

Bittergeschmacksrezeptoren des peripheren und zentralen Nervensystems

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium"
(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von

Antje Stolzenburg

Potsdam, 2016

This work is licensed under a Creative Commons License:
Attribution 4.0 International
To view a copy of this license visit
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Published online at the
Institutional Repository of the University of Potsdam:
URN [urn:nbn:de:kobv:517-opus4-92397](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-92397)
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-92397>

Manchmal brauchen wir nicht viel, um glücklich zu sein.

Nur das richtige Wort zur richtigen Zeit.

Nur ein kleines Licht in der Dunkelheit.

Madsen - der Moment -

Inhalt

Inhalt	V
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XIV
Abkürzungsverzeichnis	XVI
1 Einleitung	1
1.1 Geschmackssinn	1
1.2 Geschmackswahrnehmung in der Peripherie	1
1.2.1 Geschmacksrezeptoren.....	3
1.2.2 Signaltransduktion in Geschmacksrezeptorzellen am Beispiel eines Bittergeschmackrezeptors.....	5
1.3 Signalübertragung und -weiterleitung ins Gehirn.....	6
1.4 Verarbeitung der Geschmacksinformation.....	8
1.5 Extra-gustatorische Expression von Geschmacksrezeptoren	9
1.5.1 Gastrointestinales System.....	10
1.5.2 Respirationssystem	10
1.5.3 Reproduktionssystem	10
1.5.4 Zentrales und peripheren Nervensystem	11
1.6 Ziele dieser Arbeit	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 Laborgeräte.....	15
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien	16
2.1.3 Geschmacksstoffe	17
2.1.4 Lösungen und Puffer	18
2.1.5 Plasmide	18
2.1.6 Oligonukleotide.....	19
2.1.6.1 Oligonukleotide für Genotypisierungs- und Endpunkt-RT-PCR.....	19
2.1.6.2 Oligonukleotide für quantitative RT-PCR –Analysen	20
2.1.7 Antikörper	23
2.1.8 Versuchstiere	23
2.1.8.1 Tas2r131 ^{BLIG} – Mauslinie.....	24
2.1.8.2 Tas2r131 ^{BLIC} – Mauslinie.....	24

2.1.8.3	Tas2r131 ^{BLIC} /Rosa26 ^{DTA} - Mauslinie.....	24
2.1.8.4	Tas2r131 ^{BLIC} /Rosa26 ^{tauGFP} - Mauslinie	25
2.1.8.5	Tas2r131 ^{BLIC} /Rosa26 ^{TeNT} - Mauslinie.....	25
2.1.9	Software.....	25
2.2	Methoden	26
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	26
2.2.1.1	Konventionelle Polymerasekettenreaktion (PCR)	26
2.2.1.2	Agarosegelelektrophorese.....	26
2.2.1.3	Isolation und Reinigung von DNA-Fragmenten	27
2.2.1.4	Genotypisierung von Mäusen.....	27
2.2.1.4.1	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol –Aufreinigung - DNA Isolation aus Mausschwanzspitzen.....	27
2.2.1.4.2	Genotypisierungs-PCRs.....	28
2.2.1.5	Photometrische Bestimmung von RNA und DNA-Konzentrationen.....	28
2.2.1.6	Sequenzierung	28
2.2.1.7	RNA-Isolation aus murinen Geweben.....	28
2.2.1.8	cDNA-Synthese (Reverse Transkription).....	28
2.2.1.9	Reverse Transkription-PCR (RT-PCR).....	29
2.2.1.10	Quantitative Reverse Transkription-PCR (qRT-PCR)	30
2.2.1.10.1	Prinzip der quantitativen Real-Time-PCR nach TaqMan	31
2.2.1.10.2	Aufzeichnung und Auswertung der Daten	32
2.2.1.11	<i>In-vitro</i> Transkription zur Herstellung von RNA-Sonden	32
2.2.1.12	Dot Blot- Hybridisierung	33
2.2.1.13	<i>In-situ</i> -Hybridisierung (ISH).....	34
2.2.1.13.1	Fluoreszenz - <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH) - manuell	34
2.2.1.13.1.1	FISH - Vorbehandlung der Schnitte – Prähybridisierung	34
2.2.1.13.1.2	FISH - Waschschritte nach der Hybridisierung und Detektion	35
2.2.1.13.2	<i>In-situ</i> -Hybridisierung mittels Pipettierroboter.....	36
2.2.1.13.2.1	Vorbehandlung der Gewebeschnitte.....	36
2.2.1.13.2.2	<i>In-situ</i> -Hybridisierung nach <i>Arc</i> mittels Pipettierautomat (Tecan).....	36
2.2.1.13.2.3	ISH - Waschschritte nach der Hybridisierung und Detektion	37
2.2.1.13.2.4	Auswertung der Daten.....	37
2.2.1.13.2.4.1	Auszählung der <i>Arc</i> -exprimierenden Zellen im NTS	37
2.2.1.13.2.4.2	Auszählung der <i>Arc</i> -exprimierenden Zellen im NPG	38
2.2.1.13.3	<i>In-situ</i> -Hybridisierung mit anschließender Immunhistochemie (manuell).....	38

2.2.2	Mausarbeiten.....	38
2.2.2.1	Haltungs- und Zuchtbedingungen.....	38
2.2.2.2	Gewebeentnahme	39
2.2.2.3	Perfusion mit Paraformaldehyd.....	39
2.2.2.4	Perfusion mit RNAlater	39
2.2.2.5	Stimulationsexperimente.....	40
2.2.2.6	Anfertigung von Gewebeschnitten	40
2.2.2.7	Kurzzeitpräferenztest mit Mäusen	41
2.2.2.8	Zwei-Flaschen-Präferenztest.....	43
2.2.3	Immunhistochemie	45
2.2.3.1	Direkte Immunfluoreszenz / intrinsische Fluoreszenz	45
2.2.3.2	Indirekte Immunfluoreszenz	45
2.2.4	Mikroskopie	47
2.2.4.1	Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	47
2.2.4.2	Automatisiertes Fluoreszenzmikroskop.....	47
3	Ergebnisse	48
3.1	Expression von Bittergeschmacksrezeptoren im peripheren und zentralen Nervensystem. 48	
3.1.1	Expressionsanalysen im zentralen Nervensystem mittels RT-PCR-Analyse	48
3.1.2	Expressionsanalysen im zentralen Nervensystem mittels qRT-PCR	51
3.1.3	Expressionsanalysen aller Bittergeschmacksrezeptoren in ausgewählten Gehirnregionen mittels qRT-PCR in verschiedenen Mauslinien.....	53
3.1.3.1	Expressionsanalysen in der thalamischen Region.....	54
3.1.3.2	Expressionsanalysen im medialen Mesencephalon.....	55
3.1.3.3	Expressionsanalysen im Cerebellum	59
3.1.4	Auswirkung der Manipulation von Tas2r131-Zellen auf die Expression ausgewählter Tas2rs im Gehirn.....	60
3.1.4.1	Einfluss der Manipulation von Tas2r131-Neuronen auf die Tas2r-Expression im medialen Mesencephalon	61
3.1.4.2	Einfluss der Manipulation von Tas2r131-Neuronen auf die Tas2r-Expression im Cerebellum	62
3.1.4.3	Einfluss der Manipulation von Tas2r131-Zellen auf die Tas2r-Expression in der Wallpapille.....	63
3.1.4.4	Vergleich des Einflusses der Manipulation von Tas2r131-Zellen auf die Tas2r-Expression im ZNS und der Zunge	64
3.1.5	Expressionsanalysen im Rückenmark	64
3.1.6	Nachweis der Expressionsstärke von Bitterrezeptoren im peripheren Nervensystem... 65	

3.1.6.1	Ganglien nodosum/petrosum (NPG).....	65
3.1.6.2	Ganglien geniculi (GG).....	66
3.1.6.3	Vergleich der Expression von Bitterrezeptoren im peripheren und zentralen Nervensystem.....	67
3.2	Nachweis einzelner Bitterrezeptoren auf zellulärer Ebene mittels Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	68
3.2.1	Validierung der RNA-Sonden im Zungengewebe.....	68
3.2.2	Visualisierung von Bitterrezeptoren auf zellulärer Ebene im ZNS.....	71
3.2.2.1	Thalamische Region	71
3.2.2.2	Mediales Mesencephalon	71
3.2.2.3	Cerebellum	76
3.3	Identifikation des Zelltyps von Tas2r-exprimierenden Zellen im ZNS	79
3.3.1	Visualisierung von Tas2r131/tauGFP-exprimierenden und cholinergen Neuronen.....	79
3.3.2	Visualisierung von Tas2r131/tauGFP-exprimierenden und dopaminergen Neuronen...	80
3.3.3	Visualisierung von Tas2r131/tauGFP-exprimierenden und GABAergen Neuronen	81
3.3.4	Visualisierung von Tas2r131/tauGFP-exprimierenden mit glutamatergen Neuronen....	82
3.3.5	Visualisierung von Tas2r131/tauGFP-exprimierenden und glycinerg-angesteuerten Neuronen.....	84
3.3.6	Visualisierung von Tas2r131/tauGFP-exprimierenden und noradrenergen Neuronen ..	85
3.3.7	Visualisierung von Tas2r131/tauGFP-exprimierenden und Enkephalin positiven Neuronen.....	87
3.3.8	Visualisierung von Tas2r131/tauGFP-exprimierenden und serotonergen Neuronen.....	87
3.3.9	Visualisierung von Tas2r131/tauGFP-exprimierenden Neuronen und Interneuronen ...	89
3.3.10	Studien zur Koexpression von Tas2r-exprimierender Neuronen mit Gustducin.....	90
3.3.10.1	Koexpression von Tas2r131/tauGFP-exprimierenden Neuronen mit Gustducin	90
3.3.10.2	Koexpression von Tas2r135-exprimierenden Neuronen mit Gustducin	91
3.4	Neuronale Projektion von Tas2r131/tauGFP-exprimierender Zellen.....	92
3.5	<i>Arc</i> -Expression im Ganglion-Gewebe.....	94
3.5.1	<i>Arc</i> -Expressionsanalysen im Gangliengewebe von C57BL/6-Tieren.....	95
3.5.2	<i>Arc</i> -Expressionsanalysen in Tas2r131 ^{+/<i>BLOC</i>} / <i>Rosa26</i> ^{+/<i>TeNT</i>} - im Vergleich zu Kontrolltieren	97
3.6	Kurzzeitpräferenztests	98
3.7	Zwei-Flaschen-Präferenz-Tests	102
4. Diskussion	106
4.1	Tas2r-Expressionsanalysen im zentralen Nervensystem.....	106
4.1.1	Tas2r-Expression	106
4.1.2	Tas2r-Expressionsmuster in Abhängigkeit der chromosomalen Lage	106

4.1.3	Ubiquitäre gegen selektive Tas2r-Expression.....	107
4.1.4	Tas2r-Expressionsstärke	108
4.1.5	Tas2r-Expressionsanalysen in Tas2r131 ^{BLIG-} , Tas2r131 ^{BLIC/Rosa26^{DTA-}} und Tas2r131 ^{BLIC/Rosa26^{TeNT-}} -Mäusen.....	109
4.1.6	Tas2r-Expression im Nervengewebe und in peripheren Geweben	111
4.2	Identifizierung Tas2r-exprimierender Zellen	112
4.2.1	Detektion von Tas2r-exprimierenden Zellen mittels Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	112
4.2.2	Identifizierung des Zelltyps Tas2r131/tauGFP-exprimierender Zellen.....	114
4.2.2.1	Tas2r131/tauGFP-exprimierende Zellen sind in verschiedenen Neuronenpopulationen lokalisiert.....	114
4.2.2.2	Beispiel einer Projektion Tas2r131/tauGFP-exprimierender Neurone in das Kerngebiet des Trapezkörpers.....	115
4.3	Tas2r131-exprimierende Neurone	116
4.3.1	<i>Arc</i> -Expression im NPG	116
4.3.2	<i>Arc</i> -Expressionsanalysen in Tas2r131 ^{BLIC/Rosa26^{TeNT-}} -Tieren stützen die Funktionalität des Tier-Modells	118
4.3.3	Kurzzeitpräferenztests mit Tas2r131 ^{BLIC/Rosa26^{TeNT-}} -Mäusen.....	118
4.3.4	Potentielle Funktionen Tas2r-exprimierender Neurone als Chemosensoren	122
4.3.5	Mögliche Diskriminierung von Bittersubstanzen.....	124
	Zusammenfassung	128
	Literatur	129
	Anhang A	141
Abb. A1	Chromosomale Lage der Bitterrezeptoren der Maus auf dem Chromosomen 2,6 und 15	141
Tab. A1	Daten der qRT-PCR von 19 Tas2rs in neun Gehirnregionen	142
Tab. A2	Daten der qRT-PCR von 35 Tas2rs in der thalamischen Region	143
Tab. A3	Daten der qRT-PCR von 35 Tas2rs des medialen Mesencephalons	144
Tab. A4	Daten der qRT-PCR von 35 Tas2rs des Cerebellums.....	145
Tab. A5	Daten der qRT-PCR von 10 Tas2rs im medialen Mesencephalon in sechs Mausgruppen	146
Tab. A6	Daten der qRT-PCR von 10 Tas2rs im Cerebellum in sechs Mausgruppen.....	147
Tab. A7	Daten der qRT-PCR von 10 Tas2rs im Gewebe der Wallpapille in sechs Mausgruppen	148
Tab. A8	Daten der qRT-PCR von 10 Tas2rs im Rückenmark	148
Tab. A9	Daten der qRT-PCR von 10 Tas2rs im NPG	149
Tab. A10	Daten der qRT-PCR von 10 Tas2rs im GG	149

Abb. A2	Vergleich der Expressionspegel von zehn Bitterrezeptoren im Gewebe des <i>Musculus quadriceps femoris</i>	150
Tab. A11	Daten der qRT-PCR von 10 Tas2rs im Muskelgewebe.....	150
Tab. A12	<i>Arc</i> -Expression im NPG in C57BL/6-Tieren	150
Tab. A13	<i>Arc</i> -Expression im NPG der Tas2r131 ^{BLIC} /Rosa26 ^{TeNT} Mauslinie	151
Tab. A14	<i>Arc</i> -Expression im NTS der Tas2r131 ^{BLIC} /Rosa26 ^{TeNT} Mauslinie	151
Tab. A15	Daten des Flüssigkeitskonsums von C57BL/6-Tieren im Zwei-Flaschen-Präferenz-Test	151
Tab. A16	Bitter/Wasser-Konsum-Verhältnisse.....	152
Tab. A17	Daten des Flüssigkeitskonsums von C57BL/6-Tieren im Zwei-Flaschen-Präferenz-Tests Bitter vs. Bitter	152
Abb. A3	Dosis-Wirkungskurven nach Kurzzeitpräferenztest mit Chlorhexidin, Erythromycin und Cucurbitacin I mit Tas2r131 ^{BLIC} /Rosa26 ^{DTA} - und Tas2r131 ^{BLIC} /Rosa26 ^{TeNT} -Mäusen	153
Danksagung		154
Selbständigkeitserklärung		155

Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1.1 Schematische Darstellung der Lokalisation der Geschmackspapillen</i>	2
<i>Abb. 1.2 Schematische Abbildung einer Geschmacksknospe</i>	5
<i>Abb. 1.3A Schematische Darstellung der Signaltransduktion in Geschmacksrezeptorzellen</i>	6
<i>Abb. 1.3B Schematische Darstellung der drei Hauptzelltypen in der Geschmacksknospe</i>	6
<i>Abb. 1.4 Darstellung der Weiterleitung der Geschmacksinformation in der Maus</i>	7
<i>Abb. 1.5 Immunhistochemische Färbungen verschiedener Zellpopulationen im Gehirn in Kombination mit der Visualisierung von Tas2r131-exprimierenden Zellen</i>	12
<i>Abb. 1.7 Identifizierung Tas2r131/tauGFP-exprimierender Zellen entlang der Geschmacksbahn</i>	13
<i>Abb. 2.1 Beispiel eines Amplifikations-Plots (β-Actin)</i>	30
<i>Abb. 2.2 Lokalisation der neun Hirnregionen</i>	40
<i>Abb. 2.3 Das Lickometersystem zur Detektion von Geschmackspräferenzen</i>	42
<i>Abb. 2.4 Protokolle der Kurzzeitpräferenztests</i>	44
<i>Abb. 2.5 Zeitlicher Ablauf der Zwei-Flaschen-Präferenztest-Analysen</i>	45
<i>Abb. 3.1 Lage und Anordnung der Bitterrezeptoren auf den Chromosomen</i>	50
<i>Abb. 3.2 RT-PCR Analysen von 19 Bitterrezeptoren in den neun Gehirnregionen</i>	52
<i>Abb. 3.3 Zusammenfassung der RT-PCR-Analysen der neun Gehirnregionen</i>	51
<i>Abb. 3.4 Quantitative RT-PCR-Daten der 19 Bitterrezeptoren in den neun Hirnregionen</i>	53
<i>Abb. 3.5 Zusammenfassung der qRT-PCR-Analysen der neun Gehirnregionen</i>	54
<i>Abb. 3.6 Quantitative RT-PCR Analysen aller 35 Bittergeschmacksrezeptoren im Bereich der thalamischen Region</i>	57
<i>Abb. 3.7 Quantitative RT-PCR Analysen aller 35 Bittergeschmacksrezeptoren im Bereich des medialen Mesencephalon</i>	58
<i>Abb. 3.8 Quantitative RT-PCR Analysen aller 35 Bittergeschmacksrezeptoren im Cerebellum</i>	59
<i>Abb. 3.9 Kombinierte Ergebnisse der Tas2r Expressionsanalysen mittels qRT-PCR in drei ausgewählten Gehirnregionen</i>	60
<i>Abb. 3.10 Vergleich der Expressionspegel von zehn Bittergeschmacksrezeptoren im medialen Mesencephalon in sechs Mausgruppen</i>	62
<i>Abb. 3.11 Vergleich der Expressionspegel von zehn Bittergeschmacksrezeptoren im Cerebellum in sechs Mausgruppen</i>	63
<i>Abb. 3.12 Vergleich der Expressionspegel von zehn Bittergeschmacksrezeptoren in der Wallpapille</i> ..	64
<i>Abb. 3.13 Quantitative RT-PCR Analysen von zehn Bittergeschmacksrezeptoren im Bereich des Rückenmarks</i>	66
<i>Abb. 3.14 Vergleich der Expressionspegel von zehn Bitterrezeptoren im NPG</i>	67

<i>Abb. 3.15 Vergleich der Expressionspegel von zehn Bitterrezeptoren im GG</i>	<i>68</i>
<i>Abb. 3.16 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung der generierten RNA-Sonden im Zungengewebe der Wallpapille.....</i>	<i>70-71</i>
<i>Abb. 3.17 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zum Nachweis verschiedener Tas2r-exprimierender Zellen in der thalamischen Region</i>	<i>73-74</i>
<i>Abb. 3.18 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zum Nachweis verschiedener Tas2r-exprimierender Zellen im periaquäduktalen Grau im medialen Mesencephalon</i>	<i>75-76</i>
<i>Abb. 3.19 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zum Nachweis verschiedener Tas2r-exprimierender Zellen im Cerebellum.....</i>	<i>78-79</i>
<i>Abb. 3.20 Visualisierung Tas2r131/tauGFP-exprimierender und cholinergischer Neurone</i>	<i>81</i>
<i>Abb. 3.21 Visualisierung Tas2r131/tauGFP-exprimierender und dopaminergischer Neurone</i>	<i>82</i>
<i>Abb. 3.22 Visualisierung Tas2r131/tauGFP-exprimierender und GABAergischer Neurone</i>	<i>83</i>
<i>Abb. 3.23 Visualisierung Tas2r131/tauGFP-exprimierender sowie glutamaterger Neurone durch VG1</i>	<i>84</i>
<i>Abb. 3.24 Visualisierung Tas2r131/tauGFP-exprimierender sowie glutamaterger Neurone durch VG2</i>	<i>85</i>
<i>Abb. 3.25 Visualisierung Tas2r131/tauGFP-exprimierender und glycinerg-angesteuerter Neurone....</i>	<i>86</i>
<i>Abb. 3.26 Visualisierung Tas2r131/tauGFP-exprimierender und noradrenerger Neurone.....</i>	<i>87</i>
<i>Abb. 3.27 Visualisierung von Tas2r131/tauGFP-exprimierenden und Enkephalin-positiver Neuronen</i>	<i>88</i>
<i>Abb. 3.28 Visualisierung Tas2r131/tauGFP-exprimierender und serotonergischer Neurone</i>	<i>89</i>
<i>Abb. 3.29 Visualisierung von Tas2r131/tauGFP-exprimierenden und Interneuronen.....</i>	<i>90</i>
<i>Abb. 3.30 Visualisierung von Tas2r131/tauGFP- und Gustducin-exprimierender Zellen</i>	<i>92</i>
<i>Abb. 3.31 Visualisierung von Tas2r135- und Gustducin-exprimierender Zellen im Hirnstamm.....</i>	<i>93</i>
<i>Abb. 3.32 Darstellung der neuronalen Projektion Tas2r131-exprimierender Nervenfasern.....</i>	<i>94</i>
<i>Abb. 3.33 Darstellung der neuronalen Projektion von Tas2r131/tauGFP-Nervenfasern (grün) auf Neurone im Kerngebiet des Trapezkörpers</i>	<i>94</i>
<i>Abb. 3.34 Darstellung der Projektion Tas2r131/tauGFP-Zellen entlang des Tractus pyramidalis</i>	<i>95</i>
<i>Abb. 3.35 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Visualisierung der Arc-RNA im NPG nach Bitterstimulation von Mäusen.....</i>	<i>97</i>
<i>Abb. 3.36 Daten der nukleären Arc-Expression im NPG von C57BL/6-Mäusen.....</i>	<i>97</i>
<i>Abb. 3.37 Daten der nukleären Arc-Expression im NPG in Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT} und Kontrolltieren nach Stimulation.....</i>	<i>99</i>
<i>Abb. 3.38 Daten der nukleären Arc-Expression im NTS in Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT} und Kontrolltieren nach Stimulation.....</i>	<i>99</i>
<i>Abb. 3.39 Dosis-Wirkungskurven nach Kurzzeitpräferenztests mit Kontrollstimuli</i>	<i>101</i>

