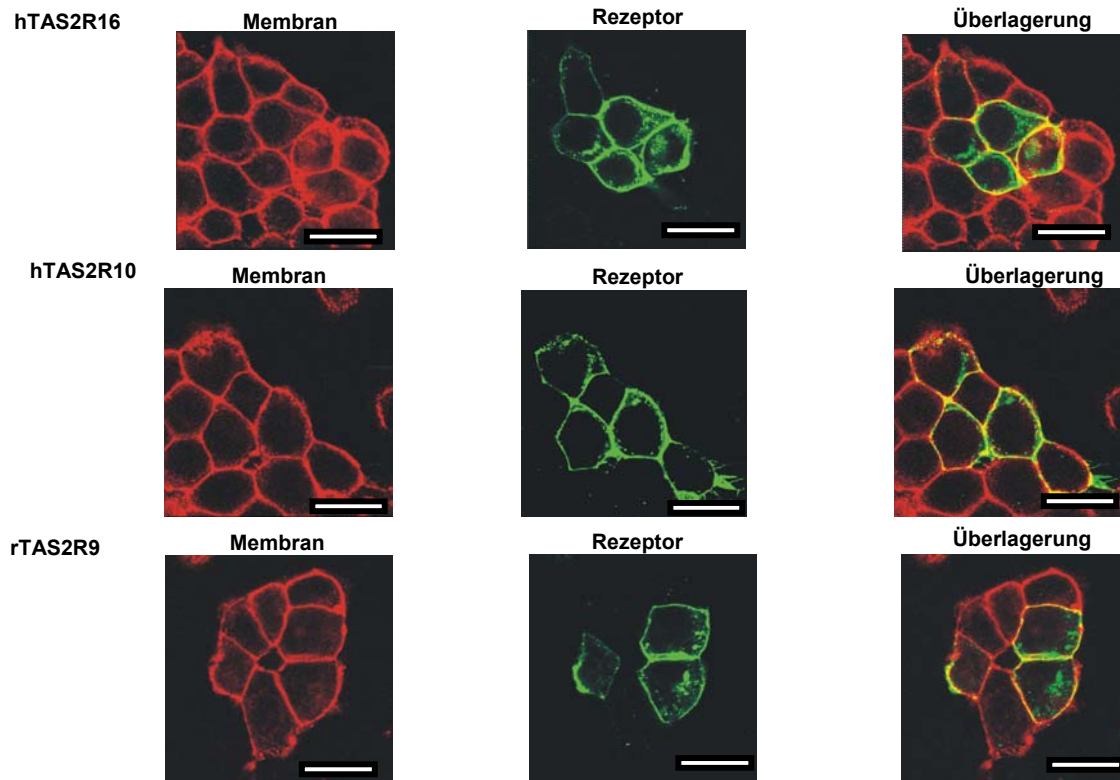


Abb. 3.17 Zelloberflächenexpression von hTAS2R16, hTAS2R10 und rTAS2R9

Aufnahmen mit dem konfokalen Mikroskop von rTAS2R9, hTAS2R16 und hTAS2R10 24 Stunden nach der transienten Transfektion in HEK293 G15 Zellen. Weißer Balken 20 µm. Membran (rot): Cytoplasmamembran nach Concanavalin A-Biotin/Avidin D-Texas Red Detektion; Rezeptor (grün): Rezeptor nach Maus-Anti-HSV/Anti-Maus-Alexa 488 Detektion; Überlagerung: Überlagerungsaufnahme von Membran und Rezeptor. Die durch Kolokalisierung von Membran und Rezeptor entstehende deutliche Gelbfärbung zeigt, dass ein Teil des Rezeptorproteins an die Zelloberfläche gelangt.

Tabelle 3.7 Untersuchung der Expression und Membranlokalisation von TAS2R-Rezeptoren

Rezeptor	Expression [%]	Membranständigkeit	Rezeptor	Expression [%]	Membranständigkeit
hTAS2R1	20	+	hTAS2R40	29	+
hTAS2R3	35	+	hTAS2R41	32	-
hTAS2R4	n. A.	n. A.	hTAS2R42	0,1	-
hTAS2R5	n. A.	n. A.	hTAS2R43	3	-
hTAS2R7	14	+	hTAS2R44	6	+
hTAS2R8	1	+/-	hTAS2R45	0,1	-
hTAS2R9	0,5	-	hTAS2R46	0,5	-
hTAS2R10	13	+	hTAS2R47	-	-
hTAS2R13	16	-	hTAS2R48	14	+
hTAS2R14	12	+	hTAS2R49	-	-
hTAS2R16	20	+	hTAS2R50	15	+
hTAS2R38	35	+	mTAS2R5	1,5	+
hTAS2R39	14	-	rTAS2R9	27	+

+: alle analysierten Zellen zeigen eine Kolokalisierung von Membran und Rezeptor; +/-: einige der untersuchten Zellen zeigen Kolokalisierung von Membran und Rezeptor; - keine Kolokalisierung von Membran und Rezeptor detektierbar, n. A.: nicht analysiert

3.13 Untersuchung der G-Protein Kopplung von TAS2R-Rezeptoren in HEK293 Zellen

Auch die Fähigkeit verschiedener TAS2R-Rezeptoren mit der G-Protein Alpha Untereinheit $G_{\alpha 15}$ zu interagieren, könnte individuelle Unterschiede aufweisen. Einen ersten Hinweis, auf solche Unterschiede lieferte eine Analyse der Signaltransduktion von hTAS2R16 in HEK G15 Zellen in Einzelzell-Calcium-Imaging-Experimenten. Die G-Protein Untereinheit $G_{\alpha 15}$ ist Pertussis Toxin insensitiv. Eine Inkubation von hTAS2R16 exprimierenden HEK293- $G_{\alpha 15}$ Zellen mit Pertussis Toxin sollte daher keine Auswirkungen auf die Signalamplitude besitzen. Überraschende Weise unterdrückt eine 2 stündige Inkubation der transfizierten Zellen mit 1 μ M Pertussis Toxin jede Antwort auf eine Stimulation durch Salicin (Abb. 3.18A). Die Signalantwort des an $G_{\alpha 15}$ koppelnden β -adrenergen Rezeptors auf Isoproterenol bleibt dagegen unbeeinflusst (Abb. 3.18A). Im parallel durchgeführten Kontrollexperiment ohne Pertussis Toxin Zugabe ist dagegen ein deutliches Signal zu sehen (Abb. 3.18B). Weitere Experimente beide den hTAS2R16 in HEK293 Zellen ohne $G_{\alpha 15}$ transfizierte wurde zeigten, dass auch in Abwesenheit von $G_{\alpha 15}$ Signale gemessen werden können (Abb. 3.18C). In Kontrollexperiment zeigen Zellen ohne hTAS2R16 keine Signale (Abb. 3.18D). Der Rezeptor muss also an ein von HEK293 Zellen endogen exprimiertes Pertussis Toxin sensitives G-Protein koppeln. Für mTAS2R5 wurde eine Kopplung an $G_{\alpha 15}$ beschrieben [Chandrashekar, 2000]. Daher wäre zu erwarten, dass die Signale dieses Rezeptors Pertussis Toxin insensitiv sind. Deshalb wurde im FLIPR eine vergleichende Analyse der Signale von hTAS2R16 und mTAS2R5 mit und ohne Pertussis Toxin durchgeführt. Wie zu erwarten, ist das mTAS2R5 Signal Pertussis Toxin insensitiv, während das hTAS2R16 Signal durch Zugabe von Pertussis Toxin blockiert wird (Abb. 3.19). Diese Ergebnisse zeigen klar, dass es zwischen den einzelnen TAS2R Rezeptoren im *in vitro* System individuelle Unterschiede bezüglich ihrer Fähigkeit gibt, mit den in HEK293- $G_{\alpha 15}$ Zellen angebotenen G-Proteinen zu interagieren. Im Calcium Imaging kann die Aktivierung eines Rezeptors nur dann nachgewiesen werden, wenn dies zu einer Veränderung des intrazellulären Calcium Spiegels führt. Da nicht alle TAS2Rs an $G_{\alpha 15}$ koppeln könnte dies dazu führen, dass die Aktivierung eines Rezeptors nicht zu Änderungen des intrazellulären Calcium Spiegels führt und somit unbemerkt bleibt. Dieses kann ein weiterer Grund sein, warum nicht für alle Bitterstoffe Rezeptoren identifiziert wurden.

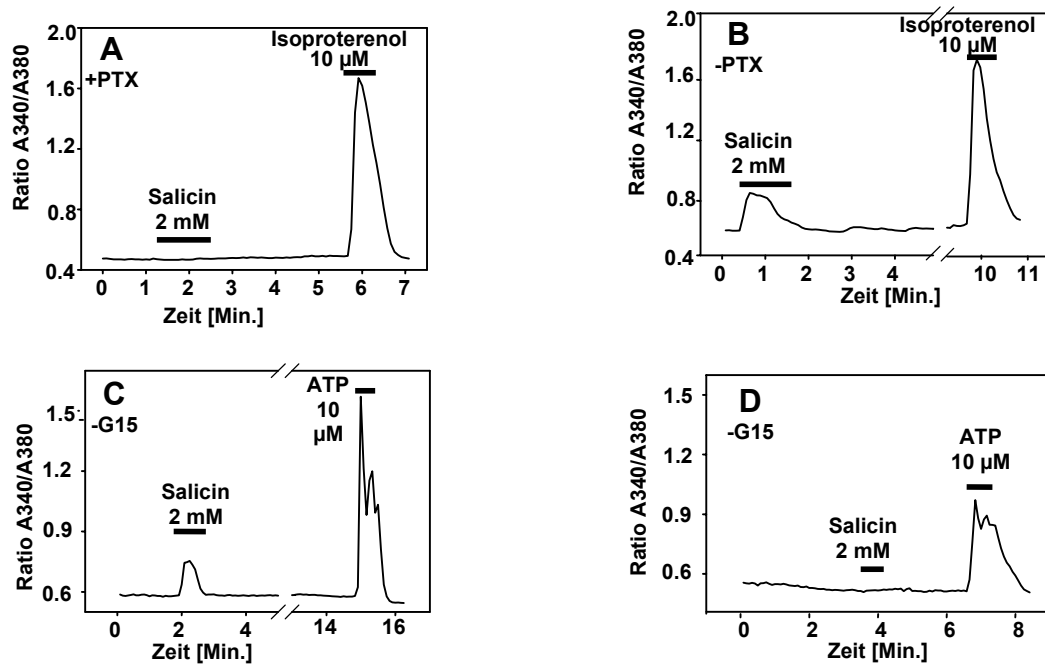


Abb. 3.18 Untersuchungen zur Signaltransduktion von hTAS2R16

A: Mit hTAS2R16-DNA transfizierte HEK293-G_{α15} Zellen, nach einer 2-stündigen Inkubation mit 1 μM Pertussis Toxin (PTX) zeigen keine Signale mehr auf eine Stimulation mit Salicin. Die Signalantwort auf Isoproterenol ist dagegen nicht verändert B: Mit hTAS2R16-DNA transfizierte HEK293-G_{α15} Kontrollzellen ohne PTX Inkubation zeigen dagegen ein deutliches Salicin Signal. C: hTAS2R16-DNA transfizierte HEK293 Zellen ohne G_{α15} zeigen ebenfalls ein deutliches Salicin Signal. Antwort von 5 aus 38 analysierten Zellen. D: nicht transfizierte HEK293 Zellen ohne G_{α15} zeigen dagegen kein Salicin Signal. Antwort von 10 aus 40 analysierten Zellen. Da in HEK293 Zellen ohne G_{α15} eine Aktivierung des β-adrenergen Rezeptors durch Isoproterenol keine Ca²⁺ Signale auslöst, wurde in Experimenten C+ D als Positivkontrolle ATP benutzt. Dies aktiviert in den Zellen endogen exprimierte Adenosinrezeptoren.

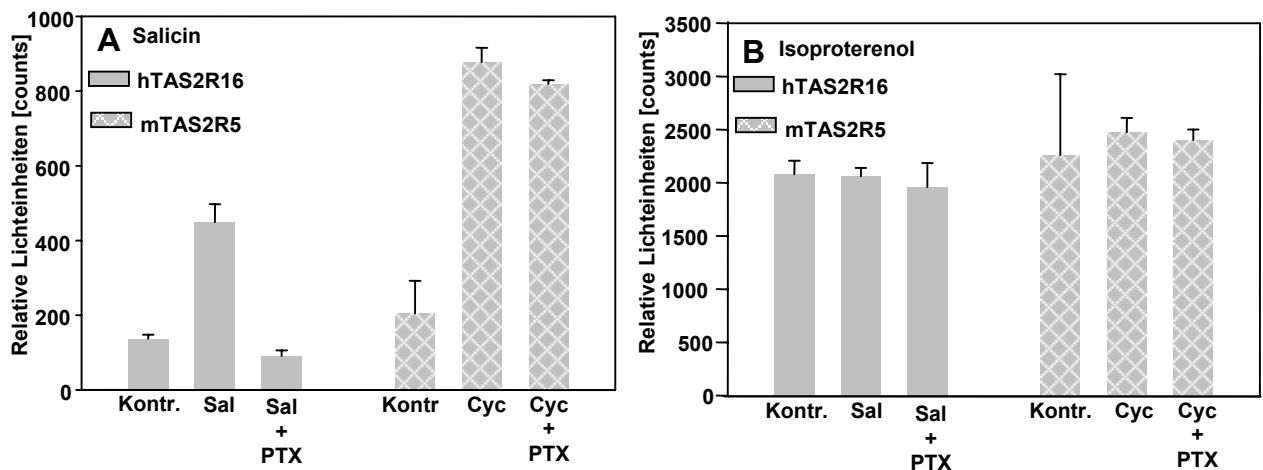


Abb. 3.19 Vergleich der Wirkung von Pertussis Toxin auf das mTAS2R5 und hTAS2R16 Signal

A: hTAS2R16 bzw. mTAS2R5-DNA transfizierte HEK293-G_{α15} Zellen nach einer 2-stündigen Inkubation mit 1 μM Pertussis Toxin (PTX). hTAS2R16-DNA transfizierte Zellen zeigen keine Signale nach Stimulation mit 10 mM Salicin (Sal) während die Signalantwort von mit mTAS2R5-DNA transfizierten Zellen nach Stimulation mit 10 μM Cycloheximid (Cyc) durch Pertussis Toxin nicht beeinflusst wird. Kontr.: Signal von mit rezeptorlosem Plasmid transfizierten Zellen nach Applikation von 10 mM Salicin (Sal) bzw. 10 μM Cycloheximid (Cyc). B: Die Isoproterenolsignale derselben Zellen werden dagegen nicht von Pertussis Toxin beeinflusst. Die einzelnen Balken sind Mittelwerte von je 3 Messlöchern.

3.14 Vergleichende Analyse der hTAS2R16 Aminosäuresequenzen mit anderen humanen TAS2R-Rezeptoren

Trotz der hohen Divergenz zwischen den TAS2R-Rezeptoren zeigt die Analyse von hTAS2R16 und den anderer TAS2R-Rezeptoren einige Gemeinsamkeiten (Tabelle 3.8 + Abb. 4.3). So sind die Transmembrandomänen (TM) und die intrazellulären Schleifen deutlich stärker konserviert, als die extrazellulären Schleifen. Insbesondere in der extrazellulären Schleife zwischen der TM4 und TM5 befindet sich eine hypervariable Region, in der die Sequenzdivergenz zwischen den einzelnen Rezeptoren besonders stark ist. Überraschenderweise sagen Analysen mit dem Programm PredictProtein trotz dieser starken Variabilität in 22 der TAS2R-Rezeptoren in dieser Region ein Asn-Glykosylierungsmotiv vorher (Ausnahmen: TAS2R44 + 41). Weiterhin wird mit Ausnahme von TAS2R38, TAS2R44 und TAS2R16 für alle Rezeptoren ein putatives Myristoylierungsmotiv in TM1 vorhergesagt. Von 24 analysierten Rezeptoren besitzen 18 mindestens ein intrazelluläres Caseinkinase 2 (CK2) Phosphorylierungsmotiv (Ausnahme: TAS2R1, 7, 16, 39, 40, 44). Von diesen haben 15 das CK2 Motiv in der intrazellulären Schleife zwischen TM1 und TM2. Für 21 Rezeptoren wird mindestens ein intrazelluläres Proteinkinase C Phosphorylierungsmotiv vorhergesagt (Ausnahme TAS2R3, 9, 42). Das PKC Motiv befindet sich bei 15 von 21 Rezeptoren in der intrazellulären Schleife zwischen TM5 und TM6.

3.14 Vergleichende Analyse der hTAS2R16 Aminosäuresequenzen mit anderen humanen TAS2R-Rezeptoren

Tabelle 3.8 Vorhergesagte Transmembrandomänen und Rezeptormotive

Rezeptor	Aminosäureposition der Transmembrandomänen							Motive + Aminosäureposition		
	TM 1	TM 2	TM 3	TM 4	TM 5	TM 6	TM 7	Phosphorylierung	Glykosylierung	Myristoylierung
TAS2R1	7 - 36	60 - 87	93 - 110	125 - 143	183 - 202	221 - 243	254 - 272	PKC Phos 109 SVR	Asn Glyc 163 NATI	Myrist 20 GIFTNG
TAS2R3	8 - 30	43 - 63	97 - 115	129 - 149	189 - 208	235 - 255	271 - 291	CK2 Phos 42 SLSD 220 SSRD	Asn Glyc 166 NVTE	Myrist 14 GTQFTL 20 GILVNC
TAS2R4	4 - 30	47 - 71	76 - 108	132 - 150	173 - 200	227 - 248	253 - 279	PKC Phos 38 SHR 44 SDR 126 SPK 202 SLR 290 TAK CK2 Phos 42 SSSD	Asn Glyc 164 NNTS 169 NISE	Myrist 20 GIIMNL
TAS2R5	4 - 32	43 - 75	83 - 102	125 - 148	176 - 196	223 - 244	251 - 276	PKC Phos 31 SFR CK2 Phos 31 SFRE 108 TTFD	Asn Glyc 155 NSSI	Myrist 20 GLIGNG
TAS2R7	12 - 36	56 - 76	91 - 109	129 - 147	190 - 208	236 - 256	265 - 288	PKC Phos 207 SLR 296 SLK	Asn Glyc 167 NLTW 175 NKTQ	Myrist 20 GILGNA 28 GLVNCM
TAS2R8	8 - 33	53 - 71	83 - 109	126 - 147	188 - 209	237 - 256	265 - 289	PKC Phos 301 TCR CK2 Phos 42 STVD	Asn Glyc 167 NITE	Myrist 20 GILGNG
TAS2R9	7 - 33	56 - 77	94 - 122	129 - 146	187 - 206	230 - 249	262 - 285	CK2 Phos 42 SLID	Asn Glyc 164 NITW 93 NNSS 113 NISH	Myrist 20 GIWGNG
TAS2R10	8 - 26	42 - 62	83 - 108	127 - 148	183 - 201	228 - 247	257 - 279	PKC Phos 288 SLR CK2 Phos 217 SNTE	Asn Glyc 158 NTDV	Myrist 20 GVLGNG

TAS2R13	4 - 30	56 - 77	97 - 122	129 - 152	186 - 206	233 - 253	256 - 284	PKC Phos 37 SRK CK2 Phos 37 SRKE 42 SSVD	Asn Glyc 162 NTTW 166 NFSM	Myrist 20 GNLSNG
TAS2R14	8 - 33	58 - 75	91 - 109	129 - 148	185 - 206	233 - 252	260 - 283	PKC Phos 215 TVK 223 STK CK2 Phos 42 SSVD	Asn Glyc 153 NASI 162 NKTC 171 NFTR	Myrist 3 GVIKSI 20 GNLGNS
TAS2R16	8 - 33	44 - 72	87 - 105	125 - 146	183 - 204	228 - 248	256 - 280	PKC Phos 217 SMK	Asn Glyc 163 NSTV 79 NLTJ	
TAS2R38	17 - 38	57 - 78	94 - 122	143 - 163	195 - 221	250 - 272	277 - 299	PKC Phos 137 SRK 226 TMK 318 SLK CK2 Phos 51 SNSD	Asn Glyc 178 NNTR	
TAS2R39	31 - 51	75 - 92	118 - 137	162 - 184	210 - 235	264 - 281	290 - 313	PKC Phos 72 SGR 234 SLK	Asn Glyc 185 NNSF 194 NSTK	
TAS2R40	24 - 45	68 - 87	95 - 114	137 - 156	200 - 220	251 - 271	283 - 307	PKC Phos 219 SLK 238 SMK	Asn Glyc 170 NSSI 179 NSTE	Myrist 32 GILGSG 44 GAEWAR
TAS2R41	7 - 31	46 - 64	91 - 109	133 - 151	186 - 207	236 - 255	270 - 286	PKC Phos 119 TYK 133 SLK CK2 Phos 124 TRIE		Myrist 12 GTVHNF
TAS2R42	8 - 30	46 - 64	94 - 112	128 - 148	190 - 208		265 - 287	CK2 Phos 29 TELD	Asn Glyc 189 NLTL	Myrist 6 GLIVNL
TAS2R43	4 - 23	56 - 75	94 - 119	128 - 149	185 - 203	227 - 250	259 - 282	PKC Phos 220 STK CK2 Phos 42 SFAD	Asn Glyc 161 NMTW 176 NMTV	Myrist 20 GNFANG
TAS2R44	4 - 30	56 - 75	87 - 108	127 - 147	185 - 203	227 - 247	259 - 282	PKC Phos 113 TWK		
TAS2R45	4 - 23	56 - 75	99 - 119	128 - 149	185 - 203	227 - 247	259 - 282	PKC Phos 220 STK CK2 Phos 42 SFAD	Asn Glyc 161 NMTW	Myrist 20 GNFANG
TAS2R46	4 - 23	47 - 71	88 - 108	128 - 149	185 - 203	227 - 250	260 - 281	PKC Phos 220 SMK CK2 Phos 42 SFAD	Asn Glyc 161 NMTW 176 NTTV	Myrist 20 GNFANG
TAS2R47	7 - 30	48 - 64	88 - 108	127 - 145	185 - 203	231 - 249	260 - 281	PKC Phos 220 STK 205 SLR CK2 Phos 42 SFVD	Asn Glyc 161 NVTW 176 NMTL	Myrist 20 GNFANG
TAS2R48	2 - 20	56 - 75	93 - 111	127 - 149	185 - 203	227 - 250	259 - 283	PKC Phos 38 TRK 220 STK 283 SRK CK2 Phos 42 SSAE	Asn Glyc 161 NVTW	Myrist 20 GNVANG
TAS2R49	7 - 30	47 - 71	94 - 111	128 - 146	185 - 203	227 - 250	259 - 282	PKC Phos 220 STK 285 TLK CK2 Phos 42 SSAD	Asn Glyc 161 NVTW 176 NLTV	Myrist 20 GNFANG
TAS2R50	4 - 24	56 - 75	89 - 108	128 - 149	185 - 203	227 - 250	259 - 281	PKC Phos 220 STK 285 TLK CK2 Phos 42 SSAD	Asn Glyc 161 NMTG	Myrist 20 GNFANG

TM: putative Transmembrandomänen, Asn Glyc: Asn Glykosylierung, PKC Phos: Phosphorylierung durch Proteinkinase C, CK2 Phos: Phosphorylierung durch Caseinkinase 2, Myrist: Myristoylierungsmotiv.

3.15 Analyse der SNP Datenbank des Humanen Genomprojektes

Die Gene jedes Individuums weisen häufig an einigen Nukleinsäurepositionen Variationen der DNA Sequenz, so genannte "Single Nucleotide Polymorphisms" (SNPs) auf. Eine Analyse der SNP Datenbank des Humanen Genomprojektes ergab für die menschlichen TAS2R-Rezeptoren eine Vielzahl von SNPs im kodierenden Bereich (Tabelle 3.9). So wurde in 24 analysierten humanen TAS2R-Rezeptoren insgesamt 77 SNPs identifiziert. Davon führen 54 zu einem Aminosäureaustausch. Von diesen haben mindestens 10 eine Allelfrequenz von mehr als 10% und sind daher relativ häufig. Für die Rezeptoren TAS2R44, TAS2R45 und TAS2R46 SNPs identifiziert, die ein Stopkodon verursacht und so den Leserahmen dieser Gene vorzeitig unterbrechen. Für den Rezeptor hTAS2R39 ist ein SNP identifiziert worden, der den Leserahmen verschiebt und somit ebenfalls zum Funktionsausfall des Rezeptors führt.

Tabelle 3.9 Bekannte SNPs der humanen TAS2R-Rezeptoren

Gen + Accessionnr.	SNP Name	Austausch		Position		Allelfrequenz
		Base	Aminosäure	Basenpaare	Aminosäure	
hTAS2R1 NM019599	rs2234231	C/T	P/L	128	43	unbekannt
	rs41469	G/A	R/H	332	111	A 0.46/G 0.54
	rs223432	G/A	C/Y	422	141	unbekannt
	rs2234233	C/T	R/W	616	206	C 0.87/T 0.13
	rs2234234	C/T	S/S	675	225	unbekannt
	rs2234235	T/C	L/L	850	284	unbekannt
hTAS2R3 NM016943	rs227009	C/T	G/G	807	369	unbekannt
hTAS2R4 NM016944	ss3181498	G/A	R/Q	8	3	unbekannt
	rs2233996	G/C	R/R	9	3	unbekannt
	rs2233997	A/C	Y/C	17	6	unbekannt
	rs2233998	T/C	F/S	20	7	unbekannt
	rs2233999	T/A	F/L	186	62	unbekannt
	rs2234000	C/T	T/M	221	74	C 0.94/T 0.56
	rs2234001	G/C	V/L	286	96	C 0.78/G 0.22
	rs2234002	G/A	S/N	512	171	A 0.78/ G 0.22
hTAS2R5 NM018980	rs2234003	A/G	I/V	571	191	unbekannt
	rs2234013	G/A	G/S	58	20	unbekannt
	rs2227264	G/T	S/I	77	26	unbekannt
	rs2234014	C/T	P/L	338	113	unbekannt
	rs2234015	G/A	R/Q	638	213	unbekannt
hTAS2R7 NM023919	rs2234016	G/T	R/L	294	881	unbekannt
	rs3759251	A/T	T/S	787	263	A 0.97/T 0.03
	rs3759252	C/A	I/I	828	276	unbekannt
	rs619381	G/A	M/I	912	304	unbekannt
hTAS2R8 NM023918	ss2391467	G/A	L/L	549	183	unbekannt
	rs2537817	A/G	M/V	922	308	unbekannt
hTAS2R9 NM23917	rs3741845	T/C	V/A	560	187	C 0.73/T 0.27
	rs3944035	C/T	L/F	910	304	unbekannt
	rs2159903	C/T	P/L	926	309	unbekannt
hTAS2R10 NM23921	rs597468	C/T	T/M	467	156	unbekannt
hTAS2R13 NM23920	ss1478988	A/G	N/S	776	259	C 0.73/T 0.27
hTAS2R14 NM23922	rs3741843	G/A	R/R	375	125	A 0.97/G 0.03
hTAS2R16 NM016945	rs2233988	C/T	T/T	300	100	unbekannt
	rs2692396	G/C	V/V	303	101	unbekannt
	rs2233989	T/C	L/L	460	154	unbekannt
	rs846664	T/G	N/K	516	172	A 0.71/C 0.29
	rs860170	G/A	R/H	665	222	A 0.55/G 0.45
hTAS2R38 AF494321	rs1726866	T/C	V/A	785	262	unbekannt
	rs713598	C/T	A/P	49	145	C 0.60/G 0.40
	hTAS2R38 SNP1	A/T	N/I	557	186	unbekannt

hTAS2R39 AF494230	<u>hTAS2R39 SNP1</u>	A/AA	Leserahmen verschoben	967	323	unbekannt
hTAS2R40 AF494229	keine SNPs bekannt	---	---	---	---	---
hTAS2R41 AF494232	rs1404635	A/G	T/T	189	64	unbekannt
	<u>hTAS2R41 SNP1</u>	T/C	L/P	380	127	unbekannt
	<u>hTAS2R41 SNP2</u>	A/G	S/S	885	295	unbekannt
hTAS2R42 AX097739	rs1650017	G/C	A/P	931	311	unbekannt
	rs1669411	T/C	N/N	930	310	unbekannt
	rs1669412	G/A	R/Q	875	292	unbekannt
	rs1451772	A/G	Y/C	794	265	unbekannt
	rs1669413	G/T	G/W	763	255	unbekannt
	rs1650019	A/G	L/L	561	187	unbekannt
hTAS2R43 AF494237	rs3759246	G/C	R/T	893	298	unbekannt
	<u>hTAS2R43 SNP1</u>	C/G	S/W	104	35	unbekannt
	<u>hTAS2R43 SNP2</u>	G/A	R/H	635	212	unbekannt
	<u>hTAS2R43 SNP3</u>	G/C	T/T	663	221	unbekannt
hTAS2R44 AF494228	rs3759247	G/A	W/ Stop	900	300	unbekannt
	rs3759246	G/C	R/T	893	298	unbekannt
	<u>hTAS2R44 SNP1</u>	A/T	M/L	162	484	unbekannt
	<u>hTAS2R44 SNP2</u>	T/A	F/Y	869	290	unbekannt
	<u>hTAS2R44 SNP3</u>	G/A	V/M	899	297	unbekannt
hTAS2R45 AF494226	rs3759247	A/G	G/ Stop	900	300	unbekannt
	rs3759246	G/C	R/T	893	298	unbekannt
	rs3759245	C/T	R/C	712	238	unbekannt
	rs3759244	T/C	F/L	703	235	unbekannt
hTAS2R46 AF494227	rs2708381	G/A	W/ Stop	749	250	unbekannt
	rs2708380	T/A	L/M	682	228	unbekannt
	rs2598002	T/G	F/V	106	36	unbekannt
	<u>hTAS2R46 SNP1</u>	A/T	Q/H	888	296	unbekannt
	<u>hTAS2R46 SNP2</u>	A/G	M/V	889	297	unbekannt
	<u>hTAS2R46 SNP3</u>	T/C	F/F	108	36	unbekannt
hTAS2R47 AF494233	rs2597924	G/A	R/H	920	307	unbekannt
	rs1669405	T/G	L/W	842	281	unbekannt
	rs2599404	T/G	F/L	756	252	unbekannt
	rs2600355	T/G	V/V	54	18	unbekannt
hTAS2R48 AF494234	rs1868769	T/C	L/L	418	140	unbekannt
hTAS2R49 AF494236	<u>hTAS2R49 SNP1</u>	A/G	K/R	164	55	unbekannt
hTAS2R50 AF494235	rs1376521	A/G	Y/C	608	203	G 0.66/ A0.34
	<u>hTAS2R50 SNP1</u>	A/G	P/P	777	259	unbekannt

Unterstrichene SNPs wurden mehrfach beobachtet. Bei den Klonierungsarbeiten wurden einige SNPs beobachtet, die noch nicht in der Datenbank eingetragen sind. Diese wurden Durch Rezeptorname + SNP + Nummer gekennzeichnet (z. B. hTAS2R50 SNP1).

Die Analyse des hTAS2R16 Gens in der SNP Datenbank des Humanen Genomprojektes ergab fünf eingetragene SNPs (Tabelle 3.8 + Abb. 3.20). Die ersten drei sind konservative SNPs, d. h. sie führen nicht zu einem Aminosäureaustausch. Der vierte SNP an Position 516 führt zum Austausch Asparagin 172 (Asn) gegen Lysin (Lys). Der Austausch liegt in der extrazellulären Schleife zwischen Transmembranregion 4 und 5 (Abb. 3.20). Die Häufigkeit dieses SNP Allels wird mit 54,7% A, 45,3% G angegeben. Auch der fünfte SNP bei Base 665 führt zum Austausch der eines Arginins 222 (Arg) gegen ein Histidin (His). Der Austausch liegt in der dritten intrazellulären Schleife zwischen TM5 und TM6 (Abb. 3.20). Die Allelfrequenz wird mit A 70,6% und C 29,4% angegeben. Die Daten des Genomprojektes bestätigen die Existenz des von uns gefundenen SNPs an Position 665 der kodierenden Region. Da diese beiden SNPs zum Aminosäureaustausch führen, könnten sie die Rezeptorfunktion beeinflussen.

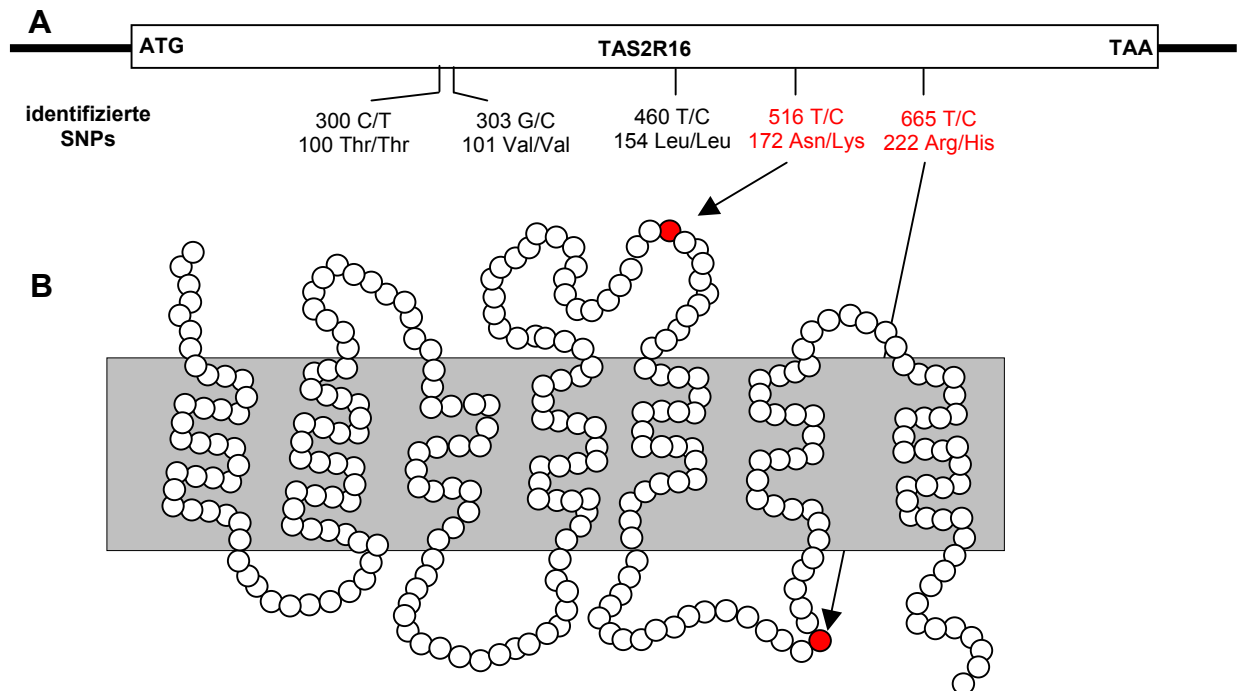


Abb. 3.20 Bekannte Variationen des TAS2R16 Gens

A: Identifizierte Variationen des TAS2R16 Gens mit Angabe der Nukleotid- und Aminosäureposition. Rot: Genvariationen die zu Aminosäureaustausch führen. B: Schematische Abbildung des Rezeptorproteins in der Membran. Rot: Position der von Genvariationen betroffenen Aminosäure.

3.16 Korrelation menschlicher Salicinschwellewerte mit hTAS2R16 Genvariationen

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass TAS2R16 den Bitterrezeptor zur Detektion von Salicin und verwandten bitteren β -Glykosiden darstellt. Allerdings sind viele der bislang vorgelegten Befunde nur indirekte Beweise, die auf einer sehr guten Korrelation der *in vitro* Messergebnisse mit entsprechenden Befunden beim Menschen beruhen. Ein unabhängiger Beleg dafür, dass hTAS2R16 der menschliche Salicinrezeptor ist, könnte erbracht werden, indem man zeigt, dass menschlichen Probanden mit einem veränderten hTAS2R16-Gen, auch eine veränderte Wahrnehmung von Salicin besitzen.

In Kapitel 3.15 wurde gezeigt, dass auch das hTAS2R16 Gen Variationen aufweist. Daher ist es möglich, dass ein Teil der menschlichen Populationen eine Variante des TAS2R16 Rezeptors mit veränderter Funktion besitzt. Deshalb wurde in einer Pilotstudie versucht, Personen zu identifizieren, die Veränderungen in der Wahrnehmung des Bittergeschmacks von Salicin aufweisen. Bei diesen Personen sollte untersucht werden, ob die veränderte Wahrnehmung von Salicin durch Variationen des TAS2R16 Gens verursacht wird. SNPs kommen natürlich in vielen Genen vor. Deshalb ist es denkbar, dass ein SNP in einem anderen für den Bittergeschmack notwendigen Gen, wie z. B. dem G-Protein Gustducin ebenfalls zu einer veränderten Wahrnehmung von Bitterstoffen führen kann. Auch andere Faktoren, wie Alter, Ernährungsgewohnheiten oder Erkrankungen können natürlich auch einen Einfluss auf die Bittersensitivität von Probanden ausüben [Drewnowski, 1997; Schiffman, 1993a]. Um die Probanden auf solche Effekte hin zu kontrollieren, wurde in den psychophysikalischen Experimenten nicht nur der Schwellwert von Salicin, sondern als Kontrolle auch der Schwellwert von Denatonium bestimmt. Genetische Analysen wurden nur bei Probanden durchgeführt, die eine normale Denatoniumsensitivität aufwiesen. In einer Pilotstudie mit 60 untrainierten Probanden wurde eine Bestimmung des Wahrnehmungsschwellwerte für Salicin durchgeführt. Bei allen 60 getesteten Probanden gab es keine

Auffälligkeiten für den Denatoniumschwellewert. Für Salicin wurden dagegen Variationen des Schwellwertes beobachtet. 51 Probanden hatten einen Schwellwert von ~0,2 mM. Vier Probanden erwiesen sich als Salicin hyposensitiv, da sie einen vierfach höheren Schwellwert von ca. 0,8 mM besaßen. Fünf weitere Probanden wurden als Salicin hypersensitiv klassifiziert, da sie einen fünffach niedrigeren Schwellwert von ca. 0,04 mM besaßen. Von allen Hyper- und Hyposalicinschmeckern sowie von vier zufällig ausgewählten Normalschmeckern wurde jeweils genomische DNA gewonnen und die Sequenz der kodierenden Region des TAS2R16 Gens analysiert. Für den Salicin hypersensitiven Phänotyp wurde kein gemeinsamer SNP in der kodierenden Region gefunden. Der hyposensitiven Phänotyp von Probanden korreliert dagegen mit einem G/A SNP bei 665 bp (Tabelle 3.10). Alle hyposensitiven Probanden sind in dieser Position homozygot A, während der Rest der Probanden einen heterozygoten Genotyp besitzt. Dieser SNP führt zum Austausch eines Arginins (Arg) gegen ein Histidin (His) in der intrazellulären Schleife zwischen Transmembranregion 5 und 6 (Abb. 3.20). Weitere SNPs wurden in den Proben nicht beobachtet.