<i>Abb. 3.40 Dosis-Wirkungskurven nach Kurzzeitpräferenztests mit Bittersubstanzen.....</i>	<i>102</i>
<i>Abb. 3.41 Zwei-Flaschen-Präferenz-Tests über einen Zeitraum von 48 h</i>	<i>104</i>
<i>Abb. 3.42 Einzeldarstellung der konsumierten Flüssigkeiten</i>	<i>105</i>
<i>Abb. 3.43 Zwei-Flaschen-Präferenz-Tests Bittersubstanz gegen Bittersubstanz</i>	<i>106</i>
<i>Abb. 4.1 Lage von Tas2r135-exprimierenden Zellen im Cerebellum</i>	<i>115</i>
<i>Abb. 4.2 Schematische Darstellung des Kerngebiets des Trapezkörpers</i>	<i>117</i>
<i>Abb. 4.3 Darstellung verschiedener neuronaler Zelltypen im NPG.</i>	<i>118</i>
<i>Abb. 4.4 Schematische Darstellung der unterschiedlichen Geschmacksbahnen.....</i>	<i>121</i>
<i>Abb. 4.5 Dosis-Wirkungskurven nach Kurzzeitpräferenztest mit Papaverin mit Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA} und Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}-Mäusen.</i>	<i>122</i>
<i>Abb. 4.6 Schematische Darstellung der potentiellen Zusammenhänge bzw. Differenzen der Informationsweiterleitung bzw. -verarbeitung basierend auf dem Liganden-Rezeptor-Spektrum</i>	<i>127</i>

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Laborgeräte.....	15
Tab. 2.2	Chemikalien und Enzyme	16
Tab. 2.3	verwendete Geschmacksstoffe.....	17
Tab. 2.4	Plasmide mit Rezeptorsequenz	18
Tab. 2.5	Primer für Genotypisierungen von Mäusen	19
Tab. 2.6	Primer für Endpunkt-RT-PCR.....	19
Tab. 2.7	qRT-PCR-Primer/Sonden	20
Tab. 2.8	Primär- und Sekundärantikörper sowie weitere Farbstoffe.....	23
Tab. 2.9	Tierversuchsanträge (TVA).....	23
Tab. 2.10	Mauslinien	24
Tab. 2.11	Software.....	25
Tab. 2.12	Allgemeiner Reaktionsansatz sowie Konditionen einer PCR.....	26
Tab. 2.13	Protokoll und Konditionen der RT-PCR-Analysen.....	29
Tab. 2.14	Spezifische Temperatur zur Primeranlagerung für die RT-PCR-Analysen der verschiedenen Bittergeschmacksrezeptoren	30
Tab. 2.15	Allgemeiner Reaktionsansatz sowie Konditionen einer qRT-PCR	31
Tab. 2.16	Taqman Fluoreszenzfarbstoffe	31
Tab. 2.17	Reaktionsansatz einer in-vitro Transkription.....	32
Tab. 2.18	Dot Blot - Hybridisierungsschritte.....	33
Tab. 2.19	Schritte zur Vorbehandlung der Gefrierschnitte für die in-situ-Hybridisierung für Zungen- und Gehirngewebe	35
Tab. 2.20	Waschschritte nach der Hybridisierung für Zungen- und Gehirnschnitte.....	35
Tab. 2.21	Prähybridisierungsschritte für Gehirn- und Gangliengewebe mittels Pipettierautomat.....	37
Tab. 2.22	Waschschritte nach der Hybridisierung für Gehirn- und Ganglienschnitte mittel Pipettierautomat	37
Tab. 2.23	Inkubations- und Waschschritte für eine Kombination von in-situ-Hybridisierung und immunhistochemischer Färbung bei Gehirnschnitten.....	39
Tab. 2.24	Liste der präparierten Hirnregionen	40
Tab. 2.25	Verwendete Geschmacksstimuli und deren Konzentrationsbereich in Kurzzeitpräferenztests mit Mäusen der Linie Tas2r131 ^{BLIC} /Rosa26 ^{TeNT}	43
Tab. 2.26	Verwendete Bittergeschmacksstimuli während der 48 h-Zwei-Flaschen-Präferenztests....	45
Tab. 2.27	Inkubations- und Waschschritte während einer immunhistochemischen Färbung.....	47
Tab. 2.28	Verwendete Primärantikörper bzw. –seren	47

<i>Tab. 2.29 Übersicht verwendeter Farbstoffe</i>	<i>48</i>
<i>Tab. 2.30 Übersicht verwendeter Filtersätze bei Nutzung eines automatisierten Fluoreszenzmikroskops.....</i>	<i>48</i>
<i>Tab. 3.1 Ligand-Rezeptor-Beziehungen während der Kurzzeitpräferenztests.....</i>	<i>101</i>
<i>Tab. 3.2 Ligand-Rezeptor-Beziehung von Bittersubstanzen im Zwei-Flaschen-Präferenz-Test.....</i>	<i>105</i>

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Arc	immediate early gene Arc
as	antisense
BLIC	barley lectin- IRES-Cre-Rekombinase
BLIG	barley lectin- IRES-hrGFP
BM	Bittermix
Bul.	Bulbus olfactorius
catFISH	Cellular compartment analysis of temporal activity by fluorescence in situ hybridization
Cb.	Calbindin
cDNA	complementary DNA
Cer.	Cerebellum
ChAT	Choline Acetyltransferase
Chi.	Chinin
cMes.	caudales Mesencephalon inklusive Pons
Cul	Cucurbitacin I
Cyx	Cycloheximid
DAG	Diacylglycerol
DIG	Digoxigenin markiert
DR	Nucleus raphe dorsalis
DTA	Diphtherie Toxin A
D β H	Dopamin- β -Hydroxylase
ENaC	epithelialer Natriumkanal
Enk.	Enkephalin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
for.	forward
Fos	immediate early gene Arc
GAD	Glutamat-Decarboxylase
GDP	Guanosindiphosphat
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GG	Ganglion geniculum
GIT	Gastrointestinaltrakt
GLAST	Glutamat/Aspartat Transporter
Gly.	Glycinrezeptor Untereinheiten $\alpha 1 + 2$
GPCR	G-protein-coupled receptor
GTP	Guanosintriphosphat
Gust.	α -Gustducin
hrGFP	Humanized Renilla reniformis green fluorescent protein
Hypo.	Hypothalamus
IHC	Immunhistochemie
IP3	Inositoltrisphosphat
IRES	internal ribosomal entry site

ISH	<i>In-situ</i> -Hybridisierung
IX Hirnnerv	Nervus glossopharyngeus
mMes.	medialer Mesencephalon inklusive PAG
NeuN	neuronaler Biomarker
nNOS	Neuronale NO-Synthase
NPG	Ganglion nodosum/petrosum
NTPDase2	Nucleosid-triphosphat-diphospho-hydrolase 2
NTS	<i>Nucleus tractus solitarii</i>
P2X	Purinergere Rezeptor der Klasse ligandengesteuerter Ionenkanal
P2Y	Purinergere Rezeptor der Klasse G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
PAG	periaquäduktales Grau
Panx1	Pannexin 1 Hemikanal
PBN	Nucleus parabrachialis
PCR	Polymerase chain reaction
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC β 2	Phospholipase C β 2
PNS	Peripheres Nervensystem
PROP	Propylthiouracil
rev.	revers
RNA	Ribonucleic acid
ROMK	ATP-abhängiger Kaliumkanal
RT	Raumtemperatur
s	sense
SD	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
Tas1r	taste receptor family 1
Tas2r	taste receptor family 2
tauGFP	tau green fluorescent protein
TeNT	Tetanus Toxin (Leichte Kette)
TH.	Tyrosinhydroxylase
Thal.	thalamische Region inklusive: Thalamus, Basalganglien, Striatum
TP	<i>Tractus pyramidalis</i>
TPH	Tryptophanhydroxylase 2
TRPM5	transient receptor potential cation channel subfamily M member 5
TRPV1	Transient Receptor Potential Vanilloid 1
TTP	Thymidintriphosphat
UTP	Uridintriphosphat
VG1/VGLUT1	versikulärer Glutamattransporter 1
VG2/VGLUT2	versikulärer Glutamattransporter 2
VII Hirnnerv	Nervus facialis
X Hirnnerv	Nervus Vagus
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Der Geschmackssinn

Der Geschmackssinn ist ein chemischer Nahrungssinn und dient der Bewertung der Nahrung (Lindemann, 2001). Derzeit sind fünf Geschmacksqualitäten bekannt: süß, sauer, salzig, umami und bitter. Der Geschmack von süß und umami kennzeichnet energiereiche Nahrung wie Kohlenhydrate und Aminosäuren, die dem Organismus zugeführt werden müssen. Beide Geschmacksqualitäten gelten vorwiegend als attraktiv. Ein saurer und bitterer Geschmack gilt dagegen meist als Warnsignal vor unreifer, verdorbener oder giftiger Nahrung (Lindemann 1996, Behrens und Meyerhof, 2006). Durch Vermeidung und Ablehnung von aversiven Stimuli bei saurer oder bitterer Nahrung kann ein Schaden des Organismus durch potentiell toxische Substanzen reduziert bzw. vermieden werden.

Die Detektion von Salz ist an der Regulation des Mineralstoffhaushaltes beteiligt (Lindemann, 2001); hierbei entscheiden die Art und die Konzentration, ob es als attraktiv oder aversiv empfunden wird. So wird Natriumchlorid in geringen Konzentrationen präferiert, in hohen Konzentrationen dagegen vermieden (Scott, 2005).

Neben diesen fünf Geschmacksqualitäten wird derzeit auch fettig als Geschmacksart diskutiert. Als Makronährstoffe besitzen Fette einen sehr hohen Energiegehalt. Zudem sind Menschen und Nagetiere auf essentielle Fettsäuren angewiesen, die dem Organismus von außen mit der Nahrung zugeführt werden müssen. Erste Experimente weisen nun darauf hin, dass auch für Fette und Fettsäuren eine spezielle Geschmackswahrnehmung existiert (Gaillard et al., 2008, Cartoni et al., 2010, Galindo et al., 2012, Voigt et al., 2014).

Darüber hinaus wurde die mögliche Existenz weiterer Geschmacksqualitäten wie metallisch oder wässrig diskutiert (Lawless et al., 2004, Rosen et al., 2010).

Die Einschätzung der Qualität der aufgenommenen Nahrung hängt dabei nicht allein von der Gustatorik ab. Nur zu 20 % wird die Nahrung in der Mundhöhle durch den Geschmackssinn bewertet. Mit den anderen ca. 80 % aus Geruchsinformation sowie haptischen Einflüssen werden die Signale im Gehirn zu einer komplexen multimodalen Wahrnehmung, dem eigentlichen „Schmecken“ zusammengesetzt (Small und Prescott, 2005, Bult et al., 2007).

1.2 Geschmackswahrnehmung in der Peripherie

Die initiale Wahrnehmung der fünf Geschmacksqualitäten erfolgt zum überwiegenden Teil im Mund-Rachen-Raum. Hier befinden sich die sogenannten Geschmacksknospen. Dabei handelt es sich um zwiebelartige Strukturen, die vorwiegend im Zungenepithel lokalisiert sind.

Die Geschmacksknospen der Zunge sind in Strukturen organisiert, die als Papillen bezeichnet werden. Es gibt vier unterschiedliche Papillenarten. Pilzpapillen sind in den vorderen zwei Dritteln der Zunge lokalisiert und besitzen wenige Geschmacksknospen, beim Menschen drei bis fünf, bei der Maus nur eine (Hoon et al., 1999, Smith und Boughter, 2007). Blätterpapillen befinden sich am seitlichen hinteren Zungenrand. Beim Menschen befinden sich darin mehrere hundert, bei der Maus mehrere Dutzend dieser Geschmacksknospen. Am Zungengrund befinden sich die Wallpapillen. Der Mensch besitzt sieben bis neun dieser Papillen, die tausende Geschmacksknospen enthalten. Die Maus hat

nur eine einzige mittig gelegene Wallpapille, die mehrere hundert Knospen beinhaltet (Hoon et al., 1999, Jung et al., 2004, Chandrashekar et al., 2006) (siehe Abb.1.1).

Des Weiteren gibt es über den gesamten Zungenrücken verteilte Fadenpapillen, diese besitzen keine Geschmacksknospen. Sie vermitteln das Tastempfinden der Zunge und beurteilen die aufgenommene Nahrung rein mechanisch (Dhouailly et al., 1989, Jung et al., 2004) (siehe Abb. 1.1).

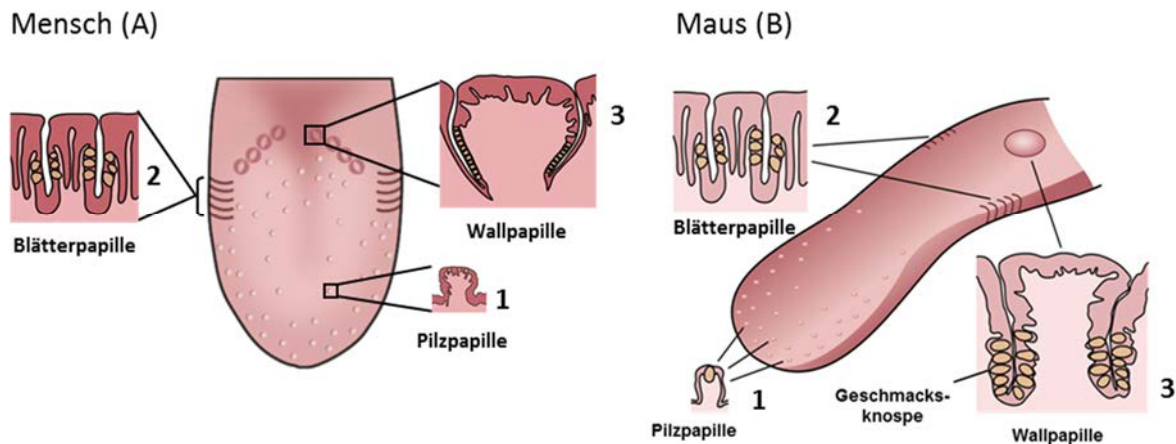


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der Lokalisation der Geschmackspapillen beim Menschen (A) sowie in der Maus (B). Die Pilzpapillen (1) sind überwiegend im vorderen Zungenbereich, die Blätterpapillen (2) am seitlichen hinteren Rand und die Wallpapillen (3) am Zungengrund lokalisiert. Die Fadenpapillen sind über den gesamten Zungenrücken verteilt. Abbildung modifiziert mit Genehmigung nach Dr. Jonas Töle.

Außer auf der Zunge sind Geschmacksknospen auch im weichen Gaumen, insbesondere bei Nagetieren im Geschmacksstreifen, sowie im Epithel des Kehlkopfs, im Rachen und im oberen Teil der Speiseröhre vorhanden (Kaplick, 1953, Lalonde und Eglitis, 1961, Smith und Boughter, 2007). Bei Mäusen konnten Geschmacksknospen zudem in einem Kanal zwischen Gaumen und Schneidezähnen dem sogenannten *Ductus nasopalatinus* nachgewiesen werden (Travers und Norgren, 1991, Stone et al., 2007).

Eine Geschmacksknospe enthält in der Regel ca. 50 - 100 Zellen. Am apikalen Ende befindet sich der sogenannte Geschmacksporus, welcher die Mikrovilli der Geschmacksrezeptorzellen beherbergt und die Verbindung zur Mundhöhle herstellt. Über den Geschmacksporus können Geschmacksstoffe mit Rezeptorzellen in Kontakt treten (siehe Abb. 1.2).

Die Geschmacksknospen enthalten Zellen, die morphologisch sowie funktionell in vier verschiedene Typen unterschieden werden: Typ-I-Zellen oder Glia-ähnliche Zellen, Typ-II-Zellen oder Geschmacksrezeptorzellen, Typ-III-Zellen oder präsynaptische und Typ-IV-Zellen oder Basalzellen genannt (Murray, 1993, Pumplun et al., 1997, Yee et al., 2001).

Typ-I-Zellen sind die häufigsten Zellen in der Geschmacksknospe. Es konnte gezeigt werden, dass sie GLAST, einen Glutamattransporter, exprimieren, welcher an der Aufnahme von Glutamat in Typ-I-Zellen beteiligt sein könnte (Lawton et al., 2000). Des Weiteren exprimieren sie NTPDase2, eine Nukleotidase, die extrazelluläres ATP hydrolysiert, sowie ROMK, einen Kaliumkanal, welcher an der Kaliumhomöostase innerhalb der Geschmacksknospe beteiligt sein könnte (Finger et al., 2005, Bartel et al., 2006, Dvoryanchikov et al., 2009) (siehe Abb. 1.3B). Ferner wird spekuliert, ob Typ-I-Zellen an einer Wahrnehmung von Natrium-Ionen (Salzgeschmack) beteiligt sind (Vandenbeuch et al., 2008, Chandrashekar et al., 2010).

Typ-II-Zellen exprimieren G-Protein-gekoppelte Geschmacksrezeptoren (GPCR) sowie nachgeschaltete Effektorproteine, die die Wahrnehmung der Geschmacksqualitäten süß, umami und

bitter vermitteln (Zhao et al., 2003, DeFazio et al., 2006). Darüber hinaus besitzen Typ-II-Zellen spannungsabhängige Natrium- und Kaliumkanäle, die es ihnen erlauben, Aktionspotentiale zu generieren, sowie Kanäle wie Calhm1 (*calcium homeostasis modulator 1*), die an einer ATP-Ausschüttung aus der Zelle beteiligt sind (Taruno et al., 2013).

Typ-III-Zellen oder präsynaptische Zellen exprimieren Proteine, die ebenfalls in chemischen Synapsen vorkommen wie NCAM, ein Glykoprotein für die neuronale Zelladhäsion. Wie Rezeptorzellen sind auch präsynaptische Zellen erregbar. Darüber hinaus besitzen sie Enzyme wie AADC (Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase), die mit der Synthese von Neurotransmittern und Calciumkanäle, die mit der Freisetzung von Neurotransmittern assoziiert sind (DeFazio et al., 2006, Dvoryanchikov et al., 2007, Huang et al., 2008b, Dvoryanchikov et al., 2009). Über synaptische Verbindungen können diese Zellen Informationen auf afferente Nervenfasern übertragen. Ferner reagieren Typ-III-Zellen auf Sauerstimuli und scheinen damit verantwortlich für die Wahrnehmung dieser Geschmacksqualität. Als Marker für diese Sauer-detektierenden Zellen dient PKD2L1 (*Polycystic kidney disease 2-like 1 protein*), welches allerdings nicht vorwiegend für die Wahrnehmung dieser Geschmacksqualität zuständig ist (Huang et al., 2006, Tomchik et al., 2007, Huang et al., 2008a, Chandrashekar et al., 2009).

Typ-IV-Zellen auch Basalzellen genannt, befinden sich an der Basis der Geschmacksknospen. Lange Zeit wurde spekuliert, ob sie undifferenzierte bzw. unreife Vorläuferzellen darstellen, aus denen Typ-I-, -II- und -III-Zellen hervorgehen (Farbman, 1965). Aktuelle Studien lassen indes vermuten, dass ausgehend von Typ-IV-Zellen eine Differenzierung in Typ-II- und Typ-III-Zellen erfolgen kann (Ichimori et al., 2009, Matsumoto et al., 2011, Takeda et al., 2013, Miura et al., 2014).

1.2.1 Geschmacksrezeptoren

Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die gustatorischen GPCRs gegeben. Dabei werden Geschmacksrezeptoren des Menschen sowie der Ratte nach folgendem Schema dargestellt: Rezeptoren der Geschmacksrezeptorfamilie 1 werden als TAS1Rs bzw. T1Rs (z.B. TAS1R1), Rezeptoren der Geschmacksrezeptorfamilie 2 als TAS2Rs bzw. T2Rs (z.B. TAS2R4) bezeichnet. Geschmacksrezeptoren der Maus werden analog zum Menschen und der Ratte mit Tas1rs (z.B. Tas1r1) und Tas2rs (z.B. Tas2r131) dargestellt.

Die Rezeptoren der Geschmacksrezeptorfamilie 1 (*taste receptor family 1*) kurz T1Rs/Tas1rs vermitteln den Süß- und den Umami-Geschmack. Dabei formen die drei Mitglieder Tas1r1, Tas1r2 und Tas1r3 dieser Familie heterodimere Rezeptoren. Die Kombination der Rezeptoren Tas1r1 und Tas1r3 vermittelt den Umami-Geschmack, die Kombination aus Tas1r2 und Tas1r3 den Süß-Geschmack (Matsunami et al., 2000, Nelson et al., 2001).

Die Rezeptoren der Geschmacksrezeptorfamilie 2 (*taste receptor family 2*) die sogenannten TAS2Rs/Tas2rs vermitteln dagegen den Bittergeschmack (Chandrashekar et al., 2000, Behrens und Meyerhof, 2009). Während der Süß- und Umamigeschmack nur durch wenige Rezeptoren vermittelt wird, besitzt der Mensch ca. 25 Bittergeschmacksrezeptoren (TAS2Rs), die Maus ca. 35 (Tas2rs).

Bitterstoffe binden an Bittergeschmacksrezeptoren. Diese Bindung initialisiert eine zelluläre Signalkaskade, an deren Ende die Signalweiterleitung auf afferente Nervenfasern steht.

Einige Rezeptoren können durch mehrere Bittersubstanzen aktiviert werden. Sie werden als sogenannte Generalisten bezeichnet. Rezeptoren, die nur durch einen oder wenige Bitterstoffe aktiviert werden, sind sogenannte Spezialisten. Umgekehrt können Bittersubstanzen auch mehr als einen Bitterrezeptor aktivieren (Meyerhof et al., 2010, Meyerhof, 2011, Thalmann et al., 2013). In

ihrer Gesamtheit können diese Bittergeschmacksrezeptoren so tausende von natürlichen und künstlichen Bittersubstanzen erkennen.

Lange wurde spekuliert, ob Bitterrezeptoren entweder homogen (Adler et al., 2000, Mueller et al., 2005) oder heterogen (Matsunami et al., 2000, Caicedo und Roper, 2001) exprimiert werden. Das würde einerseits bedeuten alle Tas2rs kommen in jeder Rezeptorzelle bzw. nur eine zufällige Auswahl einiger Tas2rs liegt vor oder andererseits ein spezielles Tas2r-Set wird pro Rezeptorzelle exprimiert. Neue Erkenntnisse zeigen, dass beispielsweise im Menschen lediglich 4-11 der 25 TAS2Rs pro Bittergeschmackszelle koexprimiert werden (Behrens et al., 2007). Ähnliches konnte auch für Mäuse gezeigt werden (Hübner, 2014). Beides deutet stark auf eine heterogene Tas2r-Expression in den Geschmacksknospen hin, die in konstanten Mustern vorliegt.

Im Vergleich zu den GPCR-vermittelten Mechanismen des Süß-, Umami- und Bittergeschmacks, ist über die Vorgänge des Salz- und des Sauergeschmacks wenig bekannt. Der attraktive Salzgeschmack scheint, insbesondere bei Nagetieren wie Mäusen, über einen epithelialen Natriumkanal (ENaC) vermittelt zu werden (Chandrashekar et al., 2010). Darüber hinaus werden weitere ENaC-unabhängige Wege zur Detektion von natriumhaltigen und anderen Salzen über Ionenkanäle wie TRPV1 (*transient receptor potential cation channel subfamily V member 1*) diskutiert (DeSimone et al., 1981, Halpern, 1998, Chandrashekar et al., 2010, Smith et al., 2012). Ferner scheinen auch Tas2r und PKD2L1-exprimierende Zellen an einer Detektion von hohen bzw. aversiven NaCl- und KCl-Konzentrationen beteiligt zu sein (Oka et al., 2013). Diesbezüglich zeigten Wu und Kollegen allerdings kürzlich, dass einzelne Neurone im *Ganglion geniculi* durch orale Stimulation mit Stoffen verschiedener Geschmacksqualitäten, insbesondere bei hohen Konzentrationen, aktiviert wurden (Wu et al., 2015). Eine direkte Zuordnung von Typ-II- oder Typ-III-Zellen als Rezeptoren des Salzgeschmacks scheint daher fraglich.

Als Kandidaten für eine Vermittlung des Sauergeschmacks werden ebenfalls PKD2L1-exprimierende (Typ-III) Zellen vermutet. PKD2L1 gehört zur Familie der TRP-Kanäle (*transient receptor potential*) und formt in Kombination mit dem assoziierten PKD1L3 einen Kanal. Studien zeigten, dass die Eliminierung von PKD2L1 exprimierenden Zellen nach Applikation eines Sauerstimulus zu einer Reduktion der neuronalen Antworten führt, was eine Beteiligung dieser Zellen an der Vermittlung des Sauergeschmacks vermuten lässt. (Huang et al., 2006, Ishimaru et al., 2006, Kataoka et al., 2008). Allerdings zeigten Studien mit PKD2L1 Knockout-Tieren, dass lediglich eine partielle Reduktion der neuronalen Antwort in Pilzpapillen vorkommt. (Horio et al., 2011).

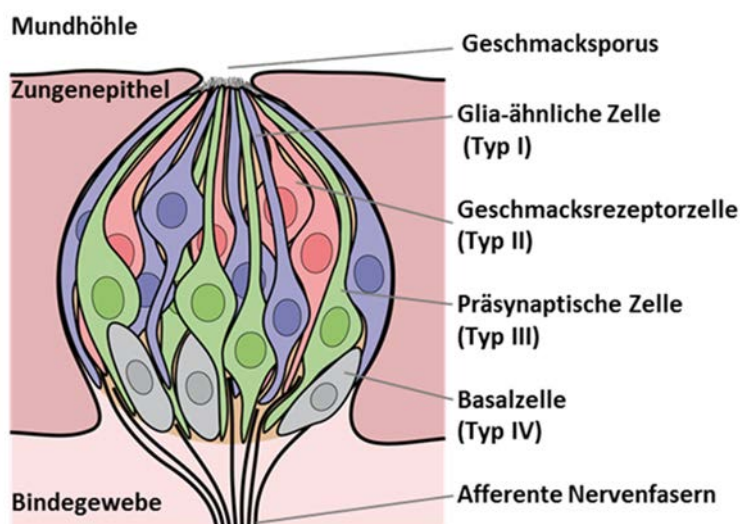


Abbildung 1.2 Schematische Abbildung einer Geschmacksknospe. Geschmacksstoffe können im Geschmacksporus an den Mikrovilli der Geschmackssinneszellen binden, dies initialisiert eine interne Signalkaskade durch die ein chemisches Signal (Geschmacksstoff) in ein elektrisches Signal (Zellmembrandepolarisierung) umgewandelt wird. Das Signal wird an benachbarte afferente Nervenfasern übermittelt, die die Geschmacksinformation ins Gehirn weiterleiten. Abbildung modifiziert mit Genehmigung nach Dr. Jonas Töle (DfE).

1.2.2 Signaltransduktion in Geschmackszellen am Beispiel eines Bittergeschmackrezeptors

Durch Bindung eines Bitterstoffes an seinen Bitterrezeptor kommt es zu einer Aktivierung des assoziierten trimeren G-Proteins Gustducin (McLaughlin et al., 1992). Dies führt zu einem Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) durch Guanosintriphosphat (GTP) an dessen α -Untereinheit. Der trimere G-Protein-Komplex dissoziiert daraufhin in die α - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten.

Der $\beta\gamma$ -Komplex führt anschließend zu einer Aktivierung der Phospholipase $C\beta 2$ (PLC $\beta 2$), welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. DAG bleibt in der Membran zurück. Das IP₃ führt zu einer Öffnung von IP₃-R3 Ionenkanälen am endoplasmatischen Retikulum (ER), woraufhin Calciumionen vom ER ins Zytoplasma ausströmen (Simon et al., 2006, Roper, 2007). Das bewirkt die Öffnung von TRPM5-Kanälen (*Transient receptor potential cation channel subfamily M member 5*), die einen Einstrom von Natriumionen in die Zelle ermöglichen (Perez et al., 2002, Zhang et al., 2003, Bezencon et al., 2007). Der Natriumeinstrom durch die TRPM5-Kationenkanäle führt zu einer Depolarisation der Zellmembran von Typ-II-Zellen. Die Depolarisation sowie das intrazelluläre Binden von Calciumionen an Kanäle wie Calhm1 (*calcium homeostasis modulator 1*) führt zu einer Freisetzung des Neurotransmitters Adenosintriphosphat (ATP) in den Extrazellulärraum (Finger et al., 2005, Romanov und Kolesnikov, 2006, Huang et al., 2007, Huang und Roper, 2010, Taruno et al., 2013, Kinnamon und Finger, 2013) (siehe Abb. 1.3 A). Das ATP stimuliert ligandengesteuerte Ionenkanäle über purinerge P2X-Rezeptoren in benachbarten Nervenfasern und übermittelt so die Information der Rezeptorzelle ins Nervensystem. Gleichzeitig regt das ATP über purinerge G-Protein-gekoppelte P2Y-Rezeptoren angrenzende Typ-III-Zellen zur Freisetzung von Serotonin und Noradrenalin an, welches inhibierend auf die Rezeptorzellen wirkt. Zusätzlich stimuliert das ATP autokrin die eigene Freisetzung aus der Geschmackszelle (siehe Abb. 1.3 B) (Huang et al., 2009).

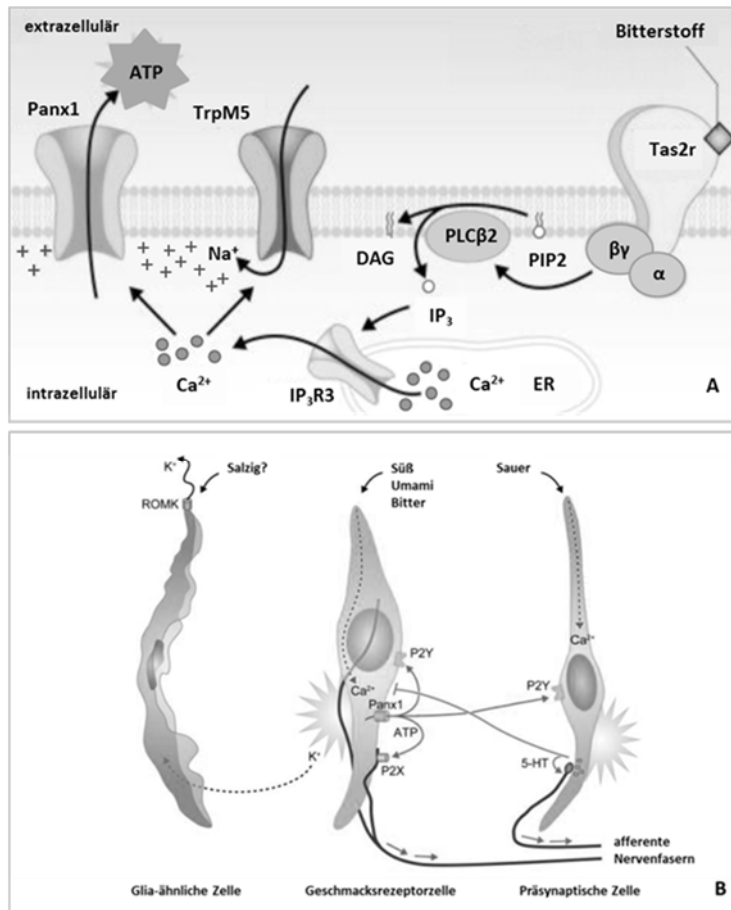


Abbildung 1.3

(A) Schematische Darstellung der Signaltransduktion in Geschmackszellen (Typ II). Nach Bindung eines Bitterstoffs an einen Bitterrezeptor kommt es zu einer Dissoziation des trimeren G-Proteins. Die $\beta\gamma$ -Untereinheiten aktivieren einen Signalweg, der zu einer Membrandepolarisation und ATP-Freisetzung führt.

(B) Schematische Darstellung der drei Hauptzelltypen in der Geschmacksknospe. Glia-ähnliche Zellen beseitigen überschüssiges Kalium über den apikalen Kanal ROMK. Geschmackszellen sind durch Süß-, Umami- und Bitterstoffe aktivierbar und werden so zur ATP-Freisetzung durch Calhm1-Kanäle (*calcium homeostasis modulator 1*) oder Pannexin-1-Hemikanäle (Panx1) animiert. ATP wirkt über ATP-Rezeptoren (P2X, P2Y) an afferenten Nervenfasern sowie an der eigenen Geschmackszelle. Präsynaptische Zellen werden ebenfalls durch ATP aktiviert und setzen zur inhibitorischen Gegenregulation Serotonin (5-HT) frei. Modifiziert nach Chaudhari und Roper, 2010, Genehmigung liegt vor.

1.3 Signalübertragung und -weiterleitung ins Gehirn

Geschmacksrezeptorzellen stellen sogenannte sekundäre Sinneszellen dar, da sie wie oben beschrieben keine Axone besitzen, sondern mit afferenten Nervenfasern in Kontakt stehen. Die Zellkörper dieser Nervenfasern liegen als Ganglien im peripheren Nervensystem. In Abhängigkeit der Spezies und der Lokalisation in der Mundhöhle wird eine Geschmacksknospe von 3-14 afferenten Ganglienzellen innerviert (Krimm und Hill, 1998, Whitehead et al., 1999). Je nach Lage der Geschmacksknospen erfolgt die Weiterleitung der Geschmacksinformation über die drei Hirnnerven *Nervus facialis* (VII. Hirnnerv), *Nervus glossopharyngeus* (IX. Hirnnerv) oder *Nervus vagus* (X. Hirnnerv). Informationen der Pilzpapillen sowie einem Teil der Blätterpapillen werden über die *Chorda tympani*, einen Ast des *Nervus facialis* transportiert (Whiteside, 1927). Über einen weiteren Ast des VII. Hirnnerven, den *Nervus petrosus major* erfolgt die Informationsübertragung aus dem weichen Gaumen. Die Zellkörper des *Nervus facialis* liegen im *Ganglion geniculi*. Geschmacksinformationen aus dem hinteren Teil der Blätterpapillen sowie der Wallpapillen im posterioren Teil der Zunge werden über den *Nervus glossopharyngeus* ins Gehirn übermittelt (Mistretta, 1984). Dessen Zellkörper liegen im *Ganglion petrosum*. Der *Nervus vagus* überträgt dagegen die gustatorischen Informationen des Rachens (*Pharynx*), des Kehlkopfs (*Larynx*) und des Kehlkopfs (*Epiglottis*) (Lalonde und Eglitis, 1961, Mistretta, 1984). Seine Zellkörper befinden sich im *Ganglion nodosum*.

Die Geschmacksinformation wird von diesen Neuronen zur ersten Ebene der gustatorischen Verarbeitung, dem *Nucleus tractus solitarii* (NTS) innerhalb des Hirnstamms projiziert (Pfaffmann,

1961, Makous, 1963). Die drei Hirnnerven senden die Information in den rostralen Bereich des NTS. Von dort projiziert eine Gruppe dieser gustatorischen Neurone auf lokal benachbarte Neurone innerhalb des Hirnstamms, wie in caudale Bereiche des NTS und in die *Nuclei parvocellulares* der *Formatio reticularis* (Norgren, 1978, Herbert et al., 1990, Halsell et al., 1996). Diese Regionen sind an der Regulation des Speichelflusses sowie angeborenen Reflexen beteiligt, die über „Spucken“ oder „Schlucken“ entscheiden (Spector, 2000).

Eine zweite Gruppe dieser Neurone sendet gustatorische Information ins Prosencephalon. Dabei projizieren diese Neurone zum einen über den *Nucleus ventralis posteromedialis* des Thalamus zu Bereichen des *Cortex insularis agranularis*. In diesen kortikalen und benachbarten Bereichen werden die gustatorischen mit taktilen, thermischen und olfaktorischen Informationen zum komplexen Sinneseindruck zusammengesetzt (Sewards und Sewards, 2001, Verhagen et al., 2004, Bult et al., 2007). Zum anderen projiziert eine dritte Population an Neuronen die gustatorischen Informationen zu ventralen Strukturen des Prosencephalons, wie dem Hypothalamus, der *Amygdala* oder Kernen der *Stria terminalis* (Norgren und Leonard, 1973, Norgren, 1974). Nagetiere besitzen zwischen dem NTS und dem Thalamus eine weitere Verschaltung innerhalb der Geschmacksbahn, den sogenannten *Nucleus parabrachialis* (PbN) im Pons (Norgren, 1976, Fulwiler und Saper, 1984, Spector, 2000, Bradley, 2007). Im Menschen spielt der PBN in der Geschmackweiterleitung dagegen nur eine untergeordnete Rolle, so projizieren hier nur nicht-gustatorische Neurone vom caudalen Bereich des NTS in den PBN (Beckstead et al., 1980). Eine Darstellung dieser neuronalen Projektionen ist in Abbildung 1.4 gezeigt.

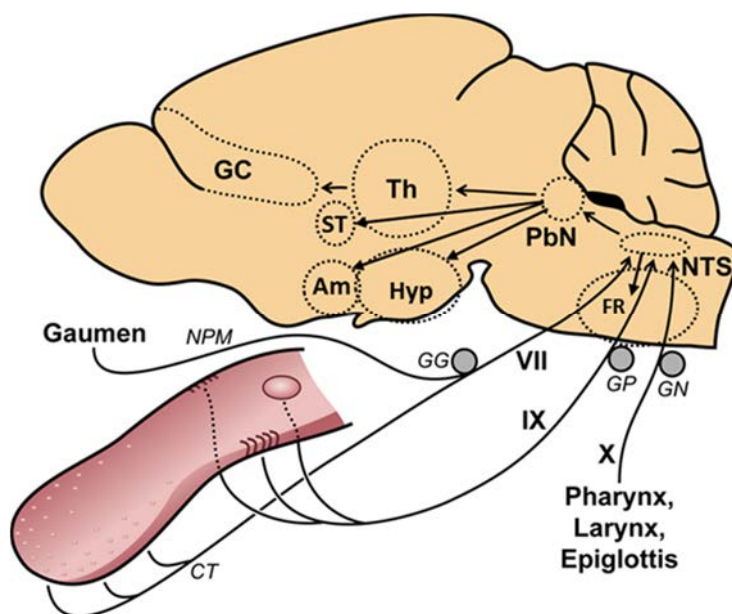


Abbildung 1.4 Darstellung der Weiterleitung der Geschmacksinformation in der Maus. Aus der Peripherie werden die gustatorischen Signale über drei Hirnnerven ins Gehirn geleitet. Dabei werden Signale vom vorderen Teil der Zunge über die *Chorda tympani* (CT) und Signale des Gaumens über den *Nervus petrosus major* (NPM) des *Nervus facialis* (VII. Hirnnerv) geleitet. Dessen Zellkörper befinden sich im *Ganglion geniculi* (GG). Geschmacksinformationen des posterioren Teils der Zunge werden über den *Nervus glossopharyngeus* (IX. Hirnnerv) gesendet. Seine Zellkörper liegen im *Ganglion petrosum*. Gustatorische Informationen des *Pharynx* (Rachen), *Larynx* (Kehlkopf) und der *Epiglottis* (Kehle) werden über den *Nervus vagus* (X. Hirnnerv) in den *Nucleus tractus solitarius* (NTS) übermittelt. Von dort projizieren Neurone in caudale Bereiche des Hirnstammes wie die *Formatio reticularis* (FR) oder zum *Nucleus parabrachialis* (PbN). Neurone des PBN senden die Information über aufsteigende Bahnen in den Thalamus (Th) und weiter zum gustatorischen Inselcortex (GC) oder zu ventralen Bereichen des Vorderhirns wie dem Hypothalamus (Hyp), der *Amygdala* (Am) und der *Stria terminalis* (ST). Abbildung modifiziert mit Genehmigung nach Dr. Jonas Töle.