Tabelle 3.10 Geno- und Phänotyp der 12 analysierten Probanden

Proband Nummer	Salicin-Sensitivität	Genotyp
9	normal	665 heterozygote G/A
8	normal	665 heterozygote G/A
6	normal	665 heterozygote G/A
3	normal	665 heterozygote G/A
2	hyposensitiv	665 homozygote A
4	hyposensitiv	665 homozygote A
11	hyposensitiv	665 homozygote A
5	hyposensitiv	665 homozygote A
1	hypersensitiv	665 heterozygote G/A
7	hypersensitiv	665 heterozygote G/A
10	hypersensitiv	665 heterozygote G/A
12	unsicher*	665 homozygote A

*wurde zuerst als hypersensitiv klassifiziert. Nach erfolgter Sequenzanalyse wurde mit allen Probanden die Schwellwertbestimmung wiederholt. Bei Proband 12 änderte sich die Klassifikation von hypersensitiv auf einen Wert zwischen normalsensitiv und hyposensitiv. Die Klassifikation aller anderen Probanden wurde bestätigt.

4. Diskussion

4.1 Ergebnisse der Genomanalyse

4.1.1 Zahl der TAS2R-Gene

Die Analyse der Datenbank des humanen Genomprojektes ergab eine Zahl von 24 TAS2R-Rezeptorgenen und 15 Pseudogenen (Kapitel 3.1). Die Existenz der identifizierten 24 Gene wurde durch Klonierung von PCR-Produkten aus genomischer DNA, sowie ihrer Sequenzierung bestätigt. Diese wird im Wesentlichen durch den Vergleich der hier beschriebenen Rezeptoren mit einer kürzlich publizierten Sequenzanalyse bestätigt [Conte, 2002]. Allerdings ist dort ein zusätzlicher TAS2R-Rezeptor auf Chromosom 7 beschrieben (hTAS2R60: Datenbanknummer: NM_177437). Dessen Sequenz besaß in früheren Versionen der Datenbank des humanen Genomprojektes eine Stopcodon und wurde in dieser Arbeit als Pseudogen klassifiziert. Eigene Klonierungsarbeiten sowie die Tatsache, dass in der aktuellen Version des humanen Genomprojektes die Rezeptorsequenz korrigiert wurde, bestätigen die Existenz des von Conte et al. beschriebenen weiteren TAS2R-Rezeptor-Gens. Da das Genomprojekt weitgehend fertig gestellt ist, muss es sich bei diesen 25 Rezeptoren um nahezu alle menschlichen TAS2R-Rezeptorgene handeln. Da es noch einige Lücken im Genomprojekt gibt [Bork, 2001], kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die Sequenzinformation für den einen oder anderen TAS2R-Rezeptor noch fehlt. Weiterhin wurden die TAS2R-Gene, deren Leserahmen unterbrochen ist, nur anhand der Datenbankinformation als Pseudogene klassifiziert. Eine experimentelle Bestätigung dieser Klassifikation, durch Klonierung und Sequenzierung der Pseudogene, erfolgte bisher nur für hTAS2R ψ P4 und hTAS2R ψ P5. Statistisch gesehen weist die Datenbank des Genomprojektes weisen nur alle 10 000 bp einen Sequenzierfehler auf [Bork, 2001]. Trotzdem wäre es möglich, dass weitere TAS2R-Gene, wie bei TAS2R60 geschehen, aufgrund von Sequenzierfehlern des humanen Genoms zu unrecht als Pseudogen klassifiziert worden sind. Es wurden auch mehrere Polymorphismen (SNPs) beobachtet, die Stopcodons verursachen und so einen funktionellen Rezeptor in ein Pseudogen verwandeln (Kapitel 3.15). Daher ist auch der umgekehrte Fall denkbar, dass in manchen Personen aus einem Pseudogen aufgrund eines SNPs ein funktioneller Rezeptor wird. Aufgrund dieser Faktoren ist es möglich, dass sich die Gesamtzahl der TAS2R-Rezeptoren noch geringfügig erhöht.

4.1.2 Chromosomale Lokalisation der TAS2R-Gene

TAS2R-Gene sind ausschließlich auf den Chromosomen 5, 7 und 12 lokalisiert (Abb. 3.1). Schon diese Lage ist ein starkes Indiz dafür, dass es sich bei den TAS2R-Rezeptoren um Bitterrezeptoren handelt. Auf allen Chromosomen, die TAS2R-Rezeptorgene enthalten, wurden durch Kartierungen anhand von Genmarkern verschiedene „Bitterloci“ beschrieben [Adler, 2000]. So liegt ein Genlocus zur Wahrnehmung des Bitterstoffes PROP auf Chromosom 7, in der Region des hTAS2R38 Gens, [Kim, 2003; Guo, 2001]. Ein weiterer PROP-Genlocus wurde auf Chromosom 5p15, genau dort, wo hTAS2R1 lokalisiert ist, beschrieben [Reed, 1999]. Die menschlichen Bitterrezeptoren auf Chromosom 12 liegen in der Region

12p13.31-32. Der zu dieser Region syntene Locus der Maus liegt am distalen Ende von Maus Chromosom 6 [Gregory, 2002; Adler, 2000]. Dort sind auch in der Maus viele TAS2R-Rezeptorgene lokalisiert [Adler, 2000]. In diesem Bereich wurden in der Maus Genloci für die Bitterstoffe Cycloheximid, Chinin, Raffinoseundeakaacetat und Saccharoseoktaacetat kartiert [Capeless, 1992; Lush, 1995; Lush, 1988; Lush, 1986; Lush, 1984; Lush, 1981].

4.1.3 Evolution der TAS2R-Gene

Mit Ausnahme von hTAS2R1 liegen alle hTAS2R-Rezeptorgene in Gruppen vor (Abb. 3.1). Alle Rezeptorgene, die auf Chromosom 12 liegen, zeigen untereinander eine größere Sequenzhomologie als zu Rezeptoren von Chromosom 7 und 5 (Tab. 3.1). Die Mitglieder der Unterfamilie TAS2R43 - TAS2R50 weisen im Vergleich zu den anderen TAS2R-Rezeptoren eine außergewöhnlich hohe Sequenzhomologie von ~70 - 90% auf (Abb. 3.2). Sie liegen hintereinander auf demselben Abschnitt von Chromosom 12. Diese Beobachtungen sind starke Indizien dafür, dass die TAS2R-Genfamilie durch eine Reihe von Genduplikations- und Translokationsereignissen entstanden ist. Für die mit den TAS2R-Rezeptoren entfernt verwandten olfaktorischen Rezeptoren [Adler, 2000] wurden solche Mechanismen beschrieben [Young, 2002a; Young, 2002b]. Die Tatsache, dass die TAS2R-Gene auf Chromosom 12 untereinander eine Identität von 46 % aufweisen, während sie mit den Rezeptoren von Chromosom 7 und 5 nur zu 26 % identisch sind, ist wahrscheinlich darauf zurück zu führen, dass die TAS2R-Rezeptoren auf Chromosom 12 jünger sind, als die Rezeptoren von Chromosom 7 und 5. Die hohe Sequenzhomologie zwischen den Mitgliedern der Unterfamilie TAS2R43 -TAS2R50 zeigt, dass es sich hier um jüngste Unterfamilie der menschlichen TAS2R-Rezeptoren handelt.

Der Vergleich menschlicher TAS2R-Gene mit entsprechenden Sequenzen von Nagern zeigt, dass die meisten dieser Rezeptoren nur eine geringe Sequenzverwandtschaft zu Rezeptoren der jeweils anderen Spezies besitzen (Abb. 3.3). So ist nur für wenige menschliche Rezeptoren eine eindeutige Zuordnung zu einem entsprechenden Rezeptor von Nagern möglich. Meist zeigt ein Rezeptor der einen Spezies Homologie zu einer ganzen Rezeptorgruppe der anderen Spezies (Abb. 3.3). In Analogie zu den olfaktorischen Rezeptoren lässt sich auch diese Beobachtung am besten durch Genduplikations und/oder Genkonversionsereignisse [Young, 2002a] nach der evolutionären Trennung von Nagern und Primaten vor ca. 96 Millionen Jahren [Nei, 2001] erklären. Bei Maus und Ratte, deren Evolution erst seit ca. 33 Millionen Jahren getrennt verläuft [Nei, 2001], kann jedem Rezeptor der Ratte ein eindeutig sequenzverwandter Rezeptor der Maus zugeordnet werden (Abb. 3.3). Die Sequenzdivergenz der Rezeptoren von Nagern und Mensch (Abb. 3.3), sowie die große Zahl menschlicher Pseudogene (Abb. 3.1), führen zu der Vermutung, dass die molekulare Evolution der TAS2R-Rezeptoren überdurchschnittlich schnell verläuft. Die so genannte Evolutionsperioden-Regel (UEP-Regel) erlaubt eine grobe Abschätzung der durchschnittlich zu erwartenden Sequenzunterschiede aufgrund einer getrennten Evolution. Die UEP-Regel besagt, dass pro 10 Millionen Jahre getrennter Evolution durchschnittlich ca. 1% Änderung der Aminosäuresequenz zu erwartet ist, wenn das gleiche Protein in zwei getrennten Spezies vorkommt [Wilson, 1977]. Nager weisen, vermutlich aufgrund ihrer kurzen Generationszeit, eine

doppelt so schnelle molekulare Evolution auf [Adkins, 2001; Ohta, 1993], daher sind ca. 2% Änderung der Aminosäuresequenz je 10 Millionen Jahre getrennter Evolution erwarten. Aufgrund der Trennung von Maus und Mensch vor ca. 96 Millionen Jahren ist für ein beliebiges Protein, das in beiden Spezies vorkommt, eine Änderung von ca. 20% der Aminosäuresequenz zu erwarten. Der Vergleich des Konservierungsgrades, einiger zufällig ausgewählter G-Protein gekoppelter Rezeptoren, bestätigt diese Erwartungen. So zeigen der Dopaminrezeptor D4, der β -adrenerge Rezeptor 3 und der Somatostatinrezeptor 1 zwischen Maus und Mensch eine durchschnittliche Sequenzidentität von ca. 85% (Tab. 4.1). Auch die Sequenzhomologie der mit den TAS2R-Rezeptoren entfernt verwandten olfaktorischen Rezeptoren liegt zwischen Maus und Mensch noch bei 73% [Glusman, 2001]. Vergleicht man die sequenzhomologen Paare der TAS2R-Rezeptoren von Maus und Mensch, so zeigen diese nur eine reduzierte Sequenzidentität von durchschnittlich 55% (Tab. 4.1). Dies spricht für eine schnelle molekulare Evolution der TAS2R-Rezeptoren. Auch Sequenzvergleiche der TAS2R-Rezeptoren von Ratte und Maus bestätigen diese Beobachtung. Aufgrund der Trennung vor 33 Millionen Jahren würde man eine Sequenzdivergenz von 6-7% erwarten. Tatsächlich liegt sie jedoch bei durchschnittlich 14% (Tab. 4.1).

Dieses Ergebnis lässt sich vielleicht durch folgende Hypothese erklären: Eine wichtige Funktion des Bittergeschmacks ist die Warnung vor Giftstoffen in Nahrungsmitteln [Lindemann, 1996]. Werden toxische Stoffe in Nahrungsmitteln nicht erkannt, kann dies zum Tod führen. Folglich haben Individuen, die eine solche Substanz wahrnehmen, einen starken Selektionsvorteil. Da sich die Nahrungsspektren von Nagern und Menschen unterscheiden [Laska, 2002], sollten in der Nahrung der beiden Spezies auch zum Teil unterschiedliche Giftstoffe enthalten sein. Da es für das Überleben beider Arten wichtig ist, die für sie relevanten Stoffe zu erkennen, führt dies zu einer schnellen Anpassung der TAS2R-Rezeptoren an die Giftstoffe des jeweiligen Nahrungsspektrums. Dieser Mechanismus könnte für die hohe Sequenzdivergenz der TAS2R-Rezeptorgene verantwortlich sein. Die Hypothese, der schnellen Evolution von TAS2R-Rezeptoren durch positive Selektion wird auch durch eine im Mai 2003 erschienene Arbeit bestätigt [Shi, 2003].

Die oben genannte Hypothese impliziert, dass die stark strukturverwandten Rezeptoren von Maus und Ratte durch identische oder ähnliche Substanzen aktiviert werden können. Im Gegensatz dazu sollten die entfernt verwandten Rezeptoren des Menschen durch andere Liganden aktiviert werden. Für die Rezeptoren mTAS2R5, rTAS2R9 und hTAS2R10 konnte dies in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Der Rezeptor mTAS2R5 reagiert auf Cycloheximid [Chandrashekar, 2000]. Der orthologe Rezeptor der Ratte rTAS2R9 (Abb. 3.3) reagiert ebenfalls auf Cycloheximid (Kapitel 3.10). Der zu rTAS2R9 und mTAS2R5 am engsten sequenzverwandte Rezeptor des Menschen, hTAS2R10 (Abb. 3.3), wird dagegen durch Strychnin, nicht jedoch durch Cycloheximid aktiviert (Kapitel 3.10 + 3.11). Dies zeigt, dass die orthologen Rezeptoren der Maus und Ratte auch durch identische Substanzen aktiviert werden. Der entsprechende Rezeptor des Menschen hat dagegen schon andere funktionelle Eigenschaften. Dieses Ergebnis stützt die oben genannte Hypothese. Sollte dieses auch auf die anderen TAS2R-Rezeptoren

übertragbar sein, so bedeutet dies, dass die meisten menschlichen TAS2R-Rezeptoren durch andere Substanzen aktivierbar sind, als die mit ihnen verwandten Rezeptoren von Ratte und Maus.

Tabelle 4.1 Aminosäureidentitäten homologer G-Protein gekoppelten Rezeptoren aus Mensch, Maus und Ratte

Sequenzvergleich Maus / Ratte		Sequenzvergleich Maus / Mensch	
Rezeptoren	Aminosäureidentität [%]	Rezeptoren	Aminosäureidentität [%]
Dopaminrezeptor D4	94	Dopaminrezeptor D4	76
Beta-adrenerger-Rezeptor A3	91	Beta-Adrenerger-Rezeptor A3	80
Somatostatinrezeptor 1	99	Somatostatinrezeptor 1	99
mTAS2R19 / rTAS2R1	85	mTAS2R19 / hTAS2R1	46
mTAS2R18 / rTAS2R3	92	mTAS2R18 / hTAS2R16	51
mTAS2R26 / rTAS2R12	91	mTAS2R26 / hTAS2R41	68
mTAS2R21 / rTAS2R7	82	mTAS2R21 / hTAS2R13	57
mTAS2R30 / rTAS2R6	89	mTAS2R30 / hTAS2R7	67
mTAS2R31 / rTAS2R13	74	mTAS2R31 / hTAS2R42	42

Für den Sequenzvergleich wurden nur TAS2R-Rezeptoren ausgewählt, für die in allen drei Spezies ein einzelner eindeutig sequenzverwandter Rezeptor identifiziert werden konnte (Abb. 3.3).

4.2 Funktionelle Expression von TAS2R-Rezeptoren

4.2.1 Einfluss des N-terminalen Transport-Epitops auf mTAS2R5

Um Liganden für die TAS2R-Rezeptoren zu identifizieren wurden diese funktionell in HEK 293 Zellen exprimiert. Dabei gilt es einige technische Probleme zu lösen: So ist für die heterologe Expression einiger Chemorezeptoren, wie den olfaktorischen Rezeptoren, ist der Transport der Rezeptoren an die Zelloberfläche ein bekanntes Problem [Krautwurst, 1998]. In dieser Arbeit konnte am Beispiel von mTAS2R5 gezeigt werden, dass auch die TAS2R-Rezeptoren von diesem Problem betroffen sind. Ohne N-terminale Modifikation ist für diesen Rezeptor in HEK293 Zellen keine Expression an der Zelloberfläche nachweisbar (Abb. 3.5). Bei funktionellen Messungen liegen die Signale im Bereich des Detektionslimits (Abb. 3.8.A). Die Tatsache, dass überhaupt Signale gemessen werden können, zeigt, dass ein geringer Teil der Rezeptoren die Cytoplasmamembran erreicht. Durch Fusion des Rezeptors mit einem N-terminalen Membrantransport-Epitop kann eine deutliche Verbesserung des Transports der Rezeptoren an die Zelloberfläche erreicht werden (Abb. 3.5), was sich auch in einer etwa 20-fach höheren Signalamplitude der modifizierten Rezeptoren widerspiegelt (Abb. 3.8.A). Sowohl die immunologischen als auch die funktionellen Analysen, zeigen, dass die Fusion von TAS2R-Rezeptoren mit einem N-terminalen Membrantransport-Epitop eine notwendige Voraussetzung für die effiziente funktionelle Analyse dieser Rezeptoren in HEK293 Zellen darstellt. Trotz der Verwendung von sehr unterschiedlichen N-terminalen Membrantransport-Epitopen sind die Dosiswirkungskurven sehr ähnlich (Abb. 3.8.B). Auch die Abweichungen der errechneten EC_{50} Werte von mTAS2R5-SST (EC_{50} : $0,1 \pm 0,08 \mu\text{M}$) und mTAS2R5-RHO (EC_{50} : $0,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$) liegen im Bereich des Messfehlers. Dies zeigt, dass die Ligandenbindungseigenschaften des Rezeptors durch N-terminale Modifikationen nicht wesentlich verändert werden.

4.2.2 Expression von TAS2R-Rezeptoren

Analysen der humanen TAS2R-Rezeptoren in HEK293 Zellen zeigen, dass ihre Expression große Unterschiede zwischen den einzelnen Rezeptoren aufweist (Kapitel 3.12). Als Ursache kommen viele Faktoren, wie z. B. die Stabilität der mRNA oder des Proteins, sowie Variation der Transkriptions- oder Translationseffizienzen und eine falsche Proteinfaltung in Betracht [Kaufman, 2000; Opekarova, 2003].