1.4 Verarbeitung der Geschmacksinformation

Die Verarbeitung und die Kodierung der Geschmacksinformation ist Gegenstand langjähriger Forschung. Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts wurden erste elektrophysiologische Experimente zur Aufklärung der durch Geschmacksstimuli hervorgerufenen Nervenimpulse durchgeführt (Zottermann, 1935). Das Forschungsanliegen liegt heute wie damals in der Klärung der Frage, wie elektrische Potentiale zu einem Sinneseindruck führen (Pfaffmann, 1941).

Es etablierten sich zwei Studien zur Kodierung der Geschmacksinformation, die bis heute kontrovers diskutiert werden. Einerseits vertritt die *Labeled-line*-Theorie die Ansicht, dass Neurone die Informationen unterschiedlicher Geschmacksqualitäten auf separaten Bahnen verschalten und verarbeiten. Die Aktivierung der Bahnen sei für die Zuordnung der Geschmacksinformationen notwendig und hinreichend (Pfaffmann, 1941, Smith und St John, 1999). Hinweise für diese Theorie zeigten einige neurophysiologische Studien. So können Neurone, die an der Verarbeitung des Geschmacks beteiligt sind, grob in Gruppen eingeteilt werden. Neurone, die z.B. vorwiegend auf NaCl reagieren (*Na-best*), können daher zusammengefasst werden. Die Aktivität dieser Gesamtheit an Neuronen würde so den Geschmack von Salz vermitteln (McCaughey und Scott, 1998). Die Notwendigkeit dieser Neurone, die vorwiegend auf NaCl reagieren, für eine Unterscheidung beispielsweise zwischen NaCl und KCl konnte in Studien belegt werden (Formaker und Hill, 1991). Was bis heute nicht belegt werden konnte ist, ob diese Neurone hinreichend für eine Aktivierung sind (Smith und St John, 1999).

Die *Across-fiber-pattern*-Theorie vertritt dagegen die Ansicht, dass die Geschmacksinformation einer Qualität durch Erregungsmuster über große Neuronenpopulationen auch mehrerer Neuronentypen transportiert und verarbeitet wird (Erickson, 1963, Smith und Frank, 1972, Smith et al., 1979). So konnte bereits Pfaffmann 1941 beobachten, dass Neurone zum Teil auf mehrere Geschmacksstimuli reagieren (Pfaffmann, 1941). Caicedo und Kollegen zeigten, dass 38 % der Rezeptorzellen auf Geschmacksstimuli unterschiedlicher Qualitäten ansprechen (Caicedo et al., 2002).

Trotz zahlreicher neurophysiologischer Studien konnte die neuronale Kodierung der Geschmacksinformation bis heute nicht gänzlich aufgeklärt werden. Für beide Theorien gibt es sowohl Befürworter als auch Gegner (Erickson, 1968, Hellekant et al., 1998, Kitada et al., 1998).

Erschwert wird die Aufklärung der Kodierung darüber hinaus durch eine Reihe genereller Faktoren. So bestehen zwischen den untersuchten Spezies wie Menschen und Primaten oder Nagetieren teils gravierende Unterschiede der Liganden-Rezeptor-Aktivierung. Das bedeutet, eine Substanz aktiviert im Zungengewebe des Menschen einen Bitterrezeptor, währenddessen in Nagetieren nicht der orthologe, sondern ein oder mehrere andere Rezeptor angesprochen werden.

Des Weiteren reagieren die Rezeptorzellen, wie bereits angesprochen, teilweise auf Stimuli verschiedener Geschmacksqualitäten (Caicedo et al., 2002, Tomchik et al., 2007). Ob dies ein Hintergrundrauschen aufgrund der Konzentration des applizierten Stimulus oder ein echtes Signal darstellt, ist nicht bekannt. Darüber hinaus ist die genaue Vermittlung der Geschmacksinformation an den Rezeptorzellen bisher nicht vollständig aufgeklärt.

Zur Untersuchung der genauen Kodierung der Geschmacksinformation wurden im Wesentlichen zwei Methoden verwendet: zum einen elektrophysiologische Ableitungen, zum anderen die Verwendung neuronaler Aktivitätsmarker. Elektrophysiologische Ableitungen ermöglichen die Untersuchung von Nervensträngen und einzelnen Fasern bis hin zu einzelnen Neuronen. Methodisch vorteilhaft ist die Untersuchung definierter Kerngebiete im Gehirn. Darüber hinaus ist es möglich, während eines Versuchs auch mehrere Geschmacksstimuli zu testen.

Nachteilig dagegen ist, dass nur wenige Tiere pro Tag analysiert werden können. Ferner werden die Tiere während des Experiments meist anästhesiert. Anästhetika oder Narkotika können allerdings einen Einfluss auf das Antwortverhalten von Neuronen haben und so die Ergebnisse beeinflussen (Spector und Travers, 2005).

Trotz dieser Nachteile bzw. Einschränkungen konnten mithilfe dieser Methode viele Erkenntnisse gewonnen werden. So wurden entlang der Geschmacksbahn Zellen mit geringer Selektivität beobachtet, die auf mehrere Stimuli reagierten. Die Selektivität nahm sogar noch ab, je höher innerhalb der Geschmacksbahn Ableitungen durchgeführt wurden (Herness, 2000, Spector und Travers, 2005, Bradley, 2007).

Eine andere Vorgehensweise zur Untersuchung der Kodierung der Geschmacksinformation wurde durch die Verwendung neuronaler Aktivitäts- oder Expressionsmarker wie *Fos* ermöglicht, deren Expression mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden kann. Mit dieser Methode können ganze Neuronenpopulationen in verschiedenen Hirnregionen gleichzeitig analysiert werden. So wurde mit dieser Technik nachgewiesen, dass Neurone, die auf verschiedene Geschmacksstimuli reagieren, im NTS in unterschiedlichen Subregionen liegen (Harrer und Travers, 1996, Travers, 2002, Travers und Travers, 2007). Dazu wurden Tieren verschiedene Stimuli appliziert bzw. injiziert und anschließend die *Fos*-Expression in den Neuronen analysiert. Die Kombination mit neuronalen Tracer-Molekülen ermöglichte darüber hinaus die Zuordnung bzw. die Verschaltung neuronaler Projektionsgebiete (Travers et al., 2007, Travers und Travers, 2007). Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass pro Tier nur ein Stimulus appliziert werden kann und die Ergebnisse nur eine Momentaufnahme der Signalaktivität widerspiegeln (Roussin et al., 2012).

Eine zeitliche Komponente dieser Signalaktivität kann mit dem sogenannten *catFISH*-Verfahren (*cellular compartment analysis of temporal activity by fluorescence in situ hybridization*) mit einer Kombination von Fluoreszenz-*In-situ*-Hybridisierung und Immunhistochemie unter Verwendung eines speziellen *Immediate-early*-Gens der bisherigen Bildgebung hinzugefügt werden (Töle, 2013). Wie *Fos* zählt auch *Arc* zu den *Immediate-early*-Genen (Link et al., 1995, Guzowski et al., 2005, Shepherd und Bear, 2011). Aktuelle Studien in Mäusen zeigten beispielsweise eine verstärkte *Arc*-Expression im NTS und PBN nach oraler Applikation von Bittersubstanzen (Töle, 2013, Tyree, unpubliziert). Darüber hinaus zeigte die kombinierte Applikation zwei gleicher bzw. zwei unterschiedlicher Bittersubstanzen, dass im NTS und im PBN divergierende aber zum Teil überlappende Populationen von Neuronen existieren, die nur auf einen oder auf mehrere Bitterstimuli ansprechen. Solche bildgebenden Verfahren ermöglichen es, neuronale Strukturen detaillierter zu untersuchen und stellen daher wichtige Instrumente zur Aufklärung der Kodierung der Geschmacksinformation dar.

1.5 Extra-gustatorische Expression von Geschmacksrezeptoren

Die Expression von Geschmacksrezeptoren ist nicht auf das gustatorische Gewebe begrenzt. Aktuelle Studien zeigten einen Nachweis der Expression von *Tas1rs* und *Tas2rs* auch in verschiedenen anderen Geweben. Aufgrund der wenigen spezifischen Antikörper bzw. Antiseren gegen Geschmacksrezeptoren, die kommerziell erhältlich sind, erfolgte der Nachweis der Rezeptoren in diesen Geweben vorwiegend auf Ebene einer RNA-Expression oder mithilfe von gentechnisch modifizierten Mausmodellen (Behrens et al., 2012, Foster et al., 2014).

1.5.1 Gastrointestinales System

Studien in Mäusen und Ratten konnten die Expression einiger Bittergeschmacksrezeptoren (Tas2rs), sowie die Untereinheiten der Tas1r-Familie, die für den Süß- und Umamigeschmack notwendig sind, in verschiedenen Bereichen des Gastrointestinaltrakts (GIT) nachweisen (Wu et al., 2002, Dyer et al., 2005, Chen et al., 2006, Akiba et al., 2009). Auch im GIT des Menschen konnte eine Expression von verschiedenen TAS1Rs und TAS2Rs detektiert werden (Rozenfurt et al., 2006, Jang et al., 2007, Young et al., 2009). Über die Zellen, in denen diese Rezeptoren exprimiert werden, sowie deren damit verbundene Funktion, ist bisher allerdings wenig bekannt. So sollen Tas1rs an einer Sekretion von GLP-1 aus Enteroendokrinen Zellen sowie anderer Inkretine beteiligt sein. Auch eine Modulation und Regulation des Glukose-Haushaltes über einen Natrium-abhängigen Glukosetransporter wird postuliert (Jang et al., 2007, Margolskee et al., 2007).

Für Bitterrezeptoren wird ebenfalls eine Funktion als Modulator der Hormonsekretion von CCK und GLP-1 in endokrinen Zellen des GIT diskutiert, allerdings fehlen oftmals konkrete Belege für Tas2r-abhängige Effekte (Chen et al., 2006, Jang et al., 2007).

Für den murinen Bitterrezeptor Tas2r131 konnte mithilfe einer gentechnisch modifizierten Mauslinie indes eine Expression in Becherzellen, mukösen Drüsenzellen im Zottenepithel des Dün- und Dickdarms, gezeigt werden. Spekuliert wird hier eine protektive Funktion der Tas2rs im GIT gegenüber pathogenen Bakterien oder deren Ausscheidungsprodukten (Prandi et al., 2013).

1.5.2 Respirationssystem

Im Respirationssystem konnte die Expression verschiedener Geschmacksrezeptoren sowohl in Mäusen und Ratten als auch beim Menschen nachgewiesen werden (Max et al., 2001, Finger et al., 2003, Shah et al., 2009, Deshpande et al., 2010, Tizzano et al., 2011, Voigt et al., 2012).

Insbesondere die Rolle der Tas2rs als potentielle Schutzmechanismen wurde untersucht. So konnte deren Expression im respiratorischen Epithel der Nase und in der Luftröhre nachgewiesen werden, wo exprimierende Zellen nach Exposition mit Reizstoffen (z.B. Bittersubstanzen und Xenobiotika) trigeminale Nervenfasern aktivieren und protektive Atemschutzreflexe (Senkung der Atemfrequenz, Erhöhung der Zilienbewegung) initiieren (Finger et al., 2003, Shah et al., 2009, Tizzano et al., 2010, Krasteva et al., 2011). Eine Expression von Bitterrezeptoren konnte auch in glatten Muskelzellen der Trachea detektiert werden. Nach Gabe hoher Mengen von Bitterstoffen führte dies zu einer Muskelrelaxation und damit zu einer verminderten Behinderung der Atemwege im asthmatischen Mausmodell (Deshpande et al., 2010, Grassin-Delyle et al., 2013). Inwieweit diese Effekte auf eine Aktivierung des Bitterrezeptors oder auf andere Eigenschaften der applizierten Bittersubstanz zurückzuführen sind, sowie der zugrundeliegende Mechanismus, erfordern weitere Analysen (Belvisi et al., 2011, Zhang et al., 2012, Grassin-Delyle et al., 2013).

1.5.3 Reproduktionssystem

Auch im Reproduktionssystem konnte durch RT-PCR sowie mittels gentechnisch modifizierter Mäuse die Expression der drei Mitglieder der Tas1r-Familie (Tas1r1, Tas1r2, Tas1r3) sowie der Bitterrezeptoren Tas2r105 und Tas2r131 nachgewiesen werden (Li und Zhou, 2012, Meyer et al., 2012, Voigt et al., 2012). Für den Bitterrezeptor Tas2r105 sowie für Tas1r3 in Kombination mit α -

Gustducin wird eine mögliche Beteiligung an der Spermatogenese postuliert (Li und Zhou, 2012, Mosinger et al., 2013).

1.5.4 Zentrales und peripheres Nervensystem

Auch im peripheren und zentralen Nervensystem gibt es erste Hinweise auf eine Geschmacksrezeptorexpression (Ren et al., 2009, Singh et al., 2011, Dehkordi et al., 2012, Voigt et al., 2015a,b).

Dabei untersuchten Ren und Kollegen die Expression der Tas1r-Familie im Cortex und im Cerebellum von Mäusen. Mittels qRT-PCR-Analysen konnten sie die Expression aller drei Mitglieder nachweisen (Ren et al., 2009). Auch Voigt und Kollegen konnten eine Expression von Tas1r1 in weiten Teilen des Gehirns detektieren (Voigt et al., 2015a).

Expressionsuntersuchung im Hypothalamus von Mäusen wiesen ferner auf eine Abhängigkeit der Expression von Genen, die an der Geschmacksdetektion beteiligt sind, vom aktuellen Nährstoffstatus des Organismus hin. So zeigten Ren und Kollegen, dass ein Nahrungsentzug zu erhöhten Expressionspegeln, ein hyperglykämischer Zustand zu geringeren Expressionspegeln des Tas1r1- und des Tas1r2-Rezeptors im Hypothalamus von Mäusen führt (Ren et al., 2009). Darüber hinaus wurde die Lokalisation von Tas1r2 und Tas1r3 im *Nucleus arcuatus* und im *Nucleus paraventricularis* des Hypothalamus mittels *In-situ*-Hybridisierung (ISH) und immunhistochemischer Färbungen gezeigt (Ren et al., 2009). Allerdings ist zu erwähnen, dass in der Publikation einige Kontrollexperimente wie die Überprüfung der Spezifität der RNA-Sonden und Antikörper im gustatorischen Gewebe fehlen, weshalb die Ergebnisse kritisch zu betrachten sind.

Weiterhin konnte eine Expression von einigen wenigen Tas2rs im zentralen Nervensystem mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Im Hirnstamm von Ratten konnte beispielsweise eine Expression des T2R1 detektiert werden (Dehkordi et al., 2012). Andere Studien zeigten eine Expression von T2R4, T2R10 und T2R38 in verschiedenen Bereichen des Rattengehirns wie im Cerebellum, Cortex, *Nucleus accumbens* oder im Hirnstamm (Singh et al., 2011). Auch im Menschen wurden sechs Bitterrezeptoren im entorhinalen und im frontalen Cortex sowie im Cerebellum detektiert (Ansoleaga et al., 2013, Ansoleaga et al., 2015).

Im Gehirn der Maus konnte dagegen bisher nur der Tas2r131 im Hypothalamus und im Hirnstamm sowie im peripheren Nervensystem im *Ganglion geniculi* sowie *Ganglion nodosum/petrosum* nachgewiesen werden. Eine Expression des Tas2r131 in anderen Regionen oder ein Nachweis der Expression des Bitterrezeptors Tas2r105 konnten nicht gezeigt werden (Voigt et al., 2015a). Die anderen 33 Bitterrezeptoren der Maus wurden bislang nicht auf ein Vorkommen im Nervensystem untersucht.

Neben einer Expression wurde darüber hinaus die Identifizierung der Zellen angestrebt, die Bitterrezeptoren im Gehirn exprimieren. Aufgrund des bereits beschriebenen Defizits an spezifischen Antikörpern wurden Expressionsanalysen in speziellen Zellsystemen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass in kultivierten Glia- und Neuronenzellen der Ratte eine Rezeptorexpression nachweisbar war (Singh et al., 2011). Darüber hinaus wurden Antisera gegen α -Gustducin und PLC β 2 genutzt, die im Zungengewebe als nachgeschaltete Signalmoleküle fungieren. Diese Effektorproteine sollten so indirekt Bitterrezeptor-exprimierende Zellen visualisieren. Voraussetzung dafür ist allerdings, dass dem Bitterrezeptor eine ähnliche Signaltransduktion wie im Zungengewebe nachgeschaltet ist.

Die immunhistologischen Untersuchungen der Proteine α -Gustducin und PLC β 2 wiesen auf eine Lokalisation in verschiedenen Regionen im Hypothalamus sowie im Hirnstamm hin. Zudem konnten

Überlappungen mit Neuronen- (NeuN) und Glia-Zellmarkern (GFAP) beobachtet werden (Dehkordi et al., 2012).

Ähnliche Ergebnisse wurden auch in Mäusen beobachtet. So konnten Tas2r131-exprimierende Zellen mithilfe von gentechnisch modifizierten Mäusen visualisiert werden (Dr. Anja Voigt, DIfE). In diesem Fall wurde ein Mausmodell genutzt, in welchem Zellen, die den Bitterrezeptor Tas2r131 exprimieren, durch ein rot-fluoreszierendes Protein (tdRFP) detektierbar sind. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen mit Antisera bzw. Antikörpern gegen Marker bestimmter Zellpopulationen im Gehirn sowie die Detektion Tas2r131-exprimierender Zellen zeigten keine Übereinstimmungen mit Markern für Glia-Zellen wie Astrozyten und Oligodendrozyten. Allerdings konnten 88 % der Tas2r131-Zellen durch NeuN kofärbt werden, was auf eine Expression vorwiegend in Neuronen hindeutet. NeuN wird in der Mehrzahl, jedoch nicht in allen neuronalen Zellen exprimiert, Purkinje-Zellen und Golgi-Zellen beispielsweise sind eine Ausnahme. Das könnte erklären, warum in 12 % der Tas2r131-Zellen nicht auch NeuN nachgewiesen wurde (siehe Abb. 1.6) (Voigt, unpubliziert).

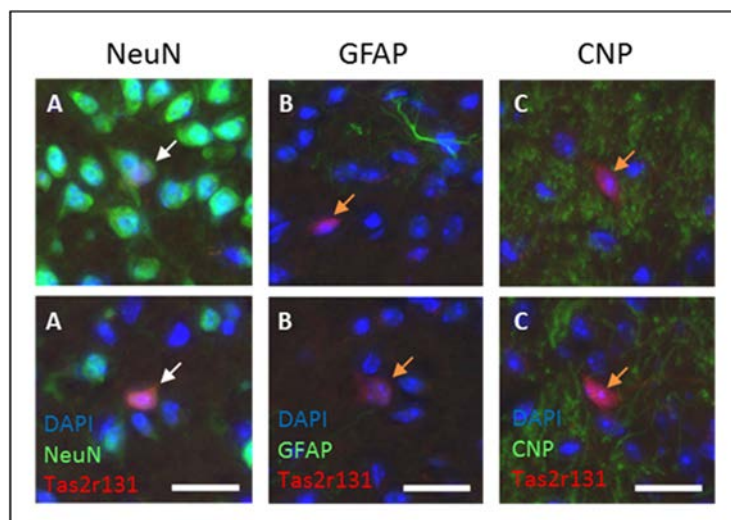


Abbildung 1.5 Immunhistochemische Färbungen verschiedener Zellpopulationen im Gehirn in Kombination mit der Visualisierung von Tas2r131-exprimierenden Zellen. (A) Kofokalisation (weißer Pfeil) von Tas2r131-exprimierende Zellen (tdRFP) und Neuronen (Neuronenmarker NeuN) im Mausgehirn. (B-C) Keine Kofokalisation (orangefarbener Pfeil) von Tas2r131-exprimierende Zellen und dem Astrozytenmarker GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*) und dem Oligodendrozytenmarker CNP (*cyclische Nukleotid-Phosphodiesterase*). Maßstab 25 µm. Färbungen und konfokale Aufnahmen durch Dr. Anja Voigt, DIfE, Genehmigung liegt vor.

Darüber hinaus war es möglich, den Bitterrezeptor Tas2r131 entlang der Geschmacksbahn von der Geschmacksknospe über Nervenfasern und Ganglionzellen bis in zentralnervöse Regionen wie dem *Nucleus tractus solitarii* (NTS), dem *Nucleus parabrachialis* (PBN), dem Thalamus und in Bereichen des Cortex zu detektieren (siehe Abb. 1.7). Dazu wurde das Mausmodell Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{tauGFP} verwendet (Voigt et al., 2015b), welches durch Verpaarung von Tas2r131^{BLIC}- und Rosa26^{tauGFP}-Mäusen entsteht.

In der Mauslinie Tas2r131^{BLIC} ist die kodierende Sequenz des Bitterrezeptors Tas2r131 durch ein modifiziertes Targeting-Konstrukt ausgetauscht. Dieses Konstrukt (BLIC - *Barley lectin* - IRES - Cre) enthält ein Gerstenlektin (*barley lectin*) sowie die ortsspezifische Cre-Rekombinase. Die interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) gewährleistet dabei die unabhängige Translation der beiden mRNA-Sequenzen. Die Cre-Rekombinase wird dabei unter Kontrolle der noch unbekannt Promotorregion des Tas2r131-Rezeptors exprimiert.

Die Reportermauslinie $Rosa26^{tauGFP}$ ist gekennzeichnet durch eine Cre-Rekombinase-abhängige Expression des Fluoreszenzreporters tauGFP unter Kontrolle des ubiquitär und konstitutiv aktiven Rosa26-Promotors. In $Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/tauGFP}$ -Mäusen wird so unter Vermittlung der Cre-Rekombinase-Aktivität eine Expression des Fluoreszenzreporters tauGFP in Tas2r131-exprimierenden Zellen ermöglicht. Eine Detektion von tauGFP-positiven Zellen in $Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/tauGFP}$ -Mäusen weist daher auf eine aktuelle oder vergangene Aktivität des Tas2r131-Promotors hin, da eine einmalige Tas2r131-Promotoraktivität ausreicht, um betroffene Zellen lebenslang durch tauGFP zu kennzeichnen.

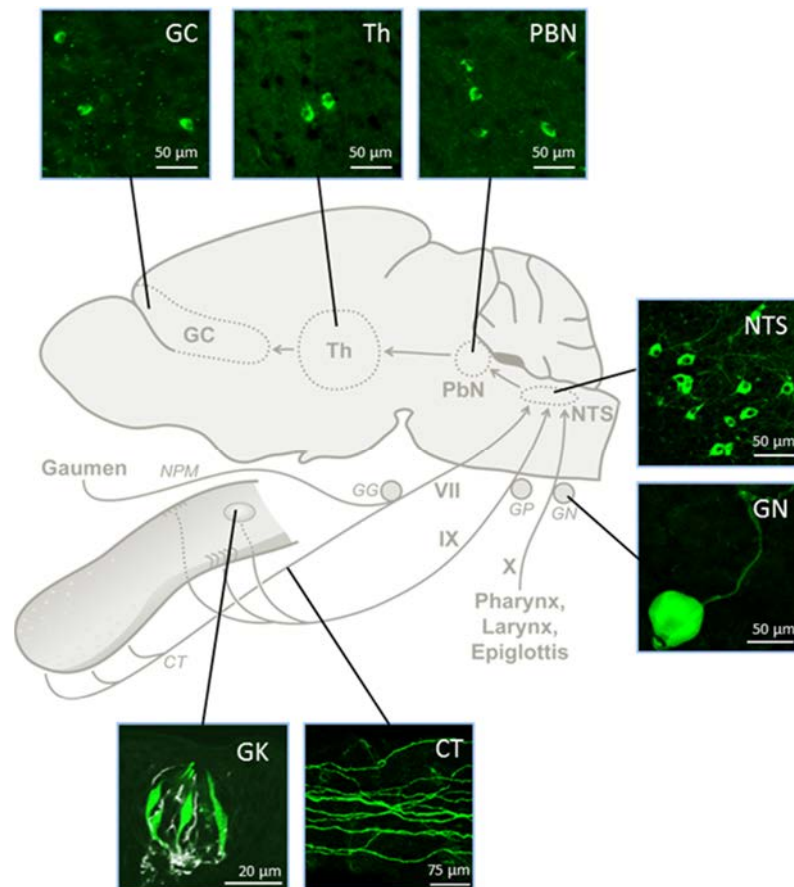


Abbildung 1.6 Identifizierung Tas2r131/tauGFP-exprimierender Zellen entlang der Geschmacksbahn. Tas2r131/tauGFP-exprimierende Zellen konnten von der Geschmacksknospe (GK) über Nervenzellen (z.B. *Chorda tympani* - VII. Hirnnerv) und Ganglien (z.B. *Ganglion nodosum* – GN) bis hin zu zentralen Geschmacksregionen wie dem *Nucleus tractus solitarius* (NTS), dem *Nucleus parabrachialis* (PBN), dem Thalamus (Th) und in Bereichen des gustatorischen Cortex (GC) detektiert werden. Modifiziert mit Genehmigung nach Dr. Jonas Töle und Dr. Anja Voigt, DIFe.

Durch dieses und weitere Tiermodelle ist es nun möglich, auch in Abwesenheit spezifischer Antikörper Bitterrezeptor-exprimierende Zellen, wie beispielsweise die neuronale Tas2r131-Zellpopulation, zu untersuchen. Immunhistochemische Färbungen mit Marker für verschiedenen Neuronenpopulationen könnte so eine Identifizierung der Tas2r131-exprimierenden Neuronen ermöglichen. Die Detektion des Tas2r131 entlang des gustatorischen Signalweges lässt darüber hinaus Spekulationen zu, ob Tas2rs Funktionen innerhalb der neuronalen Geschmacksinformationweiterleitung bzw. -übertragung wahrnehmen.

Interessanterweise scheint die Tas2r-Expression nicht auf Gewebe mit direktem Kontakt zur Umwelt beschränkt ist. Zusätzlich zum PNS und ZNS konnte ebenfalls eine Expression von Tas1rs und Tas2rs

in verschiedenen anderen Geweben ohne direkten Zugang zur Außenwelt detektiert werden, wie im Thymus, in der Schilddrüse, im Herzmuskel und in Bestandteilen des Blutes (Voigt et al., 2012, Foster et al., 2013, Clark et al., 2015, Malki et al., 2015, Maurer et al., 2015, Wolfle et al., 2015).

1.6 Ziele dieser Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Expression von Bittergeschmacksrezeptoren (Tas2rs) im Nervensystem analysiert, die exprimierenden Zellen charakterisiert und potentielle Funktionen untersucht werden.

Expressionsanalysen mittels RT- und qRT-PCR sollen Auskunft darüber geben, welche der 35 Tas2rs akut im Nervensystem der Maus exprimiert werden und ob sich spezifische Expressionsmuster ableiten lassen. Basierend auf diesen Expressionsanalysen soll für eine Auswahl bestimmter Tas2rs geprüft werden, ob mittels *In-situ*-Hybridisierung eine Visualisierung der Bitterrezeptoren auf zellulärer Ebene möglich ist. Dies schafft die Voraussetzung zur Identifizierung des Zelltyps Tas2r-exprimierender Neurone. Parallel dazu soll anhand immunhistochemischer Methoden die Identität des Zelltyps von Tas2r131-exprimierenden Neuronen (Tas2r131-Neuronen) untersucht werden. Dazu sollen Kolokalisationsstudien in Tas2r131^{BLC}/Rosa26^{tauGFP}-Mäusen, in denen Tas2r131-Zellen durch den Fluoreszenzreporter tauGFP visualisiert werden, mit verschiedenen neuronalen Markern durchgeführt werden. Ein Vorkommen in speziellen Neuronenpopulationen könnte so Rückschlüsse auf potentielle Aufgaben des Tas2r131-Rezeptors oder gar aller Tas2rs zulassen.

Im Zuge der funktionellen Charakterisierung Tas2r-exprimierender Neurone soll darüber hinaus die mögliche Beteiligung von Tas2r131-Neuronen an der Weiterleitung gustatorischer Geschmacksinformationen untersucht werden. Dazu sollen Verhaltensexperimente mit Tas2r131^{BLC}/Rosa26^{TeNT}-Mäusen durchgeführt werden. Die Besonderheit dieser Mauslinie liegt in einer unterbrochenen bzw. gestörten Signalweiterleitung an synaptischen Endigungen von Tas2r131-Neuronen auf andere Zellen. Sollten Tas2r131-Neurone an einer gustatorischen Signalweiterleitung einer oder mehrerer Geschmacksqualitäten beteiligt sein, würde sich dies in einem veränderten Trinkverhalten der betroffenen Mäuse gegenüber den entsprechenden Substanzen zeigen.

Die Verhaltensexperimente sollen klären, ob Veränderungen und Unterschiede bei der Detektion der fünf Grundgeschmacksqualitäten (süß, umami, sauer, salzig, bitter) existieren und damit einen Beitrag zum detaillierten Verständnis der Übertragung von Geschmacksinformationen zum zentralen Nervensystem leisten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Dieser Abschnitt benennt Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien, die für diese Arbeit benutzt wurden. Materialien und Geräte, die zur Grundausstattung eines molekularbiologischen Labors gehören, sind nicht explizit aufgeführt.

2.1.1 Laborgeräte

Tabelle 2.1 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Binokularmikroskop SMZ 645	Nikon, Amstelveen
Colibri - Spektralphotometer	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Färbeautomat Shandon Varistain 24-4	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Fluoreszenzmikroskop AxioPlan 1	Carl Zeiss Microscopy, Jena
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Biberach
Geldokumentationsanlage GeneGenius	Synoptics, Cambridge
Infra-E-Motion Nutrition Monitor	Infra-E-Motion GmbH, Hamburg
konfokales Laserscanningmikroskop LCS SP2	Leica Microsystems, Wetzlar
Kryostat Microm HM560	Thermo Scientific, Waltham
Mikrowelle	Siemens, München
pH-Meter HI9024	Hanna Instruments, Woonsocket
pH-Meter Lab 850	Schott Instruments, Mainz
Pipettierroboter Freedom Evo150	Tecan, Crailsheim
qPCR Maschine Quant Studio 12K Flex	Applied Biosystems, Waltham
Spannungsquelle für Elektrophorese EPS 601	BioRad, München
Spannungsquelle für Elektrophorese n	BioRad, München
Thermocycler T3000 Thermocycler	Biometra, München
Thermocycler TProfessional	Biometra, München
Thermomixer® compact	Eppendorf, Hamburg
Tissuelyser II	Quiagen, Hilden
Vakuumentrifuge concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Vakuumentrifuge 5301	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2	Specific Industries, Bohemia
Wasserbad 1003	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Wasserbad OSL200	Grant Instruments, Shepreth
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2.2 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien	Hersteller	Bestellnummer
2-Methylbutan	Carl Roth, Karlsruhe	3927.1
2-Propanol	VWR International, Darmstadt	1096341011
Advantage 2 Polymerase Mix	TaKaRa Clontech	639201
Amilorid	Sigma-Aldrich, Steinheim	A-7410
Antibody Diluent, Background Reducing	Dako, Hamburg	S3022
Blocking Reagenz	Roche Applied Science, Mannheim	11096176
Chloroform	VWR International, Darmstadt	1024451000
Daily System Clean	Laborbedarf von Lueder	2001
DEPC	Carl Roth, Karlsruhe	K028.2
Dextransulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim	D8906-50G
DIG RNA Labeling Mix	Roche Applied Science, Mannheim	1277073
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe	P030.1
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim	D8418-250ML
DNase I	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt	18068-015
dNTPs	Fermentas, St.-Leon-Rot	#R0181
EDTA- Ethylendiamintetraessigsäure	Carl Roth, Karlsruhe	8040.3
Essigsäureanhydrid	Sigma-Aldrich, Steinheim	45830
Ethanol	VWR International, Darmstadt	1.00983
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim	E1510
Fluorescent Mounting Medium	Dako, Hamburg	S3023
Formamid	Sigma-Aldrich, Steinheim	F7503-11
GenRuler DNA Ladder Mix	Fermentas, St.-Leon-Rot	SM0331
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim	G5516
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe	3790.2
Herring Sperm DNA 100 mg	Promega GmbH, Mannheim	D1815
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Applied Science, Mannheim	11732668001
Hybridisierungspuffer	Ambion, Life Technologies, Darmstadt	B8807G
Inosinmonophosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim	I-4625
Iodoacetamid	Sigma-Aldrich, Steinheim	I1149-25g
Isofluran	cp-pharma, Burgdorf	798-932
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe	P3911-1Kg
Kaliumhydrogencarbonat	Carl Roth, Karlsruhe	P748.2
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe	3904.1
Kaliumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe	6781.1
Lamm-Serum	Gibco, Life Technologies, Darmstadt	16070-096
Levamisol	Sigma-Aldrich, Steinheim	L9756-10g
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt	1058331000
Maleinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim	M0375-1Kg
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt	106.009
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe	9265.1
Natriumcitrat Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe	3580.1

Chemikalien	Hersteller	Bestellnummer
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt	106.329
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe	6771.1
Objekträger Superfrost	Carl Roth, Karlsruhe	H867.1
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim	P6148
PerfectTaq™ Plus MasterMix	5 Prime GmbH, Hilden	2200095
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth, Karlsruhe	A156.1
Proteinase K	Roche Applied Science, Mannheim	3115844001
Random Primers	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt	VX48190011
RiboLock Rnase Inhibitor (4x2500 U)	Fermentas, St.-Leon-Rot	#E00382
<i>RNAlater</i>	Qiagen, Hilden	1017980
RNase A 100 mg	Roche Applied Science, Mannheim	1,011E+10
RNase Away	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt	10328-011
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe	X942.1
SDS	Carl Roth, Karlsruhe	CN30.2
Set up Clean	Laborbedarf von Lueder	3000937(2000)
Superscript II - Reverse Transkriptase (10.000 U)	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt	18064-014
T3 RNA Polymerase (1000 U)	Roche Applied Science, Mannheim	11031163001
T7 RNA Polymerase (1000 U)	Roche Applied Science, Mannheim	10881767001
Tissue freezing medium	Leica, Wetzlar	20108926
Triethanolamin	Sigma-Aldrich, Steinheim	90279-100ML
Tri-Natriumcitrat dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe	3580.1
Tris	Carl Roth, Karlsruhe	4855.2
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim	101
TRIzol	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt	101371898
Trocknungskissen - Minipax® absorbent packets	Sigma-Aldrich, Steinheim	Z163597-50EA
TSA Biotin System	Perkin Elmer LAS, Rodgau	NEL700001KT
Tween	Carl Roth, Karlsruhe	9127.1
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim	216763

2.1.3 Geschmacksstoffe

Während des Tierexperimentellen Arbeiten wurden folgende Geschmacksstoffe für Stimulations- (siehe 2.2.2.5) oder Verhaltensexperimente (siehe 2.2.2.7, 2.2.2.8) benutzt.

Tabelle 2.3 verwendete Geschmacksstoffe

Geschmacksstoffe	Hersteller	Bestellnummer
6-n-Propylthiouracil	Sigma-Aldrich, Steinheim	P37755
Acesulfam K	Fluka, St. Gallen	4054
Arbutin	Sigma-Aldrich, Steinheim	A4256
Chinin hydrochlorid Dihydrat	Fluka, St. Gallen	22642
Chlorhexidin	Fluka, St. Gallen	24800

Geschmacksstoffe	Hersteller	Bestellnummer
Cucurbitacin I	APIN-Chemicals	EX0021S
Cycloheximid	Sigma-Aldrich, Steinheim	C-7698
Denatoniumbenzoat	Sigma-Aldrich, Steinheim	D-5765
Erythromycin	Sigma-Aldrich, Steinheim	E6376
Mononatriumglutamat	Sigma-Aldrich, Steinheim	G-1626
Natriumbenzoat	Fluka, St. Gallen	71295
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe	9265.1
Papaverinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim	P3510
Sacchaose	Carl Roth, Karlsruhe	9286.1
Saccharoseoctaacetat	Fluka, St. Gallen	84112
Salicin	Fluka, St. Gallen	84150
Salicylsäure	Fluka, St. Gallen	84210
Sucralose	Sigma-Aldrich, Steinheim	69293-100G
Zitronensäure	Carl Roth, Karlsruhe	X863.2

2.1.4 Lösungen und Puffer

Die Zusammensetzungen der hergestellten Puffer-Lösungen sind zur jeweiligen Beschreibung im Methodenteil aufgeführt. Soweit nicht anders angegeben wurden alle Lösungen mit deionisiertem Wasser hergestellt (Leitfähigkeit: maximal $0,06 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$). Lösungen, die für *in-situ*-Hybridisierung (ISH) genutzt wurden, wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser angesetzt. Durch Zugabe von (DEPC) in die Lösungen sollen Ribonukleasen (RNasen) inaktiviert werden.

2.1.5 Plasmide

Zur späteren Generierung von ISH-Sonden wurden als Matrize in einer PCR Plasmide bestehend aus dem Grundvektor pcDNA5/FRT (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) bzw. pEAK 10 (Edge Biosystem, Gaithersburg, USA) verwendet. In die multiple-cloning-site dieser Vektoren wurde mittels Klonierungskassette die jeweilige Bitterrezeptorsequenz (C57BL/6-Mausstamm) eingebracht. Diese Klonierungsarbeiten wurden von Dr. Kristina Loßow (DifE) durchgeführt. Die für diese Arbeit verwendeten Bitterrezeptor-Plasmid Kombinationen sind in Tabelle 2.4 aufgeführt.

Tabelle 2.4. Plasmide mit Rezeptorsequenz

klonierte Rezeptorsequenz	Grundvektor
Tas2r105	pcDNA5/FRT
Tas2r109	pEAK 10
Tas2r123	pEAK 10
Tas2r125	pEAK 10
Tas2r135	pEAK 10
Tas2r137	pEAK 10

2.1.6 Oligonukleotide

2.1.6.1 Oligonukleotide für Genotypisierungs- und Endpunkt-RT-PCR

Die Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion (Genotypisierungs-PCR, Endpunkt-RT-PCR, qRT-PCR) wurden von *Eurofins MWG Operon*, Ebersberg bezogen. Sie wurden in deionisiertem, UV-bestrahltem Wasser zu einer Endkonzentration von 100 µM gelöst und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2.5 Primer für Genotypisierungen von Mäusen

Analysierte Sequenz	Primer	Sequenz 5'→3'	Fragmentgröße
Cre	Cre_for.	GCAAGAACCTGATGGACATGTTTCAGG	413 bp
	Cre_rev.	CAGATTACGTATATCCTGGCAGCGATCG	
DTA	DTA_for.	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT	350 bp
	DTA_rev.	GGAGCGGGAGAAAATGGATATG	
hrGFP	hrGFP_for.	AAGTACCCCGAGGACATCAGCGACTTCTTC	368 bp
	hrGFP_rev.	GTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACAT	
TeNT	TeNT_for.	CAATTATTATGATGGAGCCACCATACTGTAAG	393 bp
	TeNT_rev.	TAGTTGCTCCACTGGGGTCTTGTTTC	
tauGFP	tauGFP_for.	CGAAGTCGCTCTGAGTTGTTATC	400 bp
	tauGFP_rev.	GTCCTATTGGCGTACTATG	

Tabelle 2.6 Primer für Endpunkt-RT-PCR

Analysierte Sequenz	Primer	Sequenz 5'→3'	Fragmentgröße
Tas2r105	Tas2r105_for.	ATGCTGAGTGCGGCAGAAAGGCA	294 bp
	Tas2r105_rev.	CCAGACAGTCAGGTGATTCACAGTCA	
Tas2r108	Tas2r108_for.	TGCTCTGGGAACTGTATGTATTTGTGTT	274 bp
	Tas2r108_rev.	GCATCCAGAAACTCCAACACAATAGAA	
Tas2r110	Tas2r110_for.	GACTGGACCAAGAGAAGAAGCATTTCATCAGC	446 bp
	Tas2r110_rev.	GAATTGATGAATAAGGAAATTGTGGGAAATGGG	
Tas2r114	Tas2r114_for.	ATGCTGAGCACAATGGAAGGTGTC	302 bp
	Tas2r114_rev.	GTGGCAAACAGACATTCAATTGAC	
Tas2r117	Tas2r117_for.	GTTTCATGGTCTGGTCCACTGTATG	223 bp
	Tas2r117_rev.	CAATCCAGATGCTGAAATGGTTGG	
Tas2r118	Tas2r118_for.	GTGCCAACGCAAGTCACCATCT	392 bp
	Tas2r118_rev.	CCCAGTATCAACCAGAGAACCAGTTTC	
Tas2r119	Tas2r119_for.	GAAGGTCATATGCTCTTCTCCTCCTG	362 bp
	Tas 2r119_rev.	GATATCCTCATCTTCAGCCACAGAAAGA	
Tas2r120	Tas2r120_for.	CTGTGCCAATGTCTTCATAACCATAGTG	287 bp
	Tas2r120_rev.	GACTGTTGGAAAATGGCTATCTTGAA	
Tas2r121	Tas2r121_for.	CCCTGGTCTCCTTCATCCTGTTAATCTTCTC	325 bp
	Tas2r121_rev.	CCACATTTAAGATATGTCATCACCCAAAGACTG	
Tas2r126	Tas2r126_for.	GCTTCATTGTGCTGATGCTGAGCAG	322 bp
	Tas2r126_rev.	CAACGCTGGGAATCTCCACTTCAAC	