Der Rezeptor mTAS2R5 ist trotz einer nachweisbaren Expressionsrate von nur 1% in funktionellen Experimenten noch gut detektierbar ist. Daher kann vermutlich davon ausgegangen werden, dass dies auch auf jeden anderen TAS2R-Rezeptor zutrifft, der mindestens dieselbe Expressionsrate zeigt. Von 22 analysierten menschlichen Rezeptoren haben 16 eine Expressionsrate von mehr als 1% (Tab. 3.7), d. h. mindestens 75% der TAS2R-Rezeptoren könnten für funktionelle Experimente ausreichend exprimiert sein. Für vier weitere Rezeptoren liegt die Expressionsrate unter 1% (Tab. 3.7). Dies könnte zu gering sein, um sie sicher in funktionellen Experimenten nachzuweisen. Da diese Rezeptoren jedoch in einigen wenigen Zellen produziert werden, ist es vermutlich möglich, durch Erzeugung von Zelllinien und Wahl geeigneter Zellklone eine ausreichende Expression dieser Rezeptoren zu erreichen. Nur für zwei TAS2R-Rezeptoren scheinen HEK293 Zellen als Expressionssystem nicht geeignet, da für diese Rezeptoren keine Expression nachweisbar ist (Tab. 3.7). Um diese Rezeptoren dennoch funktionell zu analysieren, müsste eventuell eine andere Zelle wie z. B. CHO oder RIN Zellen auf Expression dieser Rezeptoren getestet werden.

Die Expression des Rezeptors hTAS2R16 kann in 20% der Zellen detektiert werden. Der Rezeptor mTAS2R5 ist dagegen nur in 1% aller Zellen nachweisbar (Tab. 3.7). Trotzdem lassen sich für beide Rezeptoren in FLIPR-Experimenten ähnlich große Signale messen (Abb. 3.7A + 3.9B). Bei einer starken Reduktion der Zahl der exprimierenden Zellen würde man eigentlich auch eine Reduktion der Signalantwort erwarten. Eine mögliche Erklärung für diesen scheinbaren Widerspruch ist die Annahme, dass die beiden Rezeptoren zwar in gleich vielen Zellen exprimiert werden, aber Mengen des produzierten Rezeptorproteins starke Unterschiede aufweisen. Da aufgrund der Signalamplifikationskaskade von G-Protein gekoppelten Rezeptoren [Lamb, 1992] kann selbst eine kleine Menge exprimierten Rezeptors eine große Signalantwort auslösen [Lefkowitz, 1978]. Dies kann erklären, warum trotz einer unterschiedlichen Menge an Rezeptorprotein in funktionellen Experimenten gleich große Signale detektiert werden. Dies könnte erklären, warum mTAS2R5 trotz einer wesentlich geringeren Expressionsrate in den funktionellen Experimenten ähnlich starke Signale zeigt wie hTAS2R16. Ein experimenteller Hinweis, dass dies tatsächlich der Fall sein kann, liefert Tabelle 3.2 Sie zeigt, anhand der EGFP-Expression, dass in diesem Versuch für alle Rezeptoren eine Transfektionsrate von ca. 30% erreicht wurde. Aber nur in ca. 1% der transfizierten Zellen kann die Expression des Rezeptors mTAS2R5 nachgewiesen werden. Dies kann darauf zurück zu führen sein, dass mTAS2R5 nur in den am besten exprimierenden Zellen nachgewiesen werden kann, während seine Expression in den vielen Zellen unter dem Detektionslimit liegt.

4.2.3 Membranlokalisierung von TAS2R-Rezeptoren in HEK293 Zellen

Die Analyse der subzellulären Lokalisation von TAS2R-Rezeptoren an der Plasmamembran von HEK293 Zellen zeigt, dass es auch hier große Unterschiede zwischen den einzelnen Rezeptoren gibt. So ist nur für 12 von 22 analysierten menschlichen Rezeptoren ein Transport des Rezeptors in die Membran nachweisbar (Kapitel 3.12). Dies zeigt, dass das zum Membrantransport verwendete SST-Epitop nicht für alle TAS2R-Rezeptoren gleich gut geeignet ist. Der Membrantransport ist dabei nicht mit der Expressionsrate korreliert. So ist z. B. der Rezeptor hTAS2R41 nicht in der Plasmamembran lokalisiert, obwohl er in 32% aller Zellen exprimiert wird. Der Rezeptor hTAS2R44, der nur in 6% aller Zellen exprimiert wird, zeigt dagegen in jeder Zelle deutliche Membranständigkeit.

Die bisher funktionell identifizierten Rezeptoren hTAS2R16, hTAS2R10, mTAS2R5 sowie rTAS2R9 zeigen eine deutliche Lokalisation an der Zelloberfläche (Abb. 3.5 + 3.17; Tab. 3.7). Daher ist eine gute Membranlokalisierung vermutlich eine wichtige Voraussetzung für eine funktionelle Analyse dieser Rezeptoren. Dies ist nur für 12 von 22 untersuchten menschlichen Rezeptoren der Fall. Eine wichtige Strategie zur weiteren Optimierung der funktionellen Expression von TAS2R-Rezeptoren ist daher die Verbesserung ihrer Membranlokalisierung. Beim Vergleich verschiedener HEK293-Zellen, die mit dem gleichen Rezeptor transfiziert sind, zeigen sich häufig Unterschiede in der Membranlokalisierung. So kann selbst bei Rezeptoren mit sehr schlechter Membranlokalisierung manchmal in einigen wenigen Zellen eine Lokalisation des Rezeptors an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Durch Erzeugung von HEK293 Zelllinien, die Rezeptoren dauerhaft exprimieren und Wahl entsprechender Klone könnte die Membranlokalisierung der "problematischen" TAS2R-Rezeptoren vielleicht verbessert werden.

4.2.4 Analyse der G-Protein Kopplung von TAS2R-Rezeptoren in HEK293 Zellen

Die vergleichende Analyse der G-Protein Kopplung von mTAS2R5 und hTAS2R16 zeigt eindeutige Unterschiede bezüglich der Kopplung der Rezeptoren an $G_{\alpha 15}$. Das Signal von mTAS2R5 ist nicht Pertussis-Toxin sensitiv (Abb. 3.19). Dies bestätigt publizierte Daten, die eine Interaktion von mTAS2R5 mit diesem G-Protein zeigen [Chandrashekar, 2000]. Das Signal von hTAS2R16 kann durch Pertussis-Toxin dagegen vollständig blockiert werden (Abb. 3.18 + 3.19). Dies und die Tatsache, dass die Aktivierung von hTAS2R16 in Abwesenheit von $G_{\alpha 15}$ in HEK293 Zellen gemessen werden kann, zeigen eindeutig, dass dieser Rezeptor nicht an $G_{\alpha 15}$, sondern an in HEK293 Zellen endogen vorhandene G-Protein Untereinheiten koppelt. Bei den benutzten endogenen G-Protein-Untereinheiten muss es sich um G-Protein-Alpha-Untereinheiten vom G_i - oder G_o -Typ handeln, da Pertussis-Toxin nur auf diese wirkt [Fields, 1997]. In Geschmacksrezeptorzellen wird von TAS2R-Rezeptoren sehr wahrscheinlich ein heterotrimerer G-Protein Komplex aus Alpha-Gustducin, Beta-1 oder Beta-3 und Gamma-13 aktiviert [Huang, 1999]. Alpha-Gustducin, das eng mit Transducin verwandt ist, gehört zur Familie der G_i -Untereinheiten [McLaughlin, 1992]. Daher ist es am wahrscheinlichsten, dass hTAS2R16 in HEK293 Zellen mit einer G-Protein-Alpha-Untereinheit vom G_i -Typ interagiert. Die Aktivierung von G_i -Untereinheiten senkt unter anderem den cAMP-Spiegel der Zellen [Fields, 1997] und kann daher nicht direkt die beobachtete Ca^{2+} -Freisetzung verursachen. Für Beta-Gamma-Untereinheiten wurde dagegen

schon eine Freisetzung von Ca^{2+} durch die Aktivierung von Phospholipase C (PLC) oder Ca^{2+} -Kanälen beobachtet [Sanborn, 1998]. Daher könnte das beobachtete Ca^{2+} -Signal eine Folge der Aktivierung einer endogenen Beta-Gamma-Untereinheit sein.

Die beobachteten Unterschiede zeigen, dass nicht alle TAS2R-Rezeptoren an $G_{\alpha15}$ koppeln können. Es kann vermutlich nicht davon ausgegangen werden, dass alle TAS2R-Rezeptoren mit in HEK293 Zellen endogen vorhandenen G-Protein-Untereinheiten interagieren können. Daher ist die G-Proteinkopplung ein kritischer Punkt für die weitere erfolgreiche Identifizierung von Rezeptor-Liganden-Paaren. Eine Optimierung der Signaltransduktion ist dringend erforderlich. Eine Erfolg versprechende Strategie ist die Modifikation von $G_{\alpha15}$. So ist z. B bekannt, dass die fünf C-terminalen Aminosäuren der G-Protein-Alpha-Untereinheiten besonders wichtig für die Interaktion von Rezeptor und G-Protein sind [Liu, 1995]. Ein Austausch dieser Aminosäuren im $G_{\alpha15}$ gegen die 5 letzten Aminosäuren von Gustducin könnte daher die Interaktion der TAS2R's mit $G_{\alpha15}$ stark verbessern. Für andere Rezeptoren wurde mit dieser Strategie eine erhebliche Verbesserung der G-Protein-Kopplung erreicht [Kostenis, 2001]. Gustducin gehört zum G_i -Typ der G-Proteine. Für G_i -gekoppelte Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass ein Austausch der letzten 44 Aminosäuren von $G_{\alpha15}$ gegen die eines G_i [Mody, 2000] sowie eine Verkürzung des N-Terminus um die ersten 6 Aminosäuren die Kopplung des Rezeptors and das modifizierte $G_{\alpha15}$ verbessert [Kostenis, 1997]. Daher sind auch diese Modifikationen sinnvoll. Auch eine N-terminale Palmitoylierung [Kostenis, 2002] und/oder eine Fusion des G-Proteins mit dem Rezeptor [Seifert, 1999] könnte die Interaktion der TAS2R's mit $G_{\alpha15}$ verbessern.

In Geschmacksrezeptorzellen koppeln die TAS2R-Rezeptoren an einen G-Protein-Komplex aus Alpha-Gustducin, Beta-1 oder Beta-3 und Gamma-13 [Huang, 1999]. Nach Aktivierung von Alpha-Gustducin soll durch eine Phosphodiesterase eine Senkung des cAMP-Spiegels erfolgen [Yan, 2001]. Der Beta-Gamma-Komplex des G-Proteins soll dagegen die Phospholipase C Beta 2 aktivieren [Yan, 2001]. Dieser Signalpfad führt zur Bildung von IP_3 und damit zur Freisetzung von Ca^{2+} . Daher könnte eine andere Erfolg versprechende Strategie zur Optimierung der Interaktion von G-Protein und TAS2R-Rezeptoren auf der *in vitro* Rekonstitution dieser Signaltransduktion in HEK293 Zellen beruhen.

4.3 Identifizierung und Charakterisierung eines neuen Rezeptor-Liganden-Paares

4.3.1 Identifizierung von Salicin als Ligand für hTAS2R16

hTAS2R16 transfizierte HEK293 Zellen reagieren auf Stimulation mit D(-)-Salicin mit einer transienten Erhöhung des intrazellulären Calcium Spiegels (Kapitel 3.3). Das Signal ist reversibel desensitivierbar und konzentrationsabhängig (Abb. 3.9B + 3.11). Da Pertusis Toxin das Salicin-Signal vollständig blockieren kann (Abb. 3.18 + 3.19), muss es sich um ein G-Protein gekoppeltes Signal handeln [Fields, 1997]. Das Salicin-Signal weist daher die typischen Eigenschaften eines Signals von G-Protein gekoppelten Rezeptoren auf [Kohout, 2003; Kostenis, 2001]. Das Signal ist auch spezifisch für hTAS2R16 transfizierte Zellen und nicht in Kontrollen ohne hTAS2R16 zu beobachten (Abb.3.9). Diese Ergebnisse belegen, dass Salicin ein spezifischer Agonist für den Rezeptor hTAS2R16 ist.

4.3.2 Ligandenstruktur von hTAS2R16 Agonisten

Salicin gehört zur Substanzklasse der bitteren Glykoside. Es besteht aus einem Glucosering, der über eine β -glykosidische Bindung an C1 mit einem Phenolderivat verbunden ist (Abb. 3.9E). Anhand der bekannten chemischen Struktur des Salicins ist es möglich, verwandte Substanzen zu testen (Kapitel 3.4). Es wurden 11 weitere Substanzen identifiziert, die den Rezeptor aktivieren (Tab. 3.4). Durch den Vergleich der hTAS2R16 Agonisten mit strukturverwandten Substanzen, die den Rezeptor nicht aktivieren, ist es möglich, ein Strukturmodell für hTAS2R16 Agonisten zu entwickeln (Tab. 3.4). So ist das Phenyl- β -D-Galaktosid im Gegensatz zum Phenyl- β -D-Glucosid nicht in der Lage, den Rezeptor zu aktivieren. Beide Substanzen unterscheiden sich nur in der sterischen Position der C4-Hydroxylgruppe (Tab. 3.4). Beim Phenyl- β -D-Glucosid steht die C4-Hydroxylgruppe äquatorial zum Ringsystem (\sim auf Höhe des Ringsystems), beim Phenyl- β -D-Galaktosid dagegen axial (senkrecht zum Ringsystem). Dieses Ergebnis führt zu der Schlussfolgerung, dass bei hTAS2R16-Agonisten die C4-Hydroxylgruppe äquatorial zum Ringsystem angeordnet sein muss.

Weiterhin ist anhand der Unterschiede in den Schwell- und EC_{50} -Werten klar zu erkennen, dass die Substanzen umso effektiver als Agonisten wirken, je unpolarer Ihre Substitution an C1 ist (Tab. 3.4). Dies, und die Beobachtung, dass β -D-Glucose kein Agonist ist, zeigt, dass die an C1-Substitution an der Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor beteiligt ist. Allerdings ist eine große Variation der chemischen Struktur in dieser Position erlaubt (von einer Methyl- bis zu einer Naphtylsubstitution). Auch die Position der C1-Substitution am Glucosering ist für die Rezeptor-Liganden-Interaktion entscheidend. Der Rezeptor wird selektiv durch β -Pyranoside aktiviert (Tab. 3.4). α -Pyranoside, wie Phenyl- α -D-Glucosid, bei denen die C1 Substitution axial zum Ringsystem liegt, können den Rezeptor nicht aktivieren. Ein Austausch des Sauerstoffs an C1, der die hydrophobe Substitution mit dem Glucosemolekül verknüpft, gegen Schwefel hat keine Wirkung (Tab. 3.4). Daher scheint diese Position für die Rezeptor-Liganden-Interaktion nicht wichtig zu sein. Mannosen wie 4-Nitrophenyl- β -D-Mannose, bei der die C2 Hydroxylgruppe im Gegensatz zur Glucose axial zum Ringsystem steht, sind genauso gute TAS2R16 Agonisten, wie das entsprechende Glucosederivat. Daher scheint die Hydroxylgruppe an C2 für die Bindung des Liganden an den Rezeptor ebenfalls nicht von großer Bedeutung zu sein. Die Tatsache, dass auch Amygdalin ein TAS2R16-Agonist ist (Tab. 3.4), legt nahe, dass wahrscheinlich auch die C6-Hydroxylgruppe nicht an der Liganden-Rezeptor-Interaktion beteiligt ist. Amygdalin besitzt zwei Modifikationen: Einerseits ist es an C6 über eine 1,6-beta-glykosidische Bindung mit einer weiteren Glucosegruppe verknüpft, andererseits sitzt vor dem aromatischen Rest an C1 eine Nitrilgruppe, wodurch die Polarität dieser Gruppe deutlich erhöht wird. Die Zunahme der Polarität der C1 Substitution ist ausreichend, um den relativ hohen Schwell- und EC_{50} -Wert zu erklären. Würde die C6-Hydroxylgruppe eine wichtige Rolle bei der Liganden-Rezeptor-Interaktion spielen, so wäre es schon aus sterischen Gründen sehr wahrscheinlich, dass Amygdalin seine Fähigkeit verlieren würde, den Rezeptor zu aktivieren. Aufgrund des Mangels an geeigneten Testsubstanzen konnte bisher weder für das O-Atom der Halbacetalbindung zwischen C5 und C1 noch für die C3-Hydroxylgruppe ermittelt werden, ob sie bei der Liganden-Rezeptor-Interaktion eine Rolle spielen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TAS2R16 Agonisten strukturell sehr unterschiedlich sein können, solange sie einige Schlüsseleigenschaften aufweisen. Anhand dieser Ergebnisse wurde das in Abb. 4.1 dargestellte Ligandenmodell entwickelt. Anhand dieses Modell lässt sich vorhersagen, dass TAS2R16 von Dutzenden, wenn nicht Hunderten verschiedener bitterer Pyranoside aktiviert werden kann. Sollten auch die anderen Mitglieder der TAS2R-Familie ein breites Substanzspektrum als Liganden akzeptieren, so wäre damit zumindest ein Teil des Rätsels geklärt, warum der Mensch trotz einer nur ca. 25 Mitglieder umfassenden Familie von Bitterrezeptoren in der Lage ist, so viele unterschiedliche Bitterstoffe wahrzunehmen.

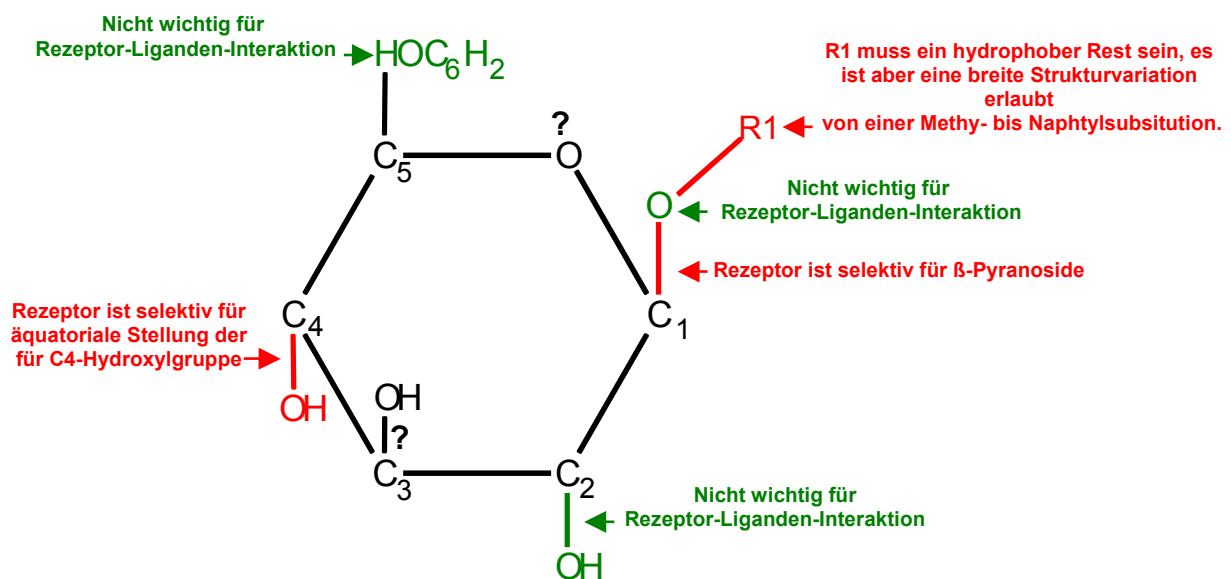


Abb. 4.1 Ligandenmodell für hTAS2R16 Agonisten

Rot: Gruppen, die für die Rezeptor-Liganden-Interaktion wichtig sind. Grün: Gruppen, die keinen Einfluss auf die Rezeptor-Liganden-Interaktion besitzen. ?: Aus Mangel an geeigneten Testsubstanzen noch nicht untersuchte Gruppen.