Analysierte Sequenz	Primer	Sequenz 5'→3'	Fragmentgröße
Tas2r131	Tas2r131_for. Tas2r131_rev.	GACTGGAGAATCTATGAAGGGAGAGGATCAG CTGCTTGAAACACTTCCTATTTGGGGAG	508 bp
Tas2r134	Tas2r134_for. Tas2r134_rev.	GCAGGAATGGGTACGAAGCCAG CCAGCAGTAACCTGGGCACTGACC	392 bp
Tas2r136	Tas2r136_for. Tas2r136_rev.	TGTTCTCTGTGTAAACACCTTAGGACAATGAGG GATACAAGGTTCCAATAACCTGGCAAATCAG	217 bbp
Tas2r137	Tas2r137_for. Tas2r137_rev.	CTACCTTCTGCTGCTCCTCTCTCTG CAGGTTTCAGATGACCACACTCACATG	330 bp
Tas2r138	Tas2r138_for. Tas2r138_rev.	TCCTGTCTTAACTGTGCCTATGAAGCC AAGAAATCTCCTGGAGACCCAGCTT	409 bp
Tas2r140	Tas2r140_for. Tas2r140_rev.	TAGGGTGTTTAGGAAATGGATTCATAGC AAACCACAGTTTTTACCCTCCACCTT	336 bp
Tas2r143	Tas2r143_for. Tas2r143_rev.	CCCTCCACACCCACATTGATCTTCATTATC CCAGAGGATGCCAATAAGGTTTCGCTTG	249 bp
Tas2r144	Tas2r144_for. Tas2r144_rev.	CAGTCATCTATGGGACTGAATGGGTCAG CAAGCAGCAAACCAGAGGTTACAGTAGT	223 bp
β-Actin	β-Actin_for. β-Actin_for.	TGGGAATGGGTGAGAAGGACTCCTATG TCTTCATGAGGTAGTCTGTGAGGTCCTCG	cDNA: 441 bp gDNA: 895 bp
sst hsv	T7-sst_for T3r-hsv_rev	TAATACGACTCACTATAGGGCTGGCTGTGAGTGGCGAATTC AATTAACCTCACTAAAGGCTCTTCAGGAGCGAGTTCAGGCT	variabel

2.1.6.2 Oligonukleotide für quantitative RT-PCR –Analysen

Für die Expressionsanalysen von Bittergeschmacksrezeptoren im peripheren und zentralen Nervensystem wurden folgende Primer- und Sonden-Kombinationen verwendet. Dabei wurden einige wenige Primer und Sonden bei der Firma *Applied Biosystems Life Technologies GmbH* kommerziell erworben (siehe Tabelle 2.7B). Alle anderen Primer und Sonden wurden von Dr. Sandra Hübner (DIfE) mit dem Programm *Primer Express 3.0* entworfen und durch *Eurofin MWG Operon* generiert. (Tabelle 2.7A)

Tabelle 2.7A qRT-PCR-Primer/Sonden

Analysierte Sequenz	Primer/ Sonde	Sequenz 5'→3'	Fragmentgröße
Tas2r102	Tas2r102-Sonde Tas2r102_for. Tas2r102_rev.	5'FAM-CTCTGGCTTGCCACAACCTCTCAGCG-3'TAM 5'-GCTGGGTCTTTCTAGTCACTTCA-3' 5'-CTGCCAGGAGCAGTTAGCTATTC-3'	89 bp
Tas2r103	Tas2r103-Sonde T2r103_for. T2r103_rev.	5'FAM-TCAGCACAGTGGCCACATAAAAAGGC-3' GTGCCACAGGCTCCAGAGAT ACAGGAAGGTTACCACAGTTTGC	72 bp
Tas2r104	Tas2r104-Sonde Tas2r104_for. Tas2r104_rev.	5'FAM-TGCCGAGCAGTCTACATGAATGCATGA-3'TAM 5'-CAAAGGTTTTCTTCTGACTATGCT-3' 5'-CAAACGCTCAGATGGTTAATAATTACC-3'	91 bp

Analysierte Sequenz	Primer/ Sonde	Sequenz 5'→3'	Fragmentgröße
Tas2r105	Tas2r105-Sonde	5'FAM-TCATTTGTTGTGAAGTGATGAAGGACGG-3'TAM	92 bp
	Tas2r105_for.	5'-TGCTAACTTCATGGGTAATCTCCTT-3'	
	Tas2r105_rev.	5'-GTACATCTCCGAGGTCCTGTTTCT-3'	
Tas2r107	Tas2r107-Sonde	5'FAM-CCCTGCGGTCACTCAATCATCGTAATTT-3'	79 bp
	T2r107_for.	GTTTGACAGCCACATGCCTCTA	
	T2r107_rev.	GAGGCTTGCTTTAACTGCTTATTTT	
Tas2r108	Tas2r108-Sonde	5'FAM-CAGACGGAGGCTCACATGGGTGC-3'TAM	72 bp
	Tas2r108_for.	5'-AACAGGACCAGCTTTTGGAAATC-3'	
	Tas2r108_rev.	5'-GAGGAAACAGATCATCAGCCTCAT-3'	
Tas2r109	Tas2r109-Sonde	5'-FAM-TCCTCACCGCTTTGGCAACTTCTAGAATT-3'TAM	113 bp
	Tas2r109_for.	5'-GCATGGACTGGGTTAAGAGAAAA-3'	
	Tas2r109_rev.	5'-GCTAATTGAAAAACCTACTAGCATGA-3'	
Tas2r110	Tas2r110-Sonde	5'FAM-AGATGCCAGCACCATGGCCCA-3'	76 bp
	T2r110_for.	AGGTCAATGCCAAACCACCTA	
	T2r110_rev.	AGGAAGGAGAACCCTGTTTGC	
Tas2r114	Tas2r114-Sonde	5'FAM-ATCCCGGTGCCACTCACTTATCCTAATTC-3'TAM	77 bp
	Tas2r114_for.	5'-GTTTGGTTTGACAACACTGCATTCA-3'	
	Tas2r114_rev.	5'-GCTTCAGCCGACTGTTTGTCT-3'	
Tas2r116	Tas2r116-Sonde	5'FAM-TGGGTTTCATACCTTTTGCTGTGCTACTGGT-3'	77 bp
	T2r116_for.	TCCATTTGCCAACACCATGT	
	T2r116_rev.	GGGAGAAAACAAGAAGGACAAAAG	
Tas2r118	Tas2r118-Sonde	5'FAM-TCAGCTGGGCATCTCACATTTCTGTC-3'TAM	76 bp
	Tas2r118_for.	5'-CACCGGTGGAGACGATTCTC-3'	
	Tas2r118_rev.	5'-AAGTTGTATAGCATTGATGTCCACTGT-3'	
Tas2r119	Tas2r119-Sonde	5'FAM-AACCAAGACTCAGTGACTTGCCAGTGC-3'TAM	75 bp
	Tas2r119_for.	5'-CAAGAGCTTGGGTCACCTCAA-3'	
	Tas2r119_rev.	5'-TGTTGGCTGAGTGATGAGTAGCA-3'	
Tas2r120	Tas2r120-Sonde	5'FAM-CTGTTTTTGGTTGCATATCTTGGGATGGTG-3'TAM	80 bp
	Tas2r120_for.	5'-CTTGTGATTTTCTGGGATCGT-3'	
	Tas2r120_rev.	5'-CTCATCCAAGCAATCTTCTTGATG-3'	
Tas2r121	Tas2r121-Sonde	5'FAM-CATTGGTTGGATCCTGCTTTTCTTGGC-3'	88 bp
	T2r121_for.	ATTGGGTCAGGAAAGGAACTCTT	
	T2r121_rev.	AACATTTCCCATATCAACACCATTC	
Tas2r122	Tas2r122-Sonde	5'FAM-TTTCATTCTTACTTGGTTGGCCATCTCCAG-3'TAM	91 bp
	T2r122_for.	TGGTTCAAGAATCAGAAAATCTCTGT	
	T2r122_rev.	CAGCAATTGTTGTCCATAGAACACA	
Tas2r123	Tas2r123-Sonde	5'FAM-TTTGCATATTGTTATTCATGCTGTGCCCA-3'	84 bp
	T2r123_for.	CCAGATTCATTTATGTCTTGTCTATGC	
	T2r123_rev.	GCATTTCTGATCTCCTAGGCAAA	
Tas2r124	Tas2r124-Sonde	5'FAM-TACGGCCCACAGAAATGCCTTGAGA-3'	78 bp
	T2r124_for.	CAATTCTAGAGGAGATAGAGACCCTAGTG	
	T2r124_rev.	AGCAAGAGGAAGGAGACCAAAA	
Tas2r125	Tas2r125-Sonde	5'FAM-CCCTGTGGAGACCTGAAAACCATGC-3'	79 bp
	T2r125_for.	TTGGCTTTTCTGCTTCTCATCTT	
	T2r125_rev.	TGCTTCGGAGCCTTTAGCATAG	

Tas2r126	Tas2r126-Sonde	5'FAM-TCTTCACTGGGACTTCTTGAACCTAGCCA-3'	71 bp
	T2r126_for.	TGCCCGGCAGCTCATT	
	T2r126_rev.	TGAGCCAGGTACAAAACCAGAA	
Tas2r129	Tas2r129-Sonde	5'FAM-CAGAGATGTCCTTGCCAGATGCCACA-3'	72 bp
	T2r129_for.	TGCAACAGCATGCACAAAGA	
	T2r129_rev.	TGACCATGGTTTGCAAGACTCT	
Tas2r130	Tas2r130-Sonde	5'FAM-TCCTGGCCCTGTTTGTGTCTACTGCC-3'	79 bp
	T2r130_for.	TGAAAGCCATGAAAGCAGTAATTT	
	T2r130_rev.	CTGGAGGTGGCTATGAGAAAGG	

Analysierte Sequenz	Primer/ Sonde	Sequenz 5'→3'	Fragmentgröße
Tas2r131	Tas2r131-Sonde	5'FAM-TAGCCACATTTCCCATCCCCTTTTC-3'TAM	83 bp
	Tas2r131_for.	5'-CTGCCTGAGCATATTCTACTTATTCAA-3'	
	Tas2r131_rev.	5'-CACCTCTCAATCTCCACTTAAACCA-3'	
Tas2r134	Tas2r134-Sonde	5'FAM-AGGGCCTCCCTGCAGGTGACATG-3'	73 bp
	T2r134_for.	GGCAGGGAATGGGTACGAA	
	T2r134_rev.	ACCTGGAGGCAGCTAAGCAA	
Tas2r135	Tas2r135-Sonde	5'FAM-TGGCTAAAGTACAGGTTGCCTGGGTGG-3'	74 bp
	T2r135_for.	AACCTTAACCCATCCTGTCTTTGT	
	T2r135_rev.	CACTGAGCAGCATCCATGGT	
Tas2r136	Tas2r136-Sonde	5'FAM-CCAGGGCCCCAGTGCTTCAACC-3'	77 bp
	T2r136_for.	CAATGAGGCTTTATGAAAAGGA	
	T2r136_rev.	TGAGATCAAAACTTGCAAAACCTTA	
Tas2r137	Tas2r137-Sonde	5'FAM-CTCCACCCCTCATTCCTCTGGCTC-3'	78 bp
	T2r137_for.	TTCTACTGCCTGAAAATAGCCAGTT	
	T2r137_rev.	AACAACCACTCTAGAAGCTCTCCATT	
Tas2r138	Tas2r138-Sonde	5'FAM-CCTGCAGGGCCTTCTGCTTCTGG-3'TAM	65 bp
	Tas2r138_for.	5'-GTCTCAGCATCACTCGCTTT-3'	
	Tas2r138_rev.	5'-GCAGGCGAGCTGAATAGCA-3'	
Tas2r139	Tas2r139-Sonde	5'FAM-TGCCACTGGCTCCAGAAACCCC-3'	70 bp
	T2r139_for.	ACACACCCTGAACATGAGAAACA	
	T2r139_rev.	GGCCTGCATATGAGCCTCTATG	
β-Aktin	beta-actin-Sonde	5'FAM-TTGAGACCTTCAACACCCAGCCA-3'TAM	103 bp
	beta-actin_for.	5'-TACGACCAGAGGCATACAG-3'	
	beta-actin_rev.	5'-GCCAACCGTGAAAAGATGAC-3'	

Tabelle 2.7B qRT-PCR-Assays der Firma *Applied Biosystems*

Rezeptor	Assay Typ	Assay Nummer	Fragmentgröße
Tas2r106	Assay ABI	Mm01702023_s1	113 bp
Tas2r113	Assay ABI	Mm01702024_m1	74 bp
Tas2r115	Assay ABI	Mm01160239_s1	105 bp
Tas2r117	Assay ABI	Mm04213039_s1	103 bp
Tas2r140	Assay ABI	Mm 03011269_s1	104 bp
Tas2r143	Assay ABI	Mm01700139_s1	114 bp
Tas2r144	Assay ABI	Mm01700149_s1	83 bp

2.1.7 Antikörper

Tabelle 2.8 Primär- und Sekundärantikörper sowie weitere Farbstoffe, GFP - Grün fluoreszierendes Protein, VGLUT - vesikulärer Glutamattransporter

Primärantikörper Epitop	Wirts- spezies	Art	Konjugierte Gruppe	Hersteller	Bestellnr.	Verdünnung
Calbindin	Kaninchen	monoklonal	-	Sigma-Aldrich	C2724	1:500
Cholin-Acetyl-Transferase	Kaninchen	polyklonal	-	Chemicon	AB143	1:100
Digoxigenin	Schaf	polyklonal	POD, FAB	Roche	1207733	1:500
Dopamin- β -Hydroxylase	Kaninchen	polyklonal	-	ImmunoStar	22806	1:200
Glutamat-Decarboxylase 67	Ziege	polyklonal	IgG	Santa Cruz	sc-7512	1:500
GFP	Kaninchen	polyklonal	-	Invitrogen	A11122	1:500
GFP	Hühnchen	polyklonal	IgY	Thermo Scientific	A10262	1:500
Gustducin	Kaninchen	polyklonal	IgG	Santa Cruz	sc-395	1:100
Gustducin-Blockierpeptid				Santa Cruz	Sc-395-P	10x
Glycinrezeptor Untereinheiten α 1+2	Kaninchen	polyklonal	IgG	abcam	ab23809	1:200
Methionine Enkephalin	Kaninchen	polyklonal	IgG	ImmunoStar	20065	1:200
Tryptophanhydroxylase 2	Kaninchen	polyklonal	-	Millipore	AB15572	1:1000
Tyrosinhydroxylase	Kaninchen	polyklonal		Millipore	AB152	1:300
VGLUT1	Kaninchen	polyklonal		SYSY	135 302	1:1000
VGLUT2	Kaninchen	polyklonal		SYSY	135402	1:500
Sekundärantikörper						
Epitop	Wirts- spezies	Konjugierte Gruppe		Hersteller	Bestellnr.	Verdünnung
Hühnchen-IgG	Ziege	Alexa Fluor 488		Molecular Probes	A-11039	1:300
Kaninchen-IgG	Ziege	Alexa Fluor 546		Molecular Probes	A11010	1:300
Kaninchen-IgG	Schaf	Cy3		Sigma	C2306	1:300
Ziegen-IgG	Esel	Alexa Fluor 488		Molecular Probes	A11055	1:300
Ziegen-IgG	Kaninchen	Alexa Fluor 546		Molecular Probes	A-21085	1:300
Weitere Komponenten						
	Gekoppelter Fluoreszenzfarbstoff			Hersteller	Bestellnr.	Verdünnung
Biotin	Streptavidin-Cy3			Jackson ImmunoR.	016-160- 084	1:1000
Farbstoffe	Hersteller				Bestellnr.	Verdünnung
DAPI	Sigma-Aldrich				D9542	1: 1000
TOPRO®-3-Iodid	Invitrogen				T3605	1: 1000

2.1.8 Versuchstiere

Für Tierexperimente dieser Arbeit wurden zum einen Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 Tiere von Janvier, zum anderen verschiedene gentechnisch veränderte Mauslinien genutzt (Vgl. Tab. 2.10).

Tabelle 2.9 Tierversuchsanträge (TVA)

Versuchsvorhaben	TVA -Genehmigung
Stimulationsexperimente	23-2347-8-10-2008 2347-21-2014
Kurzzeitpräferenztests	23-2347-22-2010 23-2347-22-2010Ä3 V3-2347-35-2012
Zwei-Flaschen-Präferenztests	2347-16-2014

Tabelle 2.10 Mauslinien

Mausstamm-Kurzbezeichnung	Mausstamm	Herkunft	Referenzen
C57BL/6	C57BL/6J	Elevage Janvier (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich)	
Tas2r131 ^{BLIG}	B6;129Sv-Tas2r131 ^{tm1.1BL-IRES-hrGFP}	Dr. Anja Voigt, DfE	Voigt et al. 2012
Tas2r131 ^{BLIC}	B6;129Sv-Tas2r131 ^{tm1.2BL-IRES-Cre}	Dr. Anja Voigt, DfE	Voigt et a. 2015
Reportermauslinien			
Rosa26 ^{DTA}	B6;E14.1-Rosa26 ^{tm1lacZfloxDTA}	Prof. Dr. Ulrich Boehm (Universität des Saarlandes, Homburg)	Brockschnieder et al. 2006
eRosa26 ^{tauGFP}	B6;129Sv-Rosa26 ^{tm1neofloxtauGFP}	Prof. Dr. Ulrich Boehm (Universität des Saarlandes, Homburg)	Wen et al. 2011
Rosa26 ^{TeNT}	B6; SJL-Rosa26 ^{tmneofloxTeNT}	Prof. Dr. Martyn Goulding (The Salk Insitute for Biological Studies, USA)	Zhang et al. 2008
Verpaarung der Tas2r131^{Cre}-Linie mit den Reporterlinien			
Tas2r131 ^{BLIC} /Rosa26 ^{DTA}	B6;129Sv-Tas2r131 ^{tm1.2BL-IRES-Cre} / B6;E14.1-Rosa26 ^{tm2.1lacZfloxDTA}	Dr. Anja Voigt, DfE	Hübner, 2014
Tas2r131 ^{BLIC} /Rosa26 ^{tauGFP}	B6;129Sv-Tas2r131 ^{tm1.2BL-IRES-Cre} / B6;E14.1-Rosa26 ^{tm2.1tauGFP}	Dr. Anja Voigt, DfE	Foster et al. 2013
Tas2r131 ^{BLIC} /Rosa26 ^{TeNT}	B6;129Sv-Tas2r131 ^{tm1.2BL-IRES-Cre} / B6; SJL-Rosa26 ^{tmneofloxTeNT}	Dr. Anja Voigt, DfE	

2.1.8.1 Tas2r131^{BLIG} – Mauslinie

Die Mauslinie Tas2r131^{BLIG} wurde von Dr. Anja Voigt (DfE) generiert. In diesem Mausmodell ist die kodierende Sequenz des Bitterrezeptors Tas2r131 durch ein modifiziertes Targeting-Konstrukt ausgetauscht. Dieses Konstrukt (BLIC - *Barley lectin* - IRES - hrGFP) enthält ein Gerstenlectin (*barley lectin*) sowie ein humanisiertes grün fluoreszierendes Protein (*Humanized Renilla reniformis green fluorescent protein*). Die interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) gewährleistet dabei die unabhängige Translation der beiden mRNA-Sequenzen. Unter Kontrolle des Tas2r131-Promoters wird anstelle des Bitterrezeptors der Fluoreszenzreporter hrGFP exprimiert.

2.1.8.2 Tas2r131^{BLIC} – Mauslinie

Bei der Mauslinie Tas2r131^{BLIC}, generiert von Dr. Anja Voigt (DfE), ist die kodierende Sequenz des Bitterrezeptors Tas2r131 durch ein modifiziertes Targeting-Konstrukt ausgetauscht. Dieses Konstrukt (BLIC - *Barley lectin* - IRES - Cre) enthält ein Gerstenlectin (*barley lectin*) sowie die ortsspezifische Cre-Rekombinase. Die interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) gewährleistet dabei die unabhängige Translation der beiden mRNA-Sequenzen.