4.3.3 Bedeutung von Salicin und verwandten hTAS2R16 Agonisten

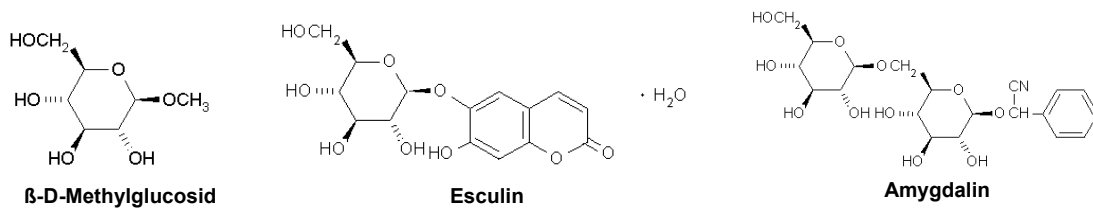
D-(-)-Salicin ist ein Naturstoff, der am aus der Weide gewonnen werden kann. Es ist das am meisten produzierte phenolische Glucosid [Ruuholä, 2000]. Pflanzen produzieren Salicin zum Fraßschutz vor Insekten [Ruuholä, 2001]. Die pharmakologische Wirkung des Salicins ist schon seit über 3500 Jahren bekannt [Vane, 2000]. Es besitzt eine entzündungshemmende und schmerzlindernde Wirkung [Vane, 2000] und wird in diesem Rahmen auch heute noch in der Naturmedizin eingesetzt. Inzwischen ist Salicin jedoch weitgehend durch das auf Grundlage des Salicins entwickelte Aspirin (Acetylsalicylsäure) als Schmerzmittel ersetzt worden. Auch viele andere hTAS2R16 Agonisten wie z. B. Helicin, Arbutin und Amygdalin sind Pflanzeninhaltsstoffe. Arbutin findet auch heute noch in Cremes zur Hautaufhellung Verwendung [Choi, 2002]. Amygdalin ist ein aus Bittermandeln und Apfelnkernen bekanntes Toxin

[Dicenta, 2002], das auch schon in der Krebstherapie eine sehr umstrittene Verwendung fand [Vickers, 2001]. Phenolische Glucoside kommen in vielen Pflanzen vor, auch einige unserer Nahrungsmittelpflanzen enthalten sie [Herrmann, 1989]. Da viele dieser Substanzen diverse pharmakologische Wirkungen haben, soll uns der bittere Geschmack dieser Pflanzeninhaltsstoffe sicherlich vor Vergiftungen schützen.

4.4 Spezifität der TAS2R-Rezeptoren für ihre Liganden

Der Rezeptor hTAS2R16 kann durch viele strukturell recht verschiedene Substanzen (Abb. 4.2) aktiviert werden (Kapitel 3.4). Anhand der bisher erhobenen Daten kann gezeigt werden, dass allein dieser Rezeptor potentiell in der Lage ist, sehr viele verschiedene Substanzen zu detektieren. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang aber auch die Tatsache, dass die Rezeptoren sehr wohl eine gewisse Spezifität zeigen. So müssen hTAS2R16 Agonisten einige Schlüsseleigenschaften aufweisen, um den Rezeptor aktivieren zu können (Kapitel 4.3.2). Auch alle anderen getesteten menschlichen TAS2-Rezeptoren zeigen keine Reaktion auf Salicin (Abb. 3.9.A). Allerdings kann aus diesem Experiment nur eingeschränkt die Schlussfolgerung gezogen werden, dass es keinen weiteren menschlichen Rezeptor gibt, der auf Salicin reagiert. So kann, derzeit vermutlich nur ein Teil der TAS2R-Rezeptoren funktionell analysiert werden (Kapitel 4.2). Deshalb wurden TAS2R-Rezeptoren, die funktionell exprimiert werden können, darauf hin untersucht, ob sie auch durch Agonisten anderer TAS2R-Rezeptoren aktiviert werden (Kapitel 3.11). Die Ergebnisse zeigen, dass hTAS2R16 nicht durch den rTAS2R9-Agonisten Cycloheximid oder den hTAS2R10-Agonisten Strychnin aktiviert wird. Der Rezeptor hTAS2R10 kann nicht durch Salicin und Cycloheximid aktiviert werden, während rTAS2R9 nicht durch Salicin und Strychnin reagiert. Dies zeigt, dass Agonisten eines Rezeptors üblicherweise andere Rezeptoren nicht aktivieren können. Der menschliche Rezeptor hTAS2R 10 kann durch mehrere Substanzen aktiviert werden (Kapitel 3.10). Auch wenn bislang nur drei Agonisten für diesen Rezeptor bekannt sind, zeigt der Vergleich der chemischen Struktur von Strychnin und Denatonium, zeigt, wie unterschiedlich auch hier die Agonisten desselben Rezeptors sein können (Abb. 4.2). Um auch für hTAS2R10 ein Ligandenmodell entwickeln zu können, müssen weitere Agonisten identifiziert werden. Diese Resultate weisen darauf hin, dass vermutlich viele oder alle TAS2R-Rezeptoren durch ein breites Substanzspektrum aktiviert werden können. Daher ist es durchaus möglich, dass die TAS2R-Rezeptorfamilie beim Menschen ausreichend für die Detektion aller Bitterstoffe ist. Da alle TAS2R-Rezeptoren vermutlich in der selben Zelle vorkommen [Adler, 2000] ist es auch möglich, dass die Rezeptoren Di- oder Multimere bilden können. Ein solcher Mechanismus könnte zur Erkennung der vielen Bitterstoffe beitragen. Dieser Aspekt sollte bei zukünftigen Studien berücksichtigt werden. Daher sollte die Fähigkeit der TAS2Rs zu Bildung von Dimeren sowohl biochemisch, als auch funktionell untersucht werden.

Chemische Struktur einiger hTAS2R16-Agonisten



Chemische Struktur der hTAS2R10-Agonisten

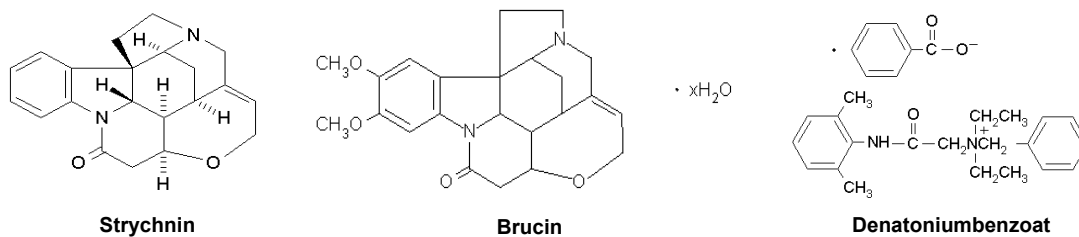


Abb. 4.2 Chemische Struktur von hTAS2R10- und hTAS2R16-Agonisten

Oben: drei anhand ihrer divergenten Struktur ausgewählte hTAS2R16-Agonisten. Unten: Die chemische Struktur der drei bislang identifizierten TAS2R10-Agonisten. *Quelle:* www.sigmaaldrich.com

4.5 Vergleich der Ergebnisse des FLIPR-Systems mit menschlichen Sinneswahrnehmungen

Der Vergleich der im FLIPR erhaltenen Ergebnisse mit Sinneswahrnehmungen des Menschen zeigt in vielen Punkten eine sehr gute Korrelation. Testsubstanzen zur Identifikation von hTAS2R16-Agonisten wurden nur anhand ihrer chemischen Struktur ausgewählt. Die erst später durchgeführten psychophysikalischen Experimente zeigen, dass alle Substanzen, die TAS2R16 in unserem *in vitro* System aktivieren konnten, für Menschen bitter schmecken (Tab. 3.6). Darüber hinaus sind für alle getesteten Substanzen die im FLIPR ermittelten Schwell- und EC_{50} -Werte mit den in psychophysikalischen Experimenten ermittelten Werten nahezu identisch (Tab. 3.6 + Abb. 3.10). Diese Beobachtungen bestätigen das Ergebnis der FLIPR-Versuche, dass hTAS2R16 der menschliche Rezeptor für bittere Pyranoside ist.

Für den Rezeptor hTAS2R10 werden im FLIPR schon bei ca. 0,1 - 0,2 mM Konzentrationen für Brucin und Strychnin die maximalen Signalamplituden gemessen (Kapitel 3.10). Diese Signale sind zu klein um eine Dosiswirkungskurve erstellen und den Schwellwert ermitteln zu können (Gründe siehe Kapitel 4.2). Die Toxizität von Brucin und Strychnin verhindert zudem die Erstellung von menschlichen Dosiswirkungskurven, aus denen der EC_{50} -Wert und Konzentration der maximalen Bitterintensität ermittelt werden könnten. Der menschliche Schwellwert von Strychnin liegt bei 2 μ M [Skramlik, 1926]. Die Signalsättigung des hTAS2R10-Rezeptors wird schon bei 100- bis 200-fach höheren Konzentrationen erreicht wird. Daraus ergibt sich eine sinnvolle Korrelation zwischen Schwellwert im Menschen und starken Aktivierung von hTAS2R10. Diese macht es wahrscheinlich, dass hTAS2R10 der Rezeptor des Menschen für Strychnin und Brucin ist. Die gute Korrelation der menschlichen Schwellwerte mit den

FLIPR-Daten gilt jedoch nicht für die Kombination von hTAS2R10 und Denatoniumbenzoat. Der Rezeptor hTAS2R10 kann durch Denatoniumbenzoat im Bereich von ca. 10 -100 μM aktiviert werden. Der menschliche Schwellwert für Denatoniumbenzoat liegt aber bei nur 0,01 μM [Schiffman, 1993a]. Daher sind die Konzentrationen, in denen diese Substanz den Rezeptor hTAS2R10 aktiviert, immer noch vielfach höher als der entsprechende Schwellwert des Menschen. In Anbetracht der sonst guten Korrelation ist es eher unwahrscheinlich, dass hTAS2R10 den besten Rezeptor für Denatoniumbenzoat darstellt. Es wurde schon gezeigt, dass auch der Rezeptor hTAS2R4 in millimolaren Konzentrationen durch Denatoniumbenzoat aktiviert werden kann [Chandrashekar, 2000]. Angesichts der Tatsache, dass die Rezeptoren durch ein breites Spektrum unterschiedlicher Substanzen aktiviert werden können (Kapitel 4.3 + 4.4) ist es nicht überraschend dass einzelne Bitterstoffe, trotz der oben gezeigten Spezifität, mehrere Rezeptoren aktivieren können.

Die gute Korrelation der Messwerte im FLIPR und der Geschmackstests beim Menschen zeigt weist darauf hin, dass die Konzentrationen, in denen wir Bitterstoffe wahrnehmen, schon auf Ebene der Geschmacksrezeptoren kodiert sind und nicht erst durch Rechenleistungen in höheren Hirnzentren ermittelt werden. Weiterhin kann gezeigt werden HEK293 Zellen ein gutes *in vitro* Modell zur isolierten Analyse dieser Rezeptoren darstellt. Es scheint sogar möglich, die dort erhaltenen Ergebnisse direkt auf menschliche Geschmackswahrnehmungen zu übertragen.

4.6 Desensitivierung von TAS2R-Rezeptoren als mögliche Ursache für die Bitteradaption des Menschen

In der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass mehrfacher oder lang anhaltender Stimulation mit Agonisten zu einer starken Reduktion der hTAS2R16 Signale führt (Abb. 3.11). Er ist also, wie viele andere G-Protein gekoppelte Rezeptoren, desensitivierbar bzw. kreuzdesensitivierbar [Zhang, 1997; Chuang, 1996]. Auch beim Menschen führt eine mehrfache oder lang anhaltende Stimulation mit Bitterstoffen zu einer starken Reduktion des Bittergeschmacks [Keast, 2002; Lawless, 1982]. Dieses Adaption genannte Phänomen ist auch für viele andere Sinnesleistungen wie z. B. die Wahrnehmung des Geruchs, die Photorezeption oder der Temperatur typisch [Dudel, 1996]. Interessanterweise scheint die Bitteradaption des Menschen abhängig vom gewählten Stimulus zu sein. So führt die Dauerstimulation mit der bitteren Aminosäure L-Tryptophan auch zu einer starken Adaption für den Bitterstoff L-Phenylalanin [Keast, 2002]. Die Bitterstoffe Chinin und Harnstoff sind dagegen von diesem Kreuzadaption genannten Phänomen nicht betroffen [Keast, 2002]. Aufgrund der Beobachtung, dass hTAS2R16 kreuzdesensitivierbar ist, liegt die Vermutung nahe, dass die Desensitivierung von einzelnen Bitterrezeptoren die molekulare Ursache für die Bitteradaption beim Menschen sein könnte. Sollte dies der Fall sein, so sind anhand unserer *in vitro*-Messergebnisse bei psychophysikalischen Versuchen mit Menschen folgende Beobachtungen zu erwarten:

1. TAS2R16-Agonisten sollten auch beim Menschen eine Kreuzadaption zeigen.
2. Bitterstoffe, die keine TAS2R16-Agonisten sind, sollten nicht kreuzadaptieren.

Der Verlauf des psychophysikalischen Adaptionsexperimente (Kapitel 3.7 + 3.8) entspricht diesen Vorhersagen. So zeigen die hTAS2R16 Agonisten Salicin, Helicin und Phenyl- β -D-Glucosid Kreuzadaption. Denatonium sowie Phenyl- α -D-Glucosid, die keine hTAS2R16 Agonisten sind, zeigen mit hTAS2R16 Agonisten keine Kreuzadaption. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass hTAS2R16 den Bitterrezeptor für Salicin und verwandte Substanzen darstellt. Die Ergebnisse belegen auch die These, dass die Bitteradaption beim Menschen durch eine spezifische Desensitivierung einzelner Rezeptoren verursacht werden kann. Allerdings hängt diese Interpretation entscheidend von der Art der neuronalen Informationsleitung ab (Kapitel 1.4).

Das neuronale Mustererkennungsmodell, das vor allem von in Ratte und Maus erhobenen Daten gestützt wird, postuliert die Existenz von Rezeptorzellen und Neuronen, die durch alle Geschmacksqualitäten aktiviert werden [Smith, 2000]. In diesem Modell gibt es nur eine geringe Spezifität der Neurone und Rezeptorzellen für jede Geschmacksqualität [Smith, 2000]. Sollte dieses Modell zutreffen, so wäre neben der oben genannten Interpretation auch eine andere Interpretation der Kreuzadaptionsexperimente möglich. Die Adaption könnte dann auch durch Desensitivierung von Gruppen von Geschmacksrezeptorzellen oder ableitender Neurone hervorgerufen werden, die auf Salicin und verwandte Agonisten am besten reagieren. Im Mustererkennungsmodell kann es dem Gehirn auch möglich sein, zwischen verschiedenen Bitterstoffen zu unterscheiden, da in diesem Modell jede Substanz ein eigenes spezifisches Erregungsmuster erzeugen kann. Deshalb wäre es auch denkbar, dass die Adaption durch Rechenleistung des Gehirns erzeugt wird. Allerdings können Ratten verschiedene Bitterstoffe nicht anhand ihres Bittergeschmacks unterscheiden [Spector, 2002], was dem Mustererkennungsmodell widerspricht.

Das Geschmacksbahnenmodell postuliert die Existenz von spezifischen Rezeptorzellen und Nervenfasern für jede einzelne Geschmacksqualität [Hellekant, 1998]. Für den Bittergeschmack heißt dies, dass alle Bitterrezeptoren in derselben Bitterrezeptorzelle exprimiert werden. Sollte dieses Modell zutreffen, so würde jeder Bitterstoff Rezeptoren in derselben Zelle und damit auch dieselben ableitenden Nervenfasern aktivieren. Deshalb gibt es für das Gehirn sowie die ableitenden Neurone keine Möglichkeit zwischen verschiedenen Bitterstoffen zu unterscheiden. Daher kann ein spezifischer Desensitivierungseffekt von einzelnen Substanzen nicht mehr durch Ereignisse auf neuronaler Ebene kodiert werden. Er muss daher schon auf Ebene der Rezeptorzelle kodiert sein. Da die Bitterrezeptoren sehr wahrscheinlich die gleiche Signaltransduktion in der Zelle nutzen (Kapitel 1.5.5), müssen die Rezeptoren selbst die Ursache für die Desensitivierungseffekte sein.

Inzwischen sprechen sehr viele Beobachtungen dafür, dass das Geschmacksbahnenmodell richtig ist. So zeigen die Geschmacksrezeptorzellen auf molekularer Ebenen eine deutliche Spezialisierung (Kapitel 1.4). Insbesondere legen *in situ* Hybridisierungsexperimente nahe, dass alle TAS2R-Rezeptoren in denselben Geschmacksrezeptorzellen koexprimiert werden [Adler, 2000]. Die molekularbiologischen Daten werden inzwischen auch durch eine ganze Reihe weiterer Befunde wie z. B. neuronalen Ableitungen und Befunden an genetisch veränderten Tiermodellen gestützt (Kapitel 1.4). Diese Ergebnisse, sowie die Tatsache, dass die TAS2R-Rezeptoren in HEK293 Zellen Desensitivierung zeigen,

lassen es als wahrscheinlich erscheinen, dass die Adaption von Bitterstoffen auf der Desensitivierung von Rezeptoren beruht.

4.7 Mögliche Ursachen des Bittergeschmacks von Phenyl- α -D-Glucosid

Eine weitere Vorhersage anhand unserer *in vitro*-Messdaten war es, dass zu TAS2R16-Agonisten strukturverwandte Substanzen, die hTAS2R16 nicht aktivieren, für den Menschen auch nicht bitter schmecken. Dies ist jedoch nicht der Fall, da Phenyl- α -D-Glucosid in Konzentrationen für Menschen schwach bitter schmeckt. Für die Interpretation dieses Ergebnisses sind folgende Punkte wichtig: Der menschliche Schwellwert von Phenyl- α -D-Glucosid liegt bei 9 ± 3 mM und der EC_{50} -Wert bei 50 ± 17 mM. Im FLIPR dagegen kann in TAS2R16 transfizierten Zellen auch bei einer Applikation von bis zu 150 mM Phenyl- α -D-Glucosid keine Rezeptoraktivierung detektiert werden. Für andere TAS2R16 Agonisten mit vergleichbar hohen Schwellwerten, wie z. B. Amygdalin, können dagegen im FLIPR deutliche Signale gemessen werden. Daher sind Messfehler als mögliche Erklärung unwahrscheinlich. Der mit Phenyl- α -D-Glucosid nächst strukturverwandte TAS2R16-Agonist, das Phenyl- β -D-Glucosid, hat im FLIPR einen Schwellwert von $0,07 \pm 0,02$ mM (Mensch: $0,1 \pm 0,05$ mM) und einen EC_{50} von $1,1 \pm 0,1$ mM (Menschen: $0,7 \pm 0,2$ mM). Damit ist der Schwell- und der EC_{50} -Wert von Phenyl- β -D-Glucosid um fast drei Zehnerpotenzen geringer als der von Phenyl- α -D-Glucosid. All diese Beobachtungen zeigen, dass Phenyl- α -D-Glucosid wahrscheinlich von einem anderen Rezeptor als TAS2R16 detektiert wird. Versuche, diesen Rezeptor mit Hilfe des FLIPRs zu identifizieren, blieben bislang erfolglos (mögliche Ursachen siehe Kapitel 4.2). Eine andere Alternative zu untersuchen, ob Phenyl- β -D-Glucosid einen anderen Rezeptor als TAS2R16 aktiviert, bieten Kreuzadaptionsexperimente. Sollten TAS2R16 Agonisten und Phenyl- β -D-Glucosid unterschiedliche Rezeptoren aktivieren, so sollte keine Kreuzadaption zwischen diesen Substanzen nachweisbar sein (Kapitel 4.5). In entsprechenden psychophysikalischen Adaptionsexperimenten zeigt sich, dass Adaption mit Phenyl- α -D-Glucosid wie erwartet nicht zu einer Kreuzadaption mit hTAS2R16-Agonisten führt (Kapitel 3.8). Dies ist natürlich ein starker Hinweis, dass Phenyl- α -D-Glucosid einen anderen Rezeptor als hTAS2R16 aktiviert. Es stärkt auch die These, dass die spezifische Desensitivierung von Rezeptoren die molekulare Ursache für die Adaption des menschlichen Bittergeschmacks ist.

4.8 Expression von TAS2R16

Bislang wurde nur für hTAS2R3, hTAS2R4 und hTAS2R5 durch RT-PCR die Expression in der humanen Wallpapille nachgewiesen [Ueda 2001]. Die Expression von TAS2R16 wurde bislang noch nicht untersucht. Die in Kapitel 3.9 durchgeführte RT-PCR zeigt eindeutig, dass die mRNA von hTAS2R16 in Wallpapillen enthaltendes Gewebe der menschlichen Zunge nachgewiesen werden kann (Abb. 3.14A Bahn 5). Die Expression der mRNA ist spezifisch auf Zungengewebe beschränkt, da in allen anderen untersuchten menschlichen Geweben keine Expression von hTAS2R16-mRNA nachweisbar war. Dieser Befund entspricht den Resultaten der Expression von TAS2R-Rezeptoren in Nagern: dort konnten sie nur in Zunge und Hoden nachgewiesen werden, nicht aber in Gehirn, Vomeronasalorgan oder Leber

[Matsunami, 2000]. Sogar auf der menschlichen Zunge ist die Expression von hTAS2R16 nur auf wenige Zellen beschränkt, da in Gewebepräparationen der gesamten Zunge, inklusive der Zungenmuskulatur, die Expression von hTAS2R16 unter dem Detektionslimit lag (Abb. 3.14A Bahn 6 +7). TAS2R-Rezeptoren kommen nur in einem Teil der Geschmacksrezeptorzellen einer Knospe vor [Adler 2000; Matsunami, 2000]. Die Geschmacksknospen stellen nur einen kleinen Bruchteil der Zellen des gesamten Zungenepithels dar. Die Zahl der Zellen im nur wenige Zellschichten dicken Zungenepithel ist wiederum im Vergleich zur Zellzahl der Zungenmuskulatur sehr gering. Daher entsprechen die Ergebnisse der RT-PCR den Erwartungen an das Expressionsmuster eines spezifisch exprimierten Geschmacksrezeptorgens. Die *in situ* Hybridisierung (Abb. 3.14B) bestätigt, dass es sich bei den hTAS2R16 mRNA exprimierenden Zellen um Zellen innerhalb von Geschmacksknospen handelt.

4.9 Ergebnisse der Analyse der Aminosäuresequenz

Die Sequenzanalysen der TAS2R-Rezeptorfamilie (Tabelle 3.8) zeigen, dass alle 25 menschlichen TAS2Rs, wie alle anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), über sieben Transmembranregionen (TM) verfügen. Untersuchungen zur Signaltransduktion dieser Rezeptoren [Chandrashekar, 2000] sowie eigene Arbeiten (Kapitel 3.13) zeigen, dass diese Rezeptoren an G-Proteine koppeln können. Anhand ihrer entfernten Sequenzverwandtschaft zum Rhodopsin- sowie zu den Geruchs- und Vomeronasalorgan-Rezeptoren vom V1R-Typ, lassen sich die TAS2R-Rezeptoren in die Familie 1 der GPCRs einordnen [Adler, 2000; Bockaert, 1999]. Allerdings sind sie eher untypische Vertreter dieser Rezeptorfamilie. Viele sonst bei GPCRs weit verbreitete Strukturmerkmale besitzen sie nicht. So bilden die meisten GPCRs zur Stabilisierung der Rezeptorstruktur ein Disulfidbrücke zwischen der ersten und zweiten extrazellulären Schleife aus [Bockaert, 1999]. Den meisten TAS2R-Rezeptoren fehlen aber entsprechenden Cysteinreste (Beispiele siehe Abb. 4.3). GPCRs haben meist am intrazellulären Ende der TM3 ein sehr konserviertes D/ERY Motiv, dass für die Rezeptoraktivierung wichtig ist [Bockaert, 1999]. Auch dieses Motiv fehlt den TAS2Rs (Abb. 4.3). Nur 4 Aminosäuren, alle in putativen Transmembrandomänen, sind in allen menschlichen TAS2R-Rezeptoren identisch (Abb. 4.3). Da diese starke Konservierung bei der sonst üblichen Strukturdivergenz der TAS2R-Rezeptoren vermutlich kein Zufall ist, sollten diese Aminosäuren wichtige Aufgaben erfüllen. Aufgrund ihrer Lage (Abb. 4.3 + 4.4) im Kern oder nahe der intrazellulären Seite der Transmembranregionen werden sie aber vermutlich nicht an der Ligandenbindung beteiligt sein. Für das konservierte Leucin in TM2, das Tryptophan in TM3 und das Leucin in TM5 ist eher zu vermuten, dass sie für eine bestimmte Konformation der Transmembranregionen notwendig sind. An der Abschaltung des Rezeptors könnten, wie bei vielen anderen Rezeptoren auch, Arrestin sowie G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen beteiligt sein [Ferguson, 1998; Zhang, 1997]. Ein Hinweis hierauf ist, dass Arrestin-Beta-2 in Geschmacksrezeptorzellen von Ratten vorkommt. Stimulation von Geschmacksrezeptorzellen mit Bitterstoffen führt zu einer Akkumulation von Beta-Arrestin an die Membran dieser Zellen (P. Widmayer, persönliche Mitteilung). Das konservierte Serin ganz am intrazellulären Ende der TM5 könnte daher für die Desensitivierung des Rezeptors durch Phosphorylierung mittels G-Protein gekoppelter

Rezeptorkinasen wichtig sein [Pitcher, 1998]. Bei der Betrachtung der konservierten und nicht konservierten Bereiche dieser Rezeptoren fällt auf, dass Transmembrandomänen sowie die intrazellulären Schleifen einen deutlich höheren Konservierungsgrad aufweisen als die extrazellulären Schleifen. Die extrazelluläre Schleife zwischen TM4 und TM5 scheint besonders variabel zu sein (Abb. 4.3). Bitterstoffe haben eine sehr unterschiedliche chemische Struktur (Kapitel 1.6). Daher sollten, die Bindungszentren der TAS2R-Rezeptoren für ihre jeweiligen Liganden sehr unterschiedlich gebaut sein [Adler, 2000]. Deshalb sind die variablen extrazellulären Bereiche, besonders die zwischen TM4 und TM5, exzellente Kandidaten für das Bindungszentrum [Adler, 2000].

Bei der Analyse der TAS2R-Rezeptorsequenzen wurden trotz der hohen Strukturdivergenz einige gemeinsame Motive beobachtet (Kapitel 3.14). So weisen alle TAS2Rs mit Ausnahmen von 2 Rezeptoren ein Glykosylierungsmotiv in der dritten extrazellulären Schleife auf (Tab. 3.8). Die Existenz und der hohe Konservierungsgrad dieses Motivs ist erstaunlich, da die Sequenz der TAS2R-Rezeptoren in dieser Region eigentlich sehr variabel ist (Abb. 4.3). Daher ist mit hoher Wahrscheinlichkeit davon aus zu gehen, dass die Rezeptoren an dieser Stelle eine Glykosylierung aufweisen. Die Konservierung dieses Motivs deutet auf eine wichtige Funktion dieser Glykosylierung hin. Zwar ist ein Einfluss dieser Glykosylierung auf die Ligandenbindung möglich [Varki, 1993], aber aufgrund der sehr vielfältigen chemischen Struktur der Bitterstoffe eher unwahrscheinlich. Vermutlich spielt die Glykosylierung eher eine wichtige Rolle für die korrekte Faltung oder die subzelluläre Lokalisation des Rezeptorproteins [Varki, 1993]. Vielleicht kann durch gezielte Mutation dieses Motivs eine verbesserte Lokalisation des Rezeptors an der Plasmamembran der HEK293 Zellen erreicht werden. Für die meisten TAS2R-Rezeptoren werden auch Phosphorylierungsmotive für Caseinkinase 2 (CK2) in der ersten intrazellulären Schleife und/oder die Proteinkinase C (PKC) in der dritten intrazellulären Schleife vorhergesagt (Kapitel 3.14). Diese Enzyme könnten daher, wie bei anderen Rezeptoren, ebenfalls an der Desensitivierung der TAS2R-Rezeptoren beteiligt sein [Waugh, 1999; Pitcher, 1998]. Das in der TM1 vieler TAS2R-Rezeptoren vorhergesagte Myristoylierungsmotiv liegt im Kern der Membranregion und ist es den entsprechenden Enzymen vermutlich nicht zugänglich. Da die entsprechende Sequenz aber in vielen TAS2R-Rezeptoren konserviert ist, könnte diese Aminosäuresequenz für die strukturelle Konformation der TM1 wichtig sein und nur zufällig einem Myristoylierungsmotiv ähneln.

Da hTAS2R16 in HEK293 Zellen funktionell untersucht sowie immunocytochemisch nachgewiesen werden kann, ist dieser Rezeptor natürlich ein exzellenter Kandidat, um zu untersuchen, welche Auswirkungen Mutationen der oben genannten Motive auf diesen Rezeptor haben. Die in diesem Zusammenhang für solche Mutationsstudien interessanten Aminosäuren sind in Abb. 4.4 dargestellt. Im Gegensatz zu vielen anderen TAS2R-Rezeptoren besitzt hTAS2R16 keine putative CK2 Phosphorylierungsstelle und auch kein Myristoylierungsmotiv in TM1. Allerdings hat dieser Rezeptor zwei putative Glykosylierungsmotive sowie eine putative PKC-Phosphorylierungsstelle. Besonders interessant dürfte die Mutation des in TAS2R-Rezeptoren konservierten Serins an Position 202 sein, da dies Auswirkungen auf die Rezeptordesensitivierung haben könnte.

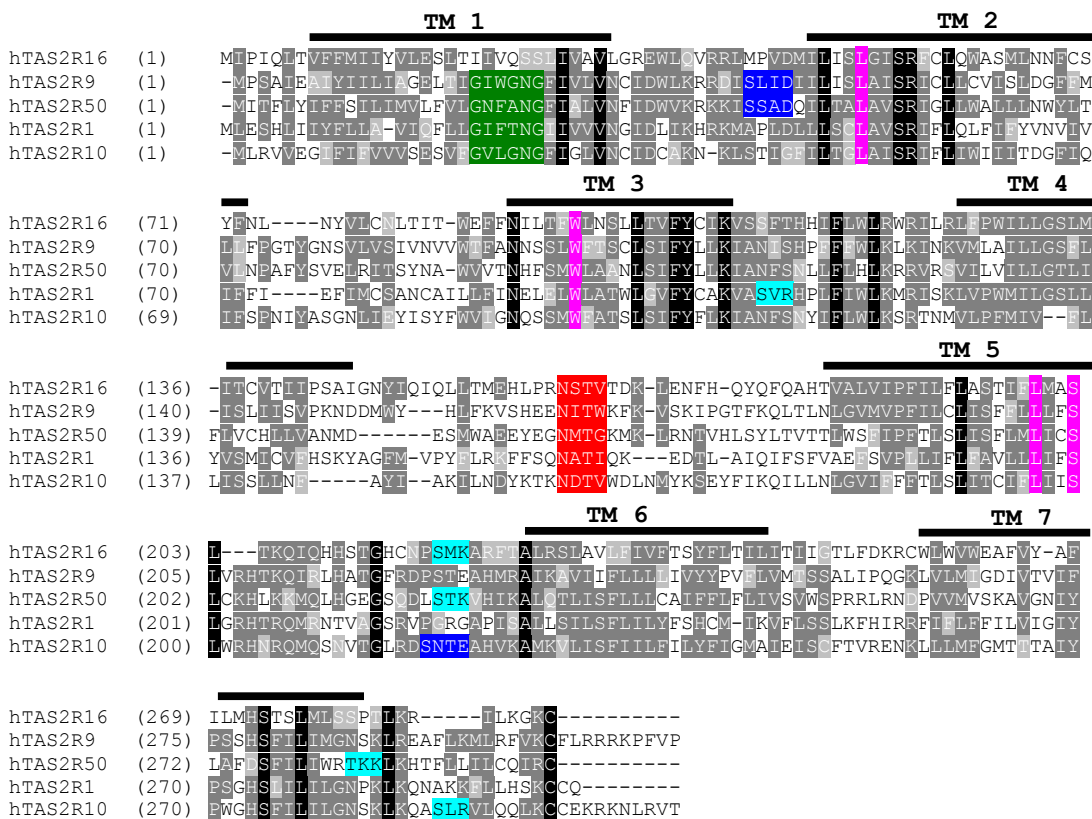


Abb. 4.3 Sequenzvergleich einiger menschlicher TAS2R-Rezeptoren

Eine vergleichende Analyse der TAS2R-Sequenzen. Putative Transmembrandomänen (schwarze Balken) ASN-Glykosylierung (rot), Myristoylierung (grün) sowie Phosphorylierung durch Proteinkinase C (türkis) Caseinkinase 2 (blau) Die Schattierung der Aminosäure zeigt ihren Konservierungsgrad : rosa in allen 24 hTAS2Rs identisch, schwarz: hoch konserviert; dunkelgrau: konserviert; hellgrau: schwach konserviert; keine Schattierung: nicht konserviert.

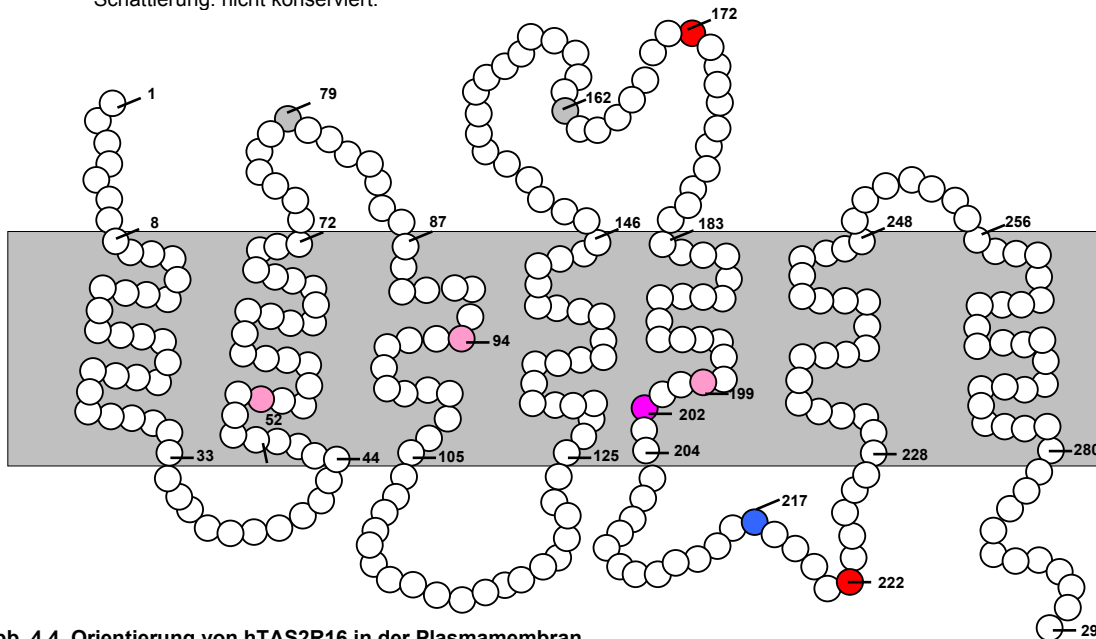


Abb. 4.4 Orientierung von hTAS2R16 in der Plasmamembran

Die Abbildung zeigt die Anordnung der Aminosäuren von hTAS2R16 in der Plasmamembran. Die Position der für diesen Rezeptor vorhergesagten Motive und Aminosäurevariationen sind farbig markiert. Grau: mögliche Glykosylierung; dunkelblau: mögliche PKC-Phosphorylierung; rosa: Position, der in allen TAS2R-Rezeptoren identischen Aminosäuren, die dunkelrosa dargestellte Aminosäure ist das konservierte Serin, rot: Positionen, an denen Gen-Poymorphismen für einen Aminosäureaustausch kodieren.

4.10 Genvariationen

Die Wahrnehmung des Bittergeschmacks vieler Substanzen weist individuelle Unterschiede auf [Keast, 2002; Blakeslee, 1935]. Manche dieser Unterschiede sind eindeutig genetisch bedingt. Das prominenteste Beispiel hierfür ist der Bittergeschmack von PROP und PTC [Guo, 2001]. Aber auch der Bittergeschmack des Antibiotikums Chloramphenicol weist genetisch bedingte Unterschiede auf [Sugino, 2002]. Für viele weitere Stoffe wie z. B. Chinin, Cascarea, Antipyrin oder Vanillin ist bekannt, dass der Schwellwert für den Bittergeschmack dieser Stoffe zwischen verschiedenen Individuen um mehr als den Faktor 100 variieren kann [Blakeslee, 1935]. Bislang ist nicht ermittelt worden, ob dies genetische Ursachen hat.