2.1.8.3 Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA}- Mauslinie

Mäuse der Linie Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA} entstehen aus der Verpaarung von Tas2r131^{BLIC} (Anja Voigt, DfE) mit Rosa26^{DTA} (Brockschnieder et al., 2006) Mäusen. Dabei werden selektiv alle Zellen, die den Bitterrezeptor Tas2r131 enthalten, durch das DTA (Diphtherie-Toxin A) abgetötet. Die Cre-Rekombinase vermittelte Expression des DTA unter Kontrolle des ubiquitären Rosa26-Promoters führt zu einer Inaktivierung des Elongationsfaktor EF-2. Dies bewirkt ein selektives Absterben der betroffenen Zellen. In diesem Fall alle Zellen, die den Bitterrezeptor Tas2r131 exprimieren.

2.1.8.4 *Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{tauGFP}*- Mauslinie

Bei der Verpaarung einer *Tas2r131^{BLIC}*- (Anja Voigt, DfE) mit einer *Rosa26^{tauGFP}*- Maus (Ulrich Boehm, Universität Saarland) exprimieren unter Vermittlung der Cre-Rekombinase alle *Tas2r131*-exprimierenden Zellen den Fluoreszenzreporter tauGFP.

2.1.8.5 *Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}*- Mauslinie

Bei der Verpaarung einer *Tas2r131^{BLIC}*- (Anja Voigt, DfE) mit einer *Rosa26^{TeNT}*- Maus (Martyn Goulding, The Salk Institute for Biological Studies) wird unter Vermittlung der Cre-Rekombinase die synaptische Signalweiterleitung *Tas2r131*-exprimierenden Zellen im zentralen Nervensystem unterbrochen. Dabei zerstört die leichte Kette des Tetanus-Toxins (TeNT) per Proteolyse das Synaptobrevin, welches an der Vesikelausschüttung an der synaptischen Membran beteiligt ist. Infolgedessen wird die Weiterleitung der Erregung in den betroffenen neuronalen Zellen erschwert bzw. unmöglich.

2.1.9 Software

Tabelle 2.11 Software

Programm	Hersteller
7500 Software v2.0.1	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
Excel 2010, 2013	Microsoft Corporation, Redmond, WA
GeneSnap 6.01	Synoptics, Cambridge
Graphic state	Coulbourn Instruments, Whitehall
IBM SPSS Statistics 20	International Business Machines Corp., New York
ImageJ	Wayne Rasband, NIH, Bethesda
Leica Confocal Software 2.61	Leica Microsystems, Wetzlar
MIRAX Scan 1.12	Carl Zeiss Microscopy, Jena
MIRAX Viewer 1.12	Carl Zeiss Microscopy, Jena
Photoshop CS3, CS6	Adobe Systems, San Jose
QuantStudio™ 12k Flex Software	Life Technologies, Carlsbad
SigmaPlot 11.0	Systat Software, Erkrath
Tecan EVOware 2.3, 2.5	Tecan, Crailsheim
Vektor NTI Suite 9	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2. 2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Konventionelle Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerasekettenreaktion werden spezifische DNA-Fragmente selektiv vermehrt. Bei diesem in drei Phasen verlaufenden sich zyklisch wiederholenden Prozess wird die DNA-Menge exponentiell vervielfacht. Der initiale Schritt der PCR ist die Denaturierung. Dabei kommt es bei Temperaturen von ca. 95 °C zum Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Doppelsträngen der DNA, sodass diese sich voneinander trennen. Es folgt das Anlagern von kurzen Oligonukleotiden, den sogenannten Primern (Primer annealing) an die DNA. Dazu wird den Primern ca. 30 s eine entsprechende Temperatur eingestellt, die eine optimale Hybridisierung dieser Oligonukleotide an die DNA-Stränge sicherstellt. Dabei richtet sich die Temperatur nach der Länge und Sequenz der verwendeten Primer. Die gegenläufigen Primer binden jeweils an komplementäre Bereiche der Enden der Einzelstränge der DNA und stellen somit Anfang und Ende für die DNA-Polymerase dar. Mittels DNA-Polymerase und den vier Grundbausteinen ATP, CTP, GTP und TTP erfolgt im dritten Schritt die Elongation der neuen DNA-Stränge. Die Amplifikation der DNA-Stränge erfolgt bei 72 °C durch die DNA-Polymerase, die ausgehend vom 3'-Hydroxyl-Ende in Richtung 5' Ende des Matrizenstranges komplementär dNTPs zum neuen Strang synthetisiert. Als Energie für die Synthese wird dabei die durch die Auflösung der Phosphoanhydridbindung im dNTP genutzt. Für eine weitere Vermehrung der vorliegenden doppelsträngigen DNA folgen weitere Wiederholungen dieses Zyklus' mittels Thermocycler. Der Thermocycler sorgt für konstante Bedingungen zu definierten Zeitpunkten während der Polymerasekettenreaktion und kühlt nach dem Vorgang die Produkte bei 4 °C.

Tabelle 2.12 Allgemeiner Reaktionsansatz sowie Konditionen einer PCR

Reagenz	Volumen	Konz.	Cycler Parameter			
cDNA-Template	~25-50 ng	~25-50 ng		Zyklen	Temperatur	Zeit
10 x Advantage Puffer	2,5 µl	1 x	initiale Denaturierung	1	95 °C	3 min
dNTP (10 mM)	0,5 µl	0,4 mM	Denaturierung		95 °C	45 s
Primer for. (10 µM)	0,5 µl	0,4 µM	Primer Anlagerung	35	55 °C	45 s
Primer rev. (10 µM)	0,5 µl	0,4 µM	DNA-Elongation		72 °C	1 min
50 x Advantage®2 Polymerase	0,5 µl	0,5 x	Terminale Elongation	1	72 °C	10 min
DEPC-H ₂ O	Ad. 25 µl		Abkühlen	∞	4 °C	∞

2.2.1.2 Agarosegelelektrophorese

Mittels Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente der Größe nach im Gel aufgetrennt. Bei Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die DNA-Elemente aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen von der Anode zur Kathode. Durch die fadenförmige Struktur der Agarosepolymere wird es möglich die Porengröße zu variieren. Durch Erhöhung des Agarosegehaltes werden kleinere Poren gebildet, sodass große Fragmente aufgrund ihres hohen Molekulargewichtes eine geringere Wanderungsgeschwindigkeit erlangen, als kleinere Fragmente. So kann man durch geeignete Auswahl des Agarosegels auch ähnlich große Moleküle diskret auftrennen. Dem

Agarosegel wurde Ethidiumbromid zugesetzt. Dieser rote Phenanthridin-Farbstoff, der aus Rotalgen gewonnen wird, interkaliert mit den Basen von DNA und RNA. Dadurch verändert sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid, sodass es zu einer 50-100 fachen Verstärkung der Fluoreszenzemission kommt, wenn dieses mit UV-Licht angeregt wird. Das Lichtsignal ist dabei proportional zur Menge und zur Länge der eingesetzten Nukleinsäure. Mittels Einsatz eines standardisierten Längenmarkers (GenRuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific) wurde eine Abschätzung der DNA-Fragmentgrößen möglich. Zur Herstellung der Agarosegele wurde in den jeweiligen Anteilen die Agarose in 1 x TAE unter Erhitzen gelöst und ca. 0,007-0,01 % Ethidiumbromid hinzugegeben. Das flüssige Agarosegel wurde luftblasenfrei in die entsprechende Kammer gegossen und mit einem Probenbeladungskamm versehen. Nach dem Abkühlen wurde das Gel mit dem Standardmarker und den Proben inklusive 6 x DNA-Ladepuffer beladen und in der Gelkammer bei 90 V ca. 25 min elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend unter UV-Licht ausgewertet.

2.2.1.3 Isolation und Reinigung von DNA-Fragmenten

Zur Isolation wurden die DNA-Fragmente aus dem Ethidiumbromidgel mithilfe eines Skalpell unter UV-Licht herausgetrennt. Die weiteren Reinigungsschritte wurden mittels illustra™ GFX™ PCR DNA und Gelband purification kit und dessen Protokoll durchgeführt. Pro 100 mg Gelstück wurden 100 µl Lyse Puffer bei 50 °C im Heizblock erhitzt bis eine homogene Flüssigkeit entstanden ist. Die DNA wurde auf eine Säule aufgetragen und unter mehrmaligem Waschen und Trocken von Pufferresten und Agarose befreit. Danach wurde die DNA mittels 20-50 µl nukleasefreiem Wasser von der Säule gewaschen. Anschließend wurde der DNA-Gehalt photometrisch bei 260 nm bestimmt (siehe 2.2.1.5).

2.2.1.4 Genotypisierung von Mäusen

2.2.1.4.1 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol –Aufreinigung - DNA Isolation aus Mausschwanzspitzen

Für die DNA-Isolation aus murinem Gewebe wurden Mausschwanzspitzen unter Zuhilfenahme von Lysepuffer und Proteinase K über Nacht bei 55 °C im Schüttler (300 rpm) lysiert. Für die standardmäßige Genotypisierung von Mäusen schlossen sich die Genotypisierungs-PCRs an.

Für Mäuse, bei denen nach Beendigung eines Experiments den Genotyp erneut überprüft bzw. bestätigt werden sollte, schloss sich eine DNA-Extraktion an. Hierbei wurde die genomische DNA mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion per Phasenbildung von Proteinen und RNA getrennt, abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß übergeführt. Unter Zugabe von NaCl (5 M) und eiskaltem Ethanol (100 %) erfolgte die Fällung der DNA bei 4 °C für 20 min. Nach Zentrifugation (10 min, 4 °C, 12.000 g) lag die DNA im Pellet vor. Es folgte das Waschen mit 70 %igem Ethanol (10 min, RT, 10.000 g), die Trocknung des DNA-Pellets und die abschließende Aufnahme in DEPC-Wasser. Nach Messung der Konzentration mittels Spektrometer wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Diese Methode wurde für Mäuse genutzt, um nach Beendigung eines Experiments den Genotyp erneut zu überprüfen bzw. zu bestätigen.

Lysepuffer

50 mM Tris-HCl (pH 8,0)

100 mM EDTA

100 mM NaCl

1 % SDS

50 µg/ml Proteinase K (Roth) [frisch dazu]

2.2.1.4.2 Genotypisierungs-PCRs

Zur Genotypisierung von Mäusen wurde das Standardprotokoll der konventionellen Polymerasekettenreaktion (siehe 2.2.1.1) durchgeführt. Die Verwendung spezifischer Primerpaare (siehe Tab. 2.5) ermöglichte eine DNA-Amplifikation, die nach elektrophoretischer Auftrennung ein spezifisches Bandenmusters ergab und folglich die genotypische Einordnung der Mäuse ermöglichte. Für die Genotypisierungs-PCRs wurde das PerfectTaq™ Plus MasterMix - Kit der Firma 5 Prime genutzt.

2.2.1.5 Photometrische Bestimmung von RNA und DNA-Konzentrationen

Die DNA- und RNA Konzentration wurde mittels Spektrometer (Colibri, Biozym) photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260 \text{ nm}$ bestimmt. Dazu wurde ca. $1 \mu\text{l}$ DNA- bzw. RNA-Lösung für eine Messung verwendet. Infolge der Absorption der aromatischen Ringe der Nukleinsäuren ist es möglich, basierend auf dem Lambert-Beerschen Gesetz ($E = \varepsilon * c * d$) die Konzentration zu bestimmen. Neben der Angabe über den Gehalt wurden auch die Reinheitskoeffizienten 260/230 und 260/280 bestimmt. Der Wert $A_{260\text{nm}/230\text{nm}}$ sollte im Bereich um 2,0 liegen, bei Abweichen liegen eventuell Verunreinigungen mit Phenolen oder Thiocyanensäure vor. Verunreinigungen durch Proteine zeigen sich in einem Abfall des Quotienten $A_{260\text{nm}/280\text{nm}}$, der normalerweise um 1,8 für DNA und 2,0 für RNA liegt.

2.2.1.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon®. Hierfür wurden die zu sequenzierenden Plasmid-DNA-Proben bzw. aufgereinigte DNA-Fragmente in einem $1,5 \text{ ml}$ Reaktionsgefäß eingeschickt. Dabei sollte ein Volumen von $15 \mu\text{l}$ mit einer Plasmid-DNA-Konzentration von $50\text{-}100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ bzw. $5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ bei gereinigten PCR-Produkten eingehalten werden. Das Sequenzierungsergebnis konnte nach zwei bis drei Tagen online eingesehen werden.

2.2.1.7 RNA-Isolation aus murinen Geweben

Für die qualitative und quantitative Untersuchung der Genexpression von Bittergeschmacksrezeptoren in einzelnen Geweben war es nötig die Gesamt-RNA zu isolieren. Dabei wurde zunächst das Gewebe mittels *TissueLyser* homogenisiert und aufgeschlossen. Die anschließende Chloroformextraktion ermöglichte das Abnehmen der RNA-Phase von DNA- und Proteinphase in ein neues Reaktionsgefäß. Durch die Zugabe von einer Volumeneinheit Isopropanol erfolgte die Präzipitation der RNA für 30 min oder über Nacht bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Nach dem Zentrifugieren (10 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 12.000 g) lag die RNA im Pellet vor. Es folgte das Waschen der RNA mit 75%-igem Ethanol (10 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 12.000 g) sowie die Trocknung und Aufnahme der RNA in DEPC-Wasser. Nach Messung der Konzentration mittels Spektrometer (siehe 2.2.1.5) wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ eingelagert.

2.2.1.8 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Mittels reverser Transkription kann RNA in komplementäre DNA umgeschrieben werden. Besonders bei quantitativen Expressionsanalysen sollte zunächst eine reverse Transkription stattgefunden haben, da die Taq-Polymerase nur DNA nicht aber RNA-Moleküle nutzen kann. Dazu wurden 2 µg RNA zunächst mittels DNase Verdau, bestehend aus DNase I (2 U), 1x DNase Puffer, Dithiothreitol (DTT) (8 mM), RNase-Inhibitor (20 U) sowie DEPC-Wasser für 30 min bei RT inkubiert, um die DNA-Reste abzubauen, die bei der RNA Extraktion nicht entfernt werden konnten. Anschließend wurde die DNase Reaktion durch Zugabe von EDTA (2,5 mM) und das Erhitzen des RNA-Gemischs für 10 min bei 65 °C inaktiviert.

Das RNA-Gemisch wurde anschließend mit Random Primern (6 µg) und dNTPs (0,8 mM) versetzt und für 5 min bei 65 °C inkubiert, um ein Anlagern der Oligonukleotide vorab zu ermöglichen. Die verwendeten Oligonukleotide, die alle Kombinationen der vier Basen beinhalten, dienen als Primer und können sich an die RNA lagern und als Startpunkte der Transkription fungieren.

Nachfolgend wurde der Reaktionsansatz in einen Ansatz (+) und einen Ansatz (-) aufgeteilt. Der Ansatz (+) enthielt neben First-Strang-Buffer (1x), DTT (20 mM), MgCl₂ (1 mM), RNase-Inhibitor (10 U) zusätzlich die SuperScript II reverse Transkriptase (200 U). Der Ansatz (-) enthielt keine reverse Transkriptase, anstelle dessen wurde das Volumen durch DEPC-Wasser ersetzt. Beide Ansätze wurden für 10 min bei RT inkubiert und nachfolgend die reverse Transkription bei 42 °C für 2 h im Thermocycler ausgeführt. Dabei verlängert die reverse Transkriptase mittels NTPs den komplementären cDNA-Strang und der RNase-Inhibitor verhindert ein vorzeitiges Abbauen des Matrizenstranges. Da nur ein Zyklus durchlaufen wird, entspricht die RNA-Konzentration der cDNA Konzentration. Im Anschluss erfolgte die Inaktivierung der reversen Transkriptase durch Inkubation der Proben bei 70 °C für 15 min. Für die Qualitätssicherung der hergestellten cDNA wurde anschließend eine PCR mit Intron-umspannenden Primern für β-Actin durchgeführt, um eventuelle Verunreinigungen mit genomischer DNA auszuschließen.

2.2.1.9 Reverse Transkription-PCR (RT-PCR)

Für Endpunkt-RT-PCR- Analysen wurde folgendes Standardprotokoll genutzt. Die Temperatur für die Primeranlagerung der verschiedenen Bittergeschmacksrezeptoren sind Tabelle 2.14 zu entnehmen.

Tabelle 2.13 Protokoll und Konditionen der RT-PCR-Analysen

Reagenz	Volumen	Konz.	Cycler Parameter			
			Zyklen	Temperatur	Zeit	
cDNA-Template	~25-50 ng	~25-50 ng				
10 x Advantage Puffer	2,5 µl	1 x	initiale Denaturierung	1	95 °C	2 min
dNTP (10 mM)	0,5 µl	0,2 mM	Denaturierung		95 °C	1 min
Primer for. (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM	Primeranlagerung	35	65-67 °C	1 min
Primer rev. (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM	DNA-Elongation		68 °C	50 s
Advantage®2 Polymerase	0,5 µl	0,5 x	Terminale Elongation	1	68 °C	4 min
DEPC-H ₂ O	Ad. 25 µl	Ad. 25 µl	Abkühlen	∞	4 °C	∞

Tabelle 2.14 Spezifische Temperatur zur Primeranlagerung für die RT-PCR-Analysen der verschiedenen Bittergeschmacksrezeptoren

PCR - Rezeptor	Temp.	PCR - Rezeptor	Temp.
Tas2r105	65 °C	Tas2r126	65 °C
Tas2r108	66 °C	Tas2r131	66 °C
Tas2r110	65 °C	Tas2r134	67 °C
Tas2r114	65 °C	Tas2r136	67 °C
Tas2r115	65 °C	Tas2r137	65 °C
Tas2r117	65 °C	Tas2r138	65 °C
Tas2r118	65 °C	Tas2r140	65 °C
Tas2r119	65 °C	Tas2r143	65 °C
Tas2r120	65 °C	Tas2r144	65 °C
Tas2r121	65 °C		

2.2.1.10 Quantitative Reverse Transkription-PCR (qRT-PCR)

Neben der klassischen PCR wird bei der quantitativen Real-Time-PCR die DNA-Menge endpunktunabhängig nach jedem Zyklus bestimmt. Dabei erfolgen die Amplifikation des Templates und deren Nachweis im selben Reaktionsgefäß, sodass eine aufwändige gelelektrophoretische Auftrennung entfällt. Die quantitative Einschätzung der PCR erfolgt mittels Fluoreszenzmessungen, die am Ende jedes PCR-Zyklus während der exponentiellen Phase stattfindet. Dabei verhält sich die gemessene Fluoreszenzstrahlung proportional zur synthetisierten DNA-Menge.

2.2.1.10.1 Prinzip der quantitativen Real-Time-PCR nach TaqMan

Bei der qRT-PCR Methode nach TaqMan wird nur eine Sonde verwendet, welche an einem Ende das Quencher-Fluorochrom (TAMRA [6-Carboxy-tetramethylrhodamin]) und am anderen Ende das Reporter-Fluorochrom (z.B. FAM [6-Carboxy-Fluorescein]) besitzt. Wenn die Taq-Polymerase während des PCR-Vorgangs den neuen Strang synthetisiert, wird mit ihrer vorhandenen 5'-3' Exonukleaseaktivität die Sonde abgebaut. Dadurch entfernen sich Reporter und Quencher voneinander und das Fluoreszenzsignal des Donatorfluorochroms wird messbar.

Bei der Auswertung der PCR wird die Fluoreszenzemission nach jedem PCR-Zyklus gegen die Zykluszahl aufgetragen. Es wird ein sogenannter Amplifications Plot gezeichnet. Ein solcher ist in Abbildung 2.1 dargestellt. In diesem Plot wird der Reaktionsverlauf der Proben ersichtlich. Ebenso wie bei der PCR nimmt die Menge der DNA bei der qRT-PCR exponentiell zu. Zu Beginn dieser Real-Time-PCR ist die Templatemenge begrenzt, daher können nur wenige Sonden spezifisch an die DNA binden. Mit exponentiell steigender Templatezahl, nimmt die Anzahl der durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase abgebauten Sonden zu. Dies zeigt sich in einem stärkeren Fluoreszenzsignal, dass ab dem C_t -Wert detektierbar wird. Der C_t -Wert (Cycle of Threshold) stellt dabei den Schwellenwert (Threshold) dar, an dem die Donator-Fluoreszenz erstmals stärker ist als die Hintergrundfluoreszenz. Um eine quantitative Aussage der gewonnenen cDNA bzw. der RNA zu treffen, wird zum Vergleich ein „house-keeping-gen“ wie β -Actin gemessen. Je höher die Templatemenge des zu amplifizierenden DNA-Stücks liegt, desto früher wird der C_t -Wert erreicht. In dieser Arbeit wurde die Real-Time-PCR in einem Volumen von 10 μ l durchgeführt. Dabei wurden der TaqMan Mastermix, Primer/Sonden-Mix, DEPC-Wasser, Taq-Polymerase und cDNA-Template

miteinander versetzt und anschließend die quantitative Real-Time PCR durchgeführt. Eine genauere Aufschlüsselung der Reagenzien wird in Tabelle 2.15 dargestellt.