Die Analyse der Datenbanken des humanen Genomprojektes, sowie der klonierten TAS2R-Rezeptoren ergab, dass die TAS2R-Rezeptoren in ihrer kodierenden Region mindestens 77 Genpolymorphismen (SNPs) aufweisen (Kapitel 3.15). 54 dieser Polymorphismen führen zu Aminosäureaustauschen. Mindestens 10 von ihnen sind recht häufig, da sie eine Allelfrequenz von mehr als 10% besitzen. Aufgrund der relativ großen Zahl verschiedener SNPs ist es wahrscheinlich, dass zumindest einige die Funktion der Rezeptoren beeinflussen werden. Vier weitere SNPs führen sogar zum völligen Funktionsausfall eines TAS2R-Rezeptors (Kapitel 3.15). Es liegt daher auf der Hand, zu vermuten, dass Polymorphismen der TAS2R-Rezeptoren die Ursache für genetisch bedingte Variationen menschlichen Bittergeschmacks sind. Diese Vermutung wird durch eine kürzlich erschienene genetische Kartierung von PROP/PTC-Schmeckern und Nicht-Schmeckern untermauert. Diese liefert starke Hinweise darauf, dass SNPs des hTAS2R38-Gens die Ursache für die Variation des PROP/PTC-Geschmacks sind [Kim, 2003]. Aufgrund der funktionellen Identifizierung von hTAS2R16 als Rezeptor für Salicin und verwandte Substanzen, ist es möglich, zu untersuchen, ob Variationen in der Wahrnehmung von Salicin durch Polymorphismen im hTAS2R16-Gen verursacht werden. Analysen der Datenbanken des humanen Genomprojektes ergaben, dass es in der kodierenden Region des hTAS2R16-Gens zwei SNPs gibt, die zum Aminosäureaustausch führen (Abb. 3.20). Eine als Pilotstudie, bei 60 Personen, durchgeführte Bestimmung der Salicinschwellwerte, ergab 4 hyposensitive Probanden mit einem um den Faktor 4 erhöhten Salicinschwellwert, sowie 3 hypersensitive Personen mit einem um den Faktor 5 erniedrigten Schwellwert. Bei der Analyse der hTAS2R16-Rezeptorsequenz dieser Probanden ergab sich eine gute Korrelation des hyposensitiven Phänotyps mit dem SNP rs860170. Da dieser an der Position 222 den Austausch eines Arginins gegen ein Histidin bewirkt (Abb. 4.4), ist er als Ursache des Salicin hyposensitiven Phänotyps ein guter Kandidat. Um dies zu verifizieren, sollten diese Versuche jedoch mit einer größeren Anzahl von Probanden wiederholt werden. Zumal in funktionellen FLIPR-Analysen bislang keine schlechtere Aktivierbarkeit dieser hTAS2R16-Rezeptorvariante festgestellt wurde. Allerdings ist dieses Ergebnis nicht besonders überraschend, da die Aminosäure 222 sich in der dritten intrazellulären Schleife zwischen der Transmembranregion V und VI befindet (Abb. 4.4). Die Liganden werden vermutlich an der extrazellulären Seite des Rezeptors binden (siehe Kapitel 4.9). Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass dieser Aminosäureaustausch einen Einfluss auf Rezeptor-Liganden-Interaktion hat. Die dritte intrazelluläre Schleife des Rezeptors ist dagegen für die Rezeptor-G-Protein-Interaktion äußerst wichtig [Liu, 1996; Liu, 1995]. Daher könnte dieser Aminosäureaustausch die Wechselwirkung zwischen Rezeptor

und G-Protein beeinflussen. Da hTAS2R16 bei heterologer Expression in HEK293 Zellen anstelle seines natürlichen G-Protein-Komplexes (Kapitel 1.5.5) mit einem vorkommenden endogenen G-Protein-Komplex interagiert (Kapitel 4.2.4), können Effekte auf die G-Protein-Kopplung nur begrenzt untersucht werden. Daher muss es ein Ziel weiterer Arbeiten sein, auch bei der heterologen Expression dieser Rezeptoren den natürlichen G-Protein-Komplex zur Kopplung an den IP_3 -Signalpfad zu nutzen. Für die Kombination aus einer Beta1-Gamma-13-Untereinheit, die vermutlich Teil des nativen G-Protein-Komplexes der TAS2R-Rezeptoren ist (Abb. 1.2), wurde schon biochemisch gezeigt sie die Phospholipase C aktiviert und zur IP_3 -Produktion führt [Blake, 2001], ist dies technisch möglich.

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass die Vielzahl der TAS2R-Polymorphismen eine gute Erklärung für viele der beim Menschen beobachteten individuellen Geschmacksvariationen bietet. In dieser Studie konnten erste Hinweise erbracht werden, dass Variationen des TAS2R16 Gens tatsächlich die Ursache für eine veränderte Wahrnehmung von Salicin sind. Allerdings müssen weitere Studien mit mehr Probanden diese Befunde bestätigen.

4.11 Ausblick

Aus den Ergebnissen diese Arbeit ergeben sich eine ganze Reihe neuer Aspekte, deren weitere Untersuchung sich lohnt:

In der vorliegenden Arbeit werden Indizien für ein schnelle molekulare Evolution der TAS2R gezeigt. Eine spannende Frage ist der zugrunde liegende Mechanismus. Um die hier vorgeschlagene Hypothese zu prüfen, ob spezies-spezifische Unterschiede des Ernährungsverhalten verantwortlich sind, wären eine Studien der TAS2R-Rezeptoren in Primaten wünschenswert. Sollte die Hypothese korrekt sein, so müssen die TAS2R-Rezeptoren entfernt verwandter Primaten funktionell ähnlich sein, wenn diese Spezies die gleichen Nahrungsquellen nutzen. Die TAS2R-Rezeptoren näher verwandter Affenarten, die sich sehr unterschiedlich ernähren, sollten dagegen funktionelle Unterschiede aufweisen. Aufgrund der Tatsache, dass für hTAS2R10 und hTAS2R16 schon Liganden identifiziert wurden, sind die Gene dieser beiden Rezeptoren für solche Studien ideale Kandidaten.

Für zwei menschliche Rezeptoren wurden hier spezifische Liganden identifiziert. Um die Frage zu untersuchen, ob es neben der TAS2R-Familie noch andere Bitterrezeptoren geben muss, sollten für alle anderen menschlichen TAS2R-Rezeptoren ebenfalls Agonisten identifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass zur funktionellen Expression aller TAS2R-Rezeptoren eine Optimierung der Expression sowie der G-Protein -Kopplung notwendig ist.

In der vorliegenden Arbeit wird die Desensitivierung von Bitterrezeptoren als Mechanismus für die Adaption von Bitterstoffen beim Menschen vorgeschlagen. Um diese These weiter zu untermauern, ist es notwendig, weitere Rezeptoren funktionell zu identifizieren und mit deren Agonisten Kreuzdesensitivierungsexperimente durchzuführen. In diesem Zusammenhang wäre es auch

wünschenswert, den genauen Mechanismus der Rezeptordesensitivierung zu ermitteln. Dies könnte es ermöglichen die Desensitivierung einzelner Rezeptoren spezifisch zu unterdrücken und so diese Hypothese zu beweisen.

Für die TAS2R-Rezeptoren kann hier gezeigt werden, dass sie nicht, wie sonst für viele Rezeptoren üblich, hochspezifisch durch einige wenige Substanzen aktiviert werden. Daher ist eine weitere Frage, wie so viele chemisch sehr verschiedene Agonisten den gleichen Rezeptor aktivieren können. So ist bislang nicht bekannt, ob alle Agonisten das gleiche Bindungszentrum nutzen, oder ob es möglicherweise mehrere Bindungsstellen gibt. Um diese Frage näher zu studieren, müssen die Aminosäuren des Rezeptors, die an der Bindung des Liganden beteiligt sind, identifiziert werden. Ein Erfolg versprechender Ansatz hierzu wäre die Vorhersage der Rezeptorstruktur durch Computermodellierung in Kombination mit gezielten Mutationen sowie funktionellen Studien.

In hier werden erste Indizien für einen Zusammenhang zwischen Variationen eines TAS2R-Rezeptorgens und einer unterschiedliche Wahrnehmung eines Bitterstoffes beschrieben. Es muss durch weitere Assoziationsstudien zwischen Geno- und Phänotypen, geklärt werden, welche Auswirkungen diese Genvariationen auf den menschlichen Geschmack haben. Sind manche Polymorphismen die Ursache für ein verändertes Ernährungsverhalten? Wenn ja, welche Auswirkungen hat dies auf unsere Gesundheit?

5 Zusammenfassung

Menschen nehmen Tausende von Stoffen als bitter wahr. Die chemische Struktur der verschiedenen Bitterstoffe ist sehr vielfältig: Sie reicht von kleinen Molekülen wie Kaliumchlorid oder Harnstoff, bis zu sehr komplexen organischen Verbindungen. Die Größe der einzigen bekannten menschlichen Familie von Bitterrezeptoren (TAS2Rs) wurde auf nur ca. 80-120 Mitglieder geschätzt. In Anbetracht der hohen Zahl und Komplexität der Bitterstoffe erscheint die Zahl von Rezeptoren als sehr gering. Dies führt natürlich zu einer Reihe von Fragen: Wie viele Mitglieder hat die menschliche TAS2R-Genfamilie? Wie viele verschiedene Substanzen können denselben Rezeptor aktivieren? Scheint die Zahl der TAS2R-Rezeptoren ausreichend, alle Bitterstoffe wahrnehmen zu können oder muss es noch andere Bitterrezeptorfamilien geben? Diese Fragen zu beantworten, ist das Ziel der vorliegenden Arbeit.

Hier durchgeführte Analysen des menschlichen Genomprojektes zeigen, dass Menschen ca. 25 TAS2R-Rezeptoren besitzt, die eine sehr divergente Aminosäurestruktur aufweisen. Diese Rezeptoren wurden in eine neu entwickelte Expressionskassette kloniert, die den Transport des Rezeptors an die Zelloberfläche ermöglicht. Um Liganden für die menschliche TAS2R-Rezeptoren zu identifizieren, wurden die Rezeptoren in HEK293 Zellen exprimiert und mit verschiedenen Bitterstoffen stimuliert. Der Nachweis der Rezeptoraktivierung erfolgte durch Calcium-Imaging. Es konnte gezeigt werden, dass hTAS2R16 der menschliche Rezeptor zur Wahrnehmung von Salicin und verwandten bitteren Pyranosiden ist. So wird hTAS2R16 in HEK293 Zellen durch Salicin und chemisch verwandte Substanzen aktiviert. Ein Vergleich der in diesem Messsystem erhaltenen Daten mit psychophysikalisch ermittelten Geschmackswahrnehmungen beim Menschen, ergab eine hohe Übereinstimmung. Die Ergebnisse deuten auch darauf hin, dass die Desensitivierung einzelner Rezeptoren die Ursache für die Adaption des Bittergeschmacks ist. Der Nachweis der Expression des Rezeptors in menschlichen Geschmackspapillen, sowie die festgestellte Assoziation des G/A Polymorphismus an Position 665 des hTAS2R16 Gens mit einer reduzierten Salicinwahrnehmung, sind weitere unabhängige Beweise für diese These. Ein anderer menschlicher Rezeptor, hTAS2R10, wird durch die Bitterstoffe Strychnin, Brucin und Denatonium aktiviert. Dies sowie die Tatsache, dass die zur Aktivierung benutzten Konzentrationen eine sinnvolle Korrelation zu dem menschlichen Geschmacksschwellwert von Strychnin zeigen, sind starke Hinweise, dass hTAS2R10 der menschliche Rezeptor zur Wahrnehmung von Strychnin und verwandten Substanzen ist.

Die vorliegenden Daten zeigen eindeutig, dass die TAS2R-Rezeptoren auch beim Menschen Bitterrezeptoren darstellen. Sowohl hTAS2R16, als auch hTAS2R10 werden durch ein Spektrum strukturell sehr unterschiedlicher Bitterstoffe aktiviert. Falls die anderen Mitglieder der TAS2R-Familie ebenfalls dieses Verhalten zeigen, wäre es möglich, dass die nur ca. 25 Mitglieder umfassende TAS2R-Rezeptorfamilie des Menschen tatsächlich zur Wahrnehmung aller Bitterstoffe ausreicht.

6. Literaturverzeichnis

- Adkins, R. M., Gelke, E. L., Rowe, D. & Honeycutt, R. L. Molecular phylogeny and divergence time estimates for major rodent groups: evidence from multiple genes. *Mol Biol Evol* 18, 777-91. (2001).
- Adler, E. et al. A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* 100, 693-702. (2000).
- Ammon, C., Schafer, J., Kreuzer, O. J. & Meyerhof, W. Presence of a plasma membrane targeting sequence in the amino-terminal region of the rat somatostatin receptor 3. *Arch Physiol Biochem* 110, 137-45. (2002).
- Bartoshuk, L. M. Comparing sensory experiences across individuals: recent psychophysical advances illuminate genetic variation in taste perception. *Chem Senses* 25, 447-60. (2000).
- Bellisle, F. Glutamate and the UMAMI taste: sensory, metabolic, nutritional and behavioural considerations. A review of the literature published in the last 10 years. *Neurosci Biobehav Rev* 23, 423-38 (1999).
- Blake, B. L. et al. G beta association and effector interaction selectivities of the divergent G gamma subunit G gamma(13). *J Biol Chem* 276, 49267-74. (2001).
- Blakeslee, A. A dinner demonstration of threshold differences in taste and smell. *Science* 81, 504-507 (1935).
- Bockaert, J. & Pin, J. P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* 18, 1723-9. (1999).
- Bork, P. & Copley, R. The draft sequences. Filling in the gaps. *Nature* 409, 818-20. (2001).
- Breslauer, K. J., Frank, R., Blocker, H. & Marky, L. A. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3746-50. (1986).
- Bufe, B., Hofmann, T., Krautwurst, D., Raguse, J. D. & Meyerhof, W. The human TAS2R16 receptor mediates bitter taste in response to beta- glucopyranosides. *Nat Genet* 32, 397-401. (2002).
- Burdach, K. J. & Doty, R. L. The effects of mouth movements, swallowing, and spitting on retronasal odor perception. *Physiol Behav* 41, 353-6 (1987).

- Caicedo, A., Kim, K. N. & Roper, S. D. Individual mouse taste cells respond to multiple chemical stimuli. *J Physiol* 544, 501-9. (2002).
- Caicedo, A. & Roper, S. D. Taste receptor cells that discriminate between bitter stimuli. *Science* 291, 1557-60. (2001).
- Capeless, C. G., Whitney, G. & Azen, E. A. Chromosome mapping of *Soa*, a gene influencing gustatory sensitivity to sucrose octaacetate in mice. *Behav Genet* 22, 655-63. (1992).
- Caterina, M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816-24. (1997).
- Chandrashekar, J. et al. T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* 100, 703-11. (2000).
- Chaudhari, N., Landin, A. M. & Roper, S. D. A metabotropic glutamate receptor variant functions as a taste receptor. *Nat Neurosci* 3, 113-9. (2000).
- Chaudhari, N. & Roper, S. D. Molecular and physiological evidence for glutamate (umami) taste transduction via a G protein-coupled receptor. *Ann N Y Acad Sci* 855, 398-406. (1998).
- Chaudhari, N. et al. The taste of monosodium glutamate: membrane receptors in taste buds. *J Neurosci* 16, 3817-26. (1996).
- Choi, S., Lee, S. K., Kim, J. E., Chung, M. H. & Park, Y. I. Aloesin inhibits hyperpigmentation induced by UV radiation. *Clin Exp Dermatol* 27, 513-5. (2002).
- Chuang, T. T., Iacovelli, L., Salles, M. & De Biasi, A. G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications. *Trends Pharmacol Sci* 17, 416-21. (1996).
- Cohn, D. *Die organischen Geschmackstoffe* (Franz Siemenroth, Berlin, 1914).
- Conte, C., Ebeling, M., Marcuz, A., Nef, P. & Andres-Barquin, P. J. Identification and characterization of human taste receptor genes belonging to the TAS2R family. *Cytogenet Genome Res* 98, 45-53 (2002).
- Danilova, V. et al. Sense of taste in a new world monkey, the common marmoset: recordings from the chorda tympani and glossopharyngeal nerves. *J Neurophysiol* 88, 579-94. (2002).

- Danilova, V., Hellekant, G., Tinti, J. M. & Nofre, C. Gustatory responses of the hamster *Mesocricetus auratus* to various compounds considered sweet by humans. *J Neurophysiol* 80, 2102-12. (1998).
- Delwiche, J. F., Buletic, Z. & Breslin, P. A. Covariation in individuals' sensitivities to bitter compounds: evidence supporting multiple receptor/transduction mechanisms. *Percept Psychophys* 63, 761-76. (2001).
- DeSimone, J. A., Lyall, V., Heck, G. L. & Feldman, G. M. Acid detection by taste receptor cells. *Respir Physiol* 129, 231-45. (2001).
- Dicenta, F. et al. Relationship between cyanogenic compounds in kernels, leaves, and roots of sweet and bitter kernelled almonds. *J Agric Food Chem* 50, 2149-52. (2002).
- Drayna, D. et al. Genetic analysis of a complex trait in the Utah Genetic Reference Project: a major locus for PTC taste ability on chromosome 7q and a secondary locus on chromosome 16p. *Hum Genet* 112, 567-72. (2003).
- Drewnowski, A. Taste preferences and food intake. *Annu Rev Nutr* 17, 237-53 (1997).
- Drewnowski, A. & Rock, C. L. The influence of genetic taste markers on food acceptance. *Am J Clin Nutr* 62, 506-11. (1995).
- Drewnowski, A. & Shultz, J. M. Impact of aging on eating behaviors, food choices, nutrition, and health status. *J Nutr Health Aging* 5, 75-9 (2001).
- Dudel, J. M., R.; Schmidt, R. *Neurowissenschaften Vom Molekül zur Kognition* (Springer, Berlin, 1996).
- Duffy, V. B. & Bartoshuk, L. M. Food acceptance and genetic variation in taste. *J Am Diet Assoc* 100, 647-55. (2000).
- Farbman, A. I. Renewal of taste bud cells in rat circumvallate papillae. *Cell Tissue Kinet* 13, 349-57. (1980).
- Ferguson, S. S. & Caron, M. G. G protein-coupled receptor adaptation mechanisms. *Semin Cell Dev Biol* 9, 119-27. (1998).
- Fields, T. A. & Casey, P. J. Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin- resistant G-proteins. *Biochem J* 321, 561-71. (1997).

- Glusman, G., Yanai, I., Rubin, I. & Lancet, D. The complete human olfactory subgenome. *Genome Res* 11, 685-702. (2001).
- Gregory, S. G. et al. A physical map of the mouse genome. *Nature* 418, 743-50. (2002).
- Guo, S. W. & Reed, D. R. The genetics of phenylthiocarbamide perception. *Ann Hum Biol* 28, 111-42. (2001).
- Hellekant, G., Ninomiya, Y. & Danilova, V. Taste in chimpanzees. III: Labeled-line coding in sweet taste. *Physiol Behav* 65, 191-200. (1998).
- Herness, M. S. & Gilbertson, T. A. Cellular mechanisms of taste transduction. *Annu Rev Physiol* 61, 873-900 (1999).
- Herness, S. Coding in taste receptor cells. The early years of intracellular recordings. *Physiol Behav* 69, 17-27. (2000).
- Herrmann, K. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 28, 315-47 (1989).
- Hoon, M. A. et al. Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell* 96, 541-51. (1999).
- Hoyle, C. H. Neuropeptide families and their receptors: evolutionary perspectives. *Brain Res* 848, 1-25. (1999).
- Huang, L. et al. Ggamma13 colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates IP3 responses to bitter denatonium. *Nat Neurosci* 2, 1055-62. (1999).
- Hyde, R. J. & Witherly, S. A. Dynamic contrast: a sensory contribution to palatability. *Appetite* 21, 1-16. (1993).
- Ishida, Y., Ugawa, S., Ueda, T., Murakami, S. & Shimada, S. Vanilloid receptor subtype-1 (VR1) is specifically localized to taste papillae. *Brain Res Mol Brain Res* 107, 17-22. (2002).
- Kaufman, R. J. Overview of vector design for mammalian gene expression. *Mol Biotechnol* 16, 151-60. (2000).

- Keast, R. S. & Breslin, P. A. Cross-adaptation and bitterness inhibition of L-tryptophan, L- phenylalanine and urea: further support for shared peripheral physiology. *Chem Senses* 27, 123-31. (2002).
- Kido, M. A., Muroya, H., Yamaza, T., Terada, Y. & Tanaka, T. Vanilloid receptor expression in the rat tongue and palate. *J Dent Res* 82, 393-7. (2003).
- Kim, U. K. et al. Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide. *Science* 299, 1221-5. (2003).
- Kohout, T. A. & Lefkowitz, R. J. Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol Pharmacol* 63, 9-18. (2003).
- Kostenis, E. Is Galpha16 the optimal tool for fishing ligands of orphan G-protein- coupled receptors? *Trends Pharmacol Sci* 22, 560-4. (2001).
- Kostenis, E. Potentiation of GPCR-signaling via membrane targeting of G protein alpha subunits. *J Recept Signal Transduct Res* 22, 267-81. (2002).
- Kostenis, E., Degtyarev, M. Y., Conklin, B. R. & Wess, J. The N-terminal extension of Galphaq is critical for constraining the selectivity of receptor coupling. *J Biol Chem* 272, 19107-10. (1997).
- Krautwurst, D., Yau, K. W. & Reed, R. R. Identification of ligands for olfactory receptors by unclonal expression of a receptor library. *Cell* 95, 917-26. (1998).
- Lamb, T. D. & Pugh, E. N., Jr. G-protein cascades: gain and kinetics. *Trends Neurosci* 15, 291-8. (1992).
- Laska, M. Gustatory responsiveness to food-associated saccharides in European rabbits, *Oryctolagus cuniculus*. *Physiol Behav* 76, 335-41. (2002).
- Lawless, H. Paradoxical adaptation to taste mixtures. *Physiol Behav* 29, 149-52. (1982).
- Lefkowitz, R. J. Identification and regulation of alpha- and beta-adrenergic receptors. *Fed Proc* 37, 123-9. (1978).
- Li, X. et al. Human receptors for sweet and umami taste. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4692-6. (2002).
- Lindemann, B. Taste reception. *Physiol Rev* 76, 718-66. (1996).

- Lindemann, B. Receptors and transduction in taste. *Nature* 413, 219-25. (2001).
- Linden, R. W. Taste. *Br Dent J* 175, 243-53. (1993).
- Liu, J., Blin, N., Conklin, B. R. & Wess, J. Molecular mechanisms involved in muscarinic acetylcholine receptor-mediated G protein activation studied by insertion mutagenesis. *J Biol Chem* 271, 6172-8. (1996).
- Liu, J., Conklin, B. R., Blin, N., Yun, J. & Wess, J. Identification of a receptor/G-protein contact site critical for signaling specificity and G-protein activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11642-6. (1995).
- Lush, I. E. The genetics of tasting in mice. I. Sucrose octaacetate. *Genet Res* 38, 93-5. (1981).
- Lush, I. E. The genetics of tasting in mice. III. Quinine. *Genet Res* 44, 151-60. (1984).
- Lush, I. E. The genetics of tasting in mice. IV. The acetates of raffinose, galactose and beta-lactose. *Genet Res* 47, 117-23. (1986).
- Lush, I. E. The genetics of tasting in mice. VI. Saccharin, acesulfame, dulcin and sucrose. *Genet Res* 53, 95-9. (1989).
- Lush, I. E. & Holland, G. The genetics of tasting in mice. V. Glycine and cycloheximide. *Genet Res* 52, 207-12. (1988).
- Lush, I. E., Hornigold, N., King, P. & Stoye, J. P. The genetics of tasting in mice. VII. Glycine revisited, and the chromosomal location of Sac and Soa. *Genet Res* 66, 167-74. (1995).
- Margolskee, R. F. Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. *J Biol Chem* 277, 1-4. (2002).
- Matsunami, H., Montmayeur, J. P. & Buck, L. B. A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature* 404, 601-4. (2000).
- Max, M. et al. Tas1r3, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus Sac. *Nat Genet* 28, 58-63. (2001).
- McCrary, M. A., Suen, V. M. & Roberts, S. B. Biobehavioral influences on energy intake and adult weight gain. *J Nutr* 132, 3830S-3834S. (2002).

- McLaughlin, S. K., McKinnon, P. J. & Margolskee, R. F. Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins. *Nature* 357, 563-9. (1992).
- Mela, D. J. Determinants of food choice: relationships with obesity and weight control. *Obes Res* 9 Suppl 4, 249S-255S. (2001).
- Miyaoka, Y. & Pritchard, T. C. Responses of primate cortical neurons to unitary and binary taste stimuli. *J Neurophysiol* 75, 396-411. (1996).
- Mody, S. M., Ho, M. K., Joshi, S. A. & Wong, Y. H. Incorporation of Galpha(z)-specific sequence at the carboxyl terminus increases the promiscuity of galpha(16) toward G(i)-coupled receptors. *Mol Pharmacol* 57, 13-23. (2000).
- Montmayeur, J. P., Liberles, S. D., Matsunami, H. & Buck, L. B. A candidate taste receptor gene near a sweet taste locus. *Nat Neurosci* 4, 492-8. (2001).
- Nasser, J. Taste, food intake and obesity. *Obes Rev* 2, 213-8. (2001).
- Nei, M., Xu, P. & Glazko, G. Estimation of divergence times from multiprotein sequences for a few mammalian species and several distantly related organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2497-502. (2001).
- Nelson, G. et al. An amino-acid taste receptor. *Nature* 416, 199-202. (2002).
- Nelson, G. et al. Mammalian sweet taste receptors. *Cell* 106, 381-90. (2001).
- Nelson, G. M. Biology of taste buds and the clinical problem of taste loss. *Anat Rec* 253, 70-8. (1998).
- Oakley, B. Taste neurons have multiple inductive roles in mammalian gustatory development. *Ann N Y Acad Sci* 855, 50-7. (1998).
- Offermanns, S., Negulescu, P., Hu, Y. H. & Simon, M. I. Conditionally expressed G alpha 15 couples to endogenous receptors in GH3 cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 364, 140-8. (2001).
- Offermanns, S. & Simon, M. I. G alpha 15 and G alpha 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C. *J Biol Chem* 270, 15175-80. (1995).

- Ohta, T. An examination of the generation-time effect on molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10676-80. (1993).
- Opekarova, M. & Tanner, W. Specific lipid requirements of membrane proteins-a putative bottleneck in heterologous expression. *Biochim Biophys Acta* 1610, 11-22. (2003).
- Ossebaard, C. A. & Smith, D. V. Effect of amiloride on the taste of NaCl, Na-gluconate and KCl in humans: implications for Na⁺ receptor mechanisms. *Chem Senses* 20, 37-46. (1995).
- Peier, A. M. et al. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108, 705-15. (2002).
- Perez, C. A. et al. A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nat Neurosci* 5, 1169-76. (2002).
- Pitcher, J. A., Freedman, N. J. & Lefkowitz, R. J. G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* 67, 653-92 (1998).
- Reed, D. R. et al. Localization of a gene for bitter-taste perception to human chromosome 5p15. *Am J Hum Genet* 64, 1478-80. (1999).
- Rehnberg, B. G., Hettinger, T. P. & Frank, M. E. The role of sucrose-sensitive neurons in ingestion of sweet stimuli by hamsters. *Physiol Behav* 48, 459-66. (1990).
- Ruuhola, T., Tikkanen, O. P. & Tahvanainen, J. Differences in host use efficiency of larvae of a generalist moth, *Operophtera brumata* on three chemically divergent *Salix* species. *J Chem Ecol* 27, 1595-615. (2001).
- Ruuhola, T. M. & Julkunen-Tiitto, M. R. Salicylates of intact *Salix myrsinifolia* plantlets do not undergo rapid metabolic turnover. *Plant Physiol* 122, 895-905. (2000).
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. *Molecular cloning a laboratory manual* (Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989).
- Sanborn, B. M., Yue, C., Wang, W. & Dodge, K. L. G protein signalling pathways in myometrium: affecting the balance between contraction and relaxation. *Rev Reprod* 3, 196-205. (1998).
- Sandrou, D. K. & Arvanitoyannis, I. S. Low-fat/calorie foods: current state and perspectives. *Crit Rev Food Sci Nutr* 40, 427-47. (2000).

- Saper, C. B., Chou, T. C. & Elmquist, J. K. The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron* 36, 199-211. (2002).
- Schiffman, S. S. Perception of taste and smell in elderly persons. *Crit Rev Food Sci Nutr* 33, 17-26 (1993a).
- Schiffman, S. S. & Gatlin, C. A. Sweeteners: state of knowledge review. *Neurosci Biobehav Rev* 17, 313-45. (1993b).
- Schiffman, S. S., Booth, B. J., Losee, M. L., Pecore, S. D. & Warwick, Z. S. Bitterness of sweeteners as a function of concentration. *Brain Res Bull* 36, 505-13 (1995).
- Sclafani, A. Psychobiology of food preferences. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 Suppl 5, S13-6. (2001).
- Seifert, R., Wenzel-Seifert, K. & Kobilka, B. K. GPCR-Galpa fusion proteins: molecular analysis of receptor-G-protein coupling. *Trends Pharmacol Sci* 20, 383-9. (1999).
- Shi, P., Zhang, J., Yang, H. & Zhang, Y. P. Adaptive diversification of bitter taste receptor genes in Mammalian evolution. *Mol Biol Evol* 20, 805-14. (2003).
- Skramlik, E. *Handbuch der Physiologie der Niederen Sinne* (Gerorg Thieme, Leipzig, 1926).
- Smith, D. V., John, S. J. & Boughter, J. D. Neuronal cell types and taste quality coding. *Physiol Behav* 69, 77-85. (2000).
- Smith, D. V. & Margolskee, R. F. Making sense of taste. *Sci Am* 284, 32-9. (2001).
- Smith, D. V. & Ossebaard, C. A. Amiloride suppression of the taste intensity of sodium chloride: evidence from direct magnitude scaling. *Physiol Behav* 57, 773-7. (1995).
- Smith, D. V. & St John, S. J. Neural coding of gustatory information. *Curr Opin Neurobiol* 9, 427-35. (1999).
- Spector, A. C. & Kopka, S. L. Rats fail to discriminate quinine from denatonium: implications for the neural coding of bitter-tasting compounds. *J Neurosci* 22, 1937-41. (2002).
- Stevens, D. R. et al. Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli. *Nature* 413, 631-5. (2001).

- Sugino, Y., Umemoto, A. & Mizutani, S. Insensitivity to the bitter taste of chloramphenicol: an autosomal recessive trait. *Genes Genet Syst* 77, 59-62. (2002).
- Sun, H. & Oakley, B. Development of anterior gustatory epithelia in the palate and tongue requires epidermal growth factor receptor. *Dev Biol* 242, 31-43. (2002).
- Takeda, M., Suzuki, Y., Obara, N. & Nagai, Y. Apoptosis in mouse taste buds after denervation. *Cell Tissue Res* 286, 55-62. (1996).
- Tepper, B. J. & Nurse, R. J. PROP taster status is related to fat perception and preference. *Ann N Y Acad Sci* 855, 802-4. (1998).
- Tepper, B. J. & Ullrich, N. V. Influence of genetic taste sensitivity to 6-n-propylthiouracil (PROP), dietary restraint and disinhibition on body mass index in middle-aged women. *Physiol Behav* 75, 305-12. (2002).
- Turnbull, B. & Matisoo-Smith, E. Taste sensitivity to 6-n-propylthiouracil predicts acceptance of bitter-tasting spinach in 3-6-y-old children. *Am J Clin Nutr* 76, 1101-5. (2002).
- Ueda, T. et al. Identification of coding single-nucleotide polymorphisms in human taste receptor genes involving bitter tasting. *Biochem Biophys Res Commun* 285, 147-51. (2001).
- Vane, J. R. The fight against rheumatism: from willow bark to COX-1 sparing drugs. *J Physiol Pharmacol* 51, 573-86. (2000).
- Varki, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 3, 97-130. (1993).
- Vickers, A. J. & Cassileth, B. R. Unconventional therapies for cancer and cancer-related symptoms. *Lancet Oncol* 2, 226-32. (2001).
- Waugh, M. G., Challiss, R. A., Berstein, G., Nahorski, S. R. & Tobin, A. B. Agonist-induced desensitization and phosphorylation of m1-muscarinic receptors. *Biochem J* 338, 175-83. (1999).
- Wellerdieck, C. et al. Functional expression of odorant receptors of the zebrafish *Danio rerio* and of the nematode *C. elegans* in HEK293 cells. *Chem Senses* 22, 467-76. (1997).
- Wilson, A. C., Carlson, S. S. & White, T. J. Biochemical evolution. *Annu Rev Biochem* 46, 573-639 (1977).

- Winkler, S., Garg, A. K., Mekayarajananonth, T., Bakaeen, L. G. & Khan, E. Depressed taste and smell in geriatric patients. *J Am Dent Assoc* 130, 1759-65. (1999).
- Woolston, D. C. & Erickson, R. P. Concept of neuron types in gustation in the rat. *J Neurophysiol* 42, 1390-409. (1979).
- Xu, H. et al. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* 418, 181-6. (2002).
- Yamaguchi, S. & Ninomiya, K. Umami and food palatability. *J Nutr* 130, 921S-6S. (2000).
- Yan, W. et al. Bitter taste transduced by PLC-beta(2)-dependent rise in IP(3) and alpha-gustducin-dependent fall in cyclic nucleotides. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C742-51. (2001).
- Young, J. M. et al. Different evolutionary processes shaped the mouse and human olfactory receptor gene families. *Hum Mol Genet* 11, 535-46. (2002a).
- Young, J. M. & Trask, B. J. The sense of smell: genomics of vertebrate odorant receptors. *Hum Mol Genet* 11, 1153-60. (2002b).
- Zhang, J. et al. Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor signaling: role of G protein-coupled receptor kinases and arrestins in receptor desensitization and resensitization. *Receptors Channels* 5, 193-9 (1997).
- Zhang, Y. et al. Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* 112, 293-301. (2003).

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Asn	Arginin
bp	Basenpaare
BSA	Albumin aus Rinderserum
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosin Monophosphat
cDNA	durch reverse Transkription hergestellte Desoxyribonukleinsäure
cRNA	durch in vitro Transkription hergestellte Ribonukleinsäure
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
°C	Grad Celsius
ca.	circa
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FLIPR	Flourescence Imaging Plate Reader
His	Histidin
HCl	Salzsäure
HEK293	Zelllinie aus humanen embryonalen Nierenzellen
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HSV-Epitop	Herpes Simplex Virus Glycoprotein D Epitop
EC ₅₀	Konzentration bei der die Hälfte der maximalen Aktivierung erreicht wird
EGFP	Enhanced Green Flourescence Protein
ENaC	epitheliale Natriumkanal
G	Gramm
G _{α15}	G-Protein Alpha Untereinheit G15
G _{αs}	G-Protein Alpha Untereinheit Gs
IMP	Inosinmonophosphat
IP ₃	Inositoltrisphosphat
l	Liter
Lys	Lysin
Min.	Minuten
mRNA	Boten Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information

nH	Hill-Koeffizient
mM	millimolar
μ M	micromolar
ml	Milliliter
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PLC	Phospholipase C
PLC- β -2	Phospholipase C beta zwei
PROP	6-N-Propyl-Thiouracil
PTC	Phenylthiocarbamid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR mit cDNA als Ausgangsmaterial
Sek.	Sekunden
SNP	Genpolymorphsimus
SST-Epitop	45 N-terminalen Aminosäuren des Somatostatinrezeptors Subtyp3
TAE	Tris Acetat EDTA Lösung
TAS1R	Süß/Umamirezeptor
TAS2R	Bitterrezeptorn
TSA	Signalamplifikation durch Tyramid
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
z. B.	zum Beispiel

Danksagung

Diese Arbeit wurde von vielen Personen unterstützt:

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Wolfgang Meyerhof, von dem ich gelernt habe, was Kontrolle und Planung von Experimenten wirklich bedeutet. Ich danke Ihm auch für die vielen Stunden intensiver wissenschaftlicher Diskussion, sowie die vielfältige personelle und finanzielle Unterstützung, vor allem in den ersten Jahren, als der Erfolg dieses Projektes noch nicht absehbar war.

Ellen Schöley-Pohl möchte ich besonders für ihre Mitarbeit sowie große Einsatzbereitschaft danken, die weit über das übliche Maß hinausgeht. Sie war an fast allen Teilen dieses Projektes beteiligt, insbesondere jedoch an der Durchführung vieler FLIPR-Experimente, sowie Teilen der Klonierungs- und immunocytochemischen Arbeiten.

Dietmar Krautwurst danke ich für die Durchführung der Einzelzell-Calcium-Imaging Experimente, sowie für seine Ideen zur Analyse der Signaltransduktion von hTAS2R16. Sein Rat und seine große Erfahrung, bei der funktionellen Expression olfaktorischer Rezeptoren, haben wesentlich zur erfolgreichen funktionellen Analyse der TAS2R-Rezeptoren beigetragen.

Thomas Hofmann (Münster) danke ich für die schnelle und gute Durchführung sowie die Auswertung der psychophysikalischen Experimente, sowie für Informationen zu den Schwellwerten und chemischen Strukturen einiger Bitterstoffe. Ich hoffe, seine Probanden mussten bei den sicherlich manchmal unangenehmen Versuchen nicht zu sehr leiden.

Jan-Dirk Raguse (Berlin), sowie seinen Patienten möchte ich für das menschliche Zungenmaterial danken, das es ermöglicht hat, die Rezeptorexpression nachzuweisen.

Ellena Chirokova danke ich für die Überlassung der von ihr erzeugten $G_{\alpha 15}$ exprimierenden HEK293 Zelllinie, mit der die meisten FLIPR-Experimente durchgeführt wurden.

Marcel Winnig, Jenny Stehr, danke ich für ihre Hilfe bei der Klonierung einiger TAS2R-Rezeptoren.

Mein besonderer Dank gilt auch allen Korrektoren dieser Arbeit, die den Anteil der typographischen Fehler stark reduziert haben.

Ich danke auch allen Mitarbeitern der Abteilung Molekulare Genetik für die gute Zusammenarbeit, Diskussionsbereitschaft und ihren vielfältigen Rat sowie für ihre Geduld, meine Begeisterung über gelungene Experimente auch dann zu ertragen, wenn es sie nicht wirklich interessiert hat.

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die Arbeit wurde noch an keiner anderen Hochschule zur Begutachtung eingereicht.

Ferch, den 12.05.03

Bernd Bufe