Die kommerziell von *Applied Biosystems™* erworbenen Primer/Sonden Mixe sind unter 2.1.6.2 zu finden. Assays der verschiedenen Bitterrezeptoren wurden durch Dr. Sandra Hübner (DIfE) generiert. Nachfolgend werden die einzelnen Komponenten mit den entsprechenden Volumina genauer dargestellt (siehe Tab. 2.15, 2.16).

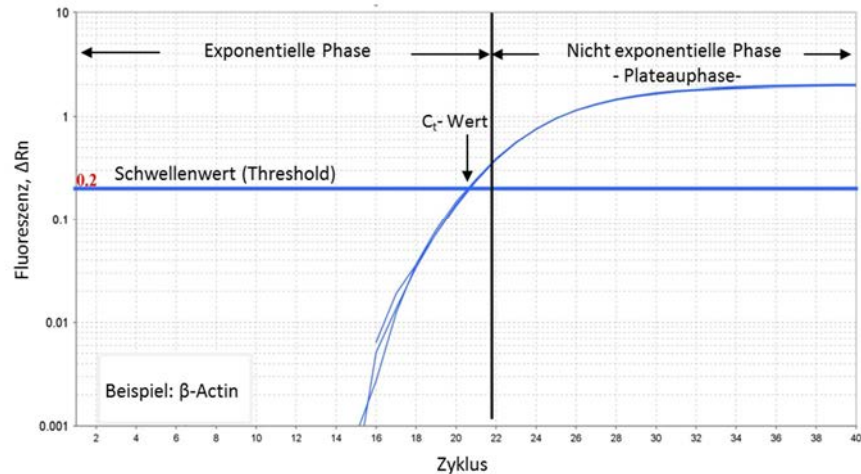


Abbildung 2.1 Beispiel eines Amplifikations-Plots (β -Actin)

Tabelle 2.15 Allgemeiner Reaktionsansatz sowie Konditionen einer qRT-PCR

Reagenz	Volumen für eine Dreifachbestimmung	Temperaturprofil	Temperatur	Zeit	Zyklen
DNA	12,5 -50 ng	Vorinkubation	50 °C	2 min	1x
Vorwärts-Primer	1,25 μ M	Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1x
Rückwärtsprimer	1,25 μ M	Denaturierung	95 °C	15 s	40 x
PCR-Sonde	0,5 μ M	Annealing & Elongation	60 °C	1 min	
2x TaqMan® Gene Expression Master Mix	1x				
DEPC-Wasser	Ad 10 μ l				

Tabelle 2.16: Eine Auswahl der eingesetzten Taqman Fluoreszenzfarbstoff mit den dazugehörigen Anregungs- und Emissionswellenlängen, R = Reporter, P = passiver Referenzfarbstoff, Q = Quentscher

Farbstoff	chemische Bezeichnung	Typ	Anregung [nm]	Emission [nm]
FAM	6-Carboxy-Fluorescein	R	488	518
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethylrhodamin	Q	488	582

Das Temperaturprofil der PCR-Reaktion begann mit einer Vorinkubation von 2 min bei 50 °C und anschließend 10 min bei 95 °C, die eine Aktivierung der Taq-Polymerase ermöglichte. Es folgten 40 Zyklen, die jeweils aus einer Denaturierungsphase von 15 s bei 95 °C und einem kombinierten Annealing- und Elongationsschritt von 1 min bei 60 °C bestanden.

2.2.1.10.2 Aufzeichnung und Auswertung der Daten

Nach Beendigung des qRT-PCR-Laufes wurden mittels QuantStudio™ 12k Flex Software von *life technologies* die Amplifikations-Plots, die während des Laufes entstanden, ausgewertet. Dabei wurde

für eine Vergleichbarkeit der untersuchten Gene der Threshold manuell auf einen Wert von 0,2 festgelegt. In Abhängigkeit vom Threshold berechnete das Programm daraufhin die C_t -Werte der jeweiligen Proben. Anschließend erfolgte die Auswertung mit Hilfe der Berechnung des $2^{-\Delta C_t}$ -Wertes (Reimann et al., 2008).

Dazu wurden zunächst die Proben-Werte auf die interne Kontrolle normalisiert. Der C_t -Wert des Referenzgens (β -Aktin) wurde vom C_t -Wert des Zielgens abgezogen

$$[\Delta C_t = C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen} (\beta\text{-Aktin})].$$

Anschließend wurde der $2^{-\Delta C_t}$ -Wert für jedes Gen bestimmt und untereinander verglichen. Dafür war im Vorfeld wichtig die Effizienz der PCR für jedes zu untersuchende Gen zu bestimmen. Dabei sollten die Effizienzen im Bereich 93-100 % liegen, um die verschiedenen Gene untereinander zu vergleichen.

2.2.1.11 *In-vitro* Transkription zur Herstellung von RNA-Sonden

Aus den isolierten Gel-PCR-Fragmenten wurden mittels DNA-abhängiger RNA-Polymerasen per *in-vitro* Transkription Digoxigenin (DIG)-markierte Sense- und Antisense-RNA-Sonden generiert. Dazu wurden neben der RNA-Polymerase und der cDNA ebenso Transkriptionspuffer (1/10), DIG-RNA labeling mix (1/10 VE) und RNase-Inhibitor (50 UE) in den Reaktionsansatz hinzugefügt, der anschließend bei 37 °C für 3 h inkubiert wurde (siehe Tab. 2.17).

Tabelle 2.17 Reaktionsansatz einer *in-vitro* Transkription

Reagenzien	Volumen	End-Konzentration
10 x Transkriptionspuffer	5 μ l	1 x
10 x DIG-RNA labeling mix	5 μ l	1 x
RNase Inhibitor (~ 40 U/ μ l)	1,25 μ l	1 U
T-RNA-Polymerase (T7/T3)	3 μ l	1,2 U
PCR-Produkt	250 ng	250 ng
DEPC-Wasser	Ad. 50 μ l	Ad. 50 μ l

Danach erfolgte die Fällung der kodierenden RNA (cRNA) mit Ammoniumacetat (1/5 VE) und Ethanol (100 %, 2 VE) bei -80 °C für 30 min. Nach der Zentrifugation (20 min, 4 °C, 16.000 g) lag die cRNA im Pellet vor. Es folgten das Waschen mit Ethanol (75 %) sowie die Trocknung der cRNA-Pellets in der Vakuumzentrifuge für 3 min. Der anschließende DNase-Verdau (5 U DNase I; 40 min, RT) diente der Spaltung des Ausgangsvektors in Oligonukletotide, um mögliche Interaktionen in nachfolgenden Hybridisierungsprozessen zu vermeiden.

Nach der erneuten Fällung und Trocknung wurde das cRNA-Pellet in 25 μ l DEPC-Wasser aufgenommen, per Spektrometer die RNA-Konzentration gemessen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur Überprüfung der *in-vitro* Transkription wurden vor und nach der ersten Fällung 1 μ l, sowie nach der zweiten Fällung 0,5 μ l des Reaktionsansatzes entnommen und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Die während der *in-vitro* Transkription hergestellten Sonden wurden anschließend mittels *in-situ*-Hybridisierung getestet.

2.2.1.12 Dot Blot-Hybridisierung

Zur Validierung der Qualität der generierten RNA-Sonde wurde eine Dot-Blot-Hybridisierung mittels Nylon-Hybond-*N+*-Membran durchgeführt. Dafür wurden je 1 µl der Verdünnungen des Ausgangsvektors (1 ng/µl, 100 pg/µl, 10 pg/µl) auf die Membran aufgetragen. Anschließend wurde die Membran denaturiert, neutralisiert sowie gewaschen. Nach Prä- und Hybridisierung mittels generierter RNA-Sonde erfolgen mehrere Waschritte, sowie die Detektion über eine Anti-Digoxigenin gekoppelte Alkalische Phosphatase, die unter Zugabe von NBT/BCIP dieses zu einem Farbstoff oxidiert. Nach der Trocknung wurde die Nylon-Hybond-*N+*-Membran mittels Scanner eingescannt und das Ergebnis dokumentiert.

Tabelle 2.18 Dot Blot-Hybridisierungsschritte

Schritt	Substanz	Zeit
Tag 1		
Denaturierung	Denaturierungspuffer	1 x 5 min
Neutralisierung	Neutralisierungspuffer	1 x 5 min
Waschen	1 x PBS	1 x 5 min
Prähybridisierung	Prähybridisierungspuffer	3 h; 56 °C
Hybridisierung mit RNA-Sonde	Hybridisierungspuffer + RNA-Sonde	56 °C, ü.N.
Tag 2		
Waschen	2 x SSC	3 x 5 min
Waschen	0,4 x SSC	1 x 15 min
Waschen	0,1 x SSC	3 x 5 min
Äquilibrieren	Puffer 1	1 x 5 min
Blockieren	Puffer 2	1 h
Inkubation	Puffer 2 + Anti-Digoxigenin gekoppelte Alkalische Phosphatase (1:750)	1 h
Waschen	Puffer 1	2 x 30 min
Äquilibrieren	Puffer 3	
Farbreaktion	Puffer 3 + Farbsubstrat (NBT/BCIP)	90 min
Abstoppen der Farbreaktion	TE-Puffer	1 x 5 min

Denaturierungspuffer

0,6 M NaCl

0,4 M NaOH

Neutralisierungspuffer

1,5 M NaCl

0,5 M Tris-HCl (pH 7,5)

20 x SSC

3 M NaCl

0,3 M Natriumcitrat*2H₂O
pH 7,0 einstellen

Prähybridisierungslösung

50 % (v/v) Formamid

25 % (v/v) Hybridisierungssalze

5 % (v/v) 100 x Denhardt Reagenz

2 % (v/v) SDS (10 %)

2,5 % (v/v) ytRNA (10,03 ng/ml)

2,4 % (v/v) Heringssperma DNA (11 g/l)

100 x Denhardt Reagenz

2 % (w/v) Ficoll 400

2 % (w/v) Polyvinylpyrrolidone (PVP)

2 % (w/v) Bovine serum albumin (Fraction V)

steril filtriert, Lagerung bei -20 °C

20 x Hybridisierungssalze (pH 6,8)

3 M NaCl

0,1 M PIPES

0,1 M EDTA

Hybridisierungslösung

Prähybridisierungslösung

10 % (w/v) Dextransulfat

+ RNA-Sonde

10 x PBS (für ISH)

0,2 M NaH₂PO₄ * H₂O

0,8 M Na₂HPO₄

0,65 M NaCl

pH 7,4 einstellen

2 x Puffer 1

0,3 M NaCl

200 mM Maleinsäure

pH 7,5 einstellen

Puffer 2

Puffer 1

1 % Blocking Reagent

Lagerung bei -20 °C

Puffer 3

0,1 M NaCl

0,1 M Tris-HCl (pH 9,5)

0,05 M MgCl₂

Färbelösung

Puffer 3

175 µg/ml BCIP

250 µg/ml NBT

2.2.1.13 In-situ-Hybridisierung (ISH)**2.2.1.13.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) - manuell****2.2.1.13.1.1 FISH - Vorbehandlung der Schnitte - Prähybridisierung**

Die Gewebeschnitte wurden zunächst vorbehandelt, um mittels 4 %-iger PFA-Lösung (in 1 x PBS) das Gewebe zu fixieren und in anschließenden Schritten, das Gewebe auf die Hybridisierung vorzubereiten. Nach der Fixierung in 4 % PFA wurden die Schnitte in 1 x PBS gespült (1 min) und anschließend in 0,2 M HCl-Lösung inkubiert, um die Zellen zu permeabilisieren. Die anschließende Inkubation der Schnitte in 1 %-iger Triton-Lösung für 2 min und nachfolgend in 1 x PBS mit Proteinase K für 5 min führte zu einer besseren Zugänglichkeit der Sonden in das Gewebe. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden die Schnitte anschließend für 5 min in 0,2 %-ige Glycin-Lösung gegeben. Nach einer Nachfixierung des Gewebes und kurzem Waschen in 1 x PBS wurden die Gewebeschnitte mit 0,25 % Essigsäureanhydrid in Triethanolamin (0,1 M) behandelt, um unspezifische Bindung bei der sich anschließenden Zugabe der RNA-Sonden an basische Gruppen der Proteine zu vermeiden. Die Schnitte wurden anschließend kurz in 1 x PBS gewaschen und anschließend mit Prähybridisierungspuffer in einer formamid-haltigen Metallkammer (50 %) für ca. 5 h bei 50 °C äquilibriert. Die Hybridisierungslösung bestehend aus Prähybridisierungslösung und Dextransulfat (10 %) sowie der RNA-Sonde, wurden für 10 min auf 85 °C erhitzt, danach auf Eis gestellt und anschließend wurden je 100 µl auf die äquilibrierten Objektträger gegeben. In Abhängigkeit der verwendeten Sonde wurden zw. 60 und 120 ng RNA Sonde auf jeden Objektträger gegeben. Die Schnitte wurden mit einem Deckgläschen bedeckt und über Nacht erneut in der Formamid-Kammer bei 50 °C inkubiert.

Die Vorbehandlung der Objektträger mit Gehirnschnitte fand nach einem ähnlichen Verfahren statt (siehe Tab. 2.19).

Tabelle 2.19 Schritte zur Vorbehandlung der Gefrierschnitte für die *in-situ*-Hybridisierung für Zungen- und Gehirngewebe

Zunge		Gehirn	
Substanz	Zeit	Substanz	Zeit
PFA (4 %) in 1 x PBS	5 min	PFA (4 %) in 1 x PBS	10 min
1 x PBS	1 min	1 x PBS	3 x 5 min
HCl (0,2 M)	10 min	3 % H ₂ O ₂ in 1 x PBS	10 min
Triton X-100 (1 %)	2 min	1 x PBS	2 x 5 min
Proteinase K in 1 x PBS (0,597 U/ml)	5 min	HCl (0,2 M)	10 min
Glycin (0,2 %) in 1 x PBS	5 min	Proteinase K in 1 x PBS (0,0159 U/ml)	5 min
1 x PBS	2 x 5 min	Glycin (0,2 %) in 1 x PBS	5 min
PFA (4 %)	5 min	1 x PBS	2 x 5 min
1 x PBS	1 min	Triethanolamin (0,1 M)+ ESA (0,25 %)	10 min
Triethanolamin (0,1 M) + ESA (0,25 %)	10 min	1 x PBS	1 min

1 x PBS

1 min

2.2.1.13.1.2 FISH-Waschschritte nach der Hybridisierung und Detektion

Die Deckgläschen auf den Schnitten wurden mit 2 x SSC-Puffer entfernt. Auf das Waschen mit 2 x SSC folgte die Inkubation in RNase-Puffer (Zunge: 0,8 µg/50 ml; Gehirn 1 µg/50 ml) bei 37 °C für 15 min sowie eine Reihe von Waschschritten mit SSC, um überschüssige Reste oder unspezifische Bindungen der RNA-Sonde am Gewebe zu entfernen.

Tabelle 2.20 Waschschritte nach der Hybridisierung für Zungen- und Gehirnschnitte

Zunge		Gehirn	
Substanz	Zeit	Substanz	Zeit
2 x SSC	2 x 5 min	2 x SSC	2 x 5 min
RNase Puffer	30 min, 37 °C	RNase Puffer	30 min, 37 °C
0,4 x SSC	15 min	0,4 x SSC	15 min
0,4 x SSC	2 x 30 min 40 °C	0,4 x SSC	2 x 30 min 45 °C
TNT	5 min	TNT	5 min
TNB	60 min	TNB	60 min
Anti-DIG-POD in TNB	60 min	Anti-DIG-POD in TNB	60 min
TNT	3 x 5 min	TNT	3 x 5 min
Fluorescein-Tyramide in 1 x Diluent (1:50)	20 min	Fluorescein-Tyramide in 1 x Diluent (1:50)	20 min
TNT	3 x 5 min	TNT	3 x 5 min
Kernfärbung DAPI/TOPRO	10 min	Kernfärbung DAPI/TOPRO	10 min
TNT	5 min	TNT	5 min

Es folgte die Detektion der DIG-gelabelten RNA-Sonde mittels anti-DIG gekoppelter Meerrettich Peroxidase, sowie einer Signalamplifikation mittels Fluorescein-Tyramide. Nach erneutem Waschen sowie der Kernfärbung mittels DAPI (1:1000) und TOPRO®-3-Iodid (1:1000) wurden die Schnitte in Eindeckmedium eingedeckt.

Die Auswertung erfolgte am Mikroskop (Axio Zeiss Vision) unter Zuhilfenahme des MIRAX-Viewers bzw. am konfokalen Mikroskop unter Nutzung der Leica Software *LCS-Lite*.

RNase-Puffer

0,5 M NaCl
10 mM Tris-HCl (pH 9,5)
1 mM EDTA (pH 7,5)

TNT

0,1 M Tris-HCl pH 7,5
0,15 M NaCl
0,05 % Tween 20

TNB

0,1 M Tris-HCl pH 7,5
0,15 M NaCl
0,5 % Blocking Reagenz

2.2.1.13.2 In-situ-Hybridisierung mittels Pipettierroboter2.2.1.13.2.1 Vorbehandlung der Gewebeschnitte

Die Vorbehandlung der Gehirnschnitte bzw. Ganglienschnitte (Fixierung und Acetylierung) erfolgte in einem Färbeautomaten mit 13 Behältern. Dazu wurden die getrockneten Schnitte zunächst ca. 30-60 min bei 37 °C erwärmt, dann wurden die Objektträger in ein Metallgestell einsortiert und in den Färbeautomaten gehängt. Zunächst erfolgte eine zehnmündige Fixierung der Gewebeschnitte in 4 % PFA in 1 x PBS, anschließend wurden die Objektträger zweimal in 0,9 % NaCl-Lösung für je 2 min gewaschen. Danach wurde das Färbeprogramm pausiert und der Acetylierungsschritt manuell in einem Färbebehälter durchgeführt. Dabei wurden die Objektträger samt Metallgestell unter Rühren

des Magnetrührers in 750 ml Triethanolaminpuffer mit 1,875 ml Essigsäureanhydrid getaucht und zehnmal auf und ab bewegt und dann im Behälter belassen. Nach fünfminütiger Inkubation wurden erneut 1,875 ml Essigsäureanhydrid zum Puffer gegeben und die Objektträger erneut getaucht. Nach erneuter fünfminütiger Inkubation wurde das Metallgestell mit den Objektträgern zurück in den Färbeautomaten gehängt und das Programm fortgesetzt. Es folgten zweiminütige Waschschriffe in 1 x PBS und 0,9 %-iger NaCl-Lösung sowie die Entwässerung der Gewebeschnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 95 %, 100 % oder 100 % für je 2 min). Nach dem Trocknen der Schnitte wurden sie erneut luftdicht verschlossen und bis auf weiteres bei -80 °C gelagert.

2.2.1.13.2.2 In-situ-Hybridisierung nach Arc mittels Pipettierautomat (Tecan)

Die *In-situ*-Hybridisierung für den Nachweis von *Arc*-RNA erfolgte mit Hilfe eines Pipettierautomaten. Die Tecan-Freedom-EVO-Plattform beruht auf einem flüssigkeitsgefüllten Pipettiersystem, das exaktes Pipettieren ermöglicht.

Im ersten Schritt erfolgte die Inhibierung endogener Peroxidaseaktivität durch 3 % Wasserstoffperoxid in Methanol. Das Methanol erleichterte zudem die erste Benetzung der Gewebeschnitte, da es eine deutlich geringere Oberflächenspannung aufweist als Wasser. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung der Zellen durch die Inkubation mit Salzsäure (0,2 M) sowie der proteolytische Aufschluss des Gewebes mit 0,0159 U/ml Proteinase K in Proteinase-K Puffer. Es schloss sich eine Inkubation in 4 % PFA in 1 x PBST an, was den Proteinase K-Verdau unterbindet und das Gewebe erneut fixiert. In dieser Prähybridisierungsphase wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten zwischen den einzelnen Schritten mehrmals mit 1 x PBST gespült. Danach erfolgte die Äquilibration der Gewebeschnitte mit Hybridisierungspuffer für 30 min und die Temperatur wurde von 24 °C auf 64 °C erhöht. Danach wurde die RNA Sonde (600 ng/ml) auf die erwärmten Schnitte für 6 h gegeben. Dabei wurde zur Halbzeit nach 3 h die RNA-Sonde in Hybridisierungspuffer neu auf die Schnitte gegeben. Die RNA-Sonde mit dem Hybridisierungspuffer sowie der Hybridisierungspuffer allein wurden zuvor für 10 min bei 65 °C erhitzt und danach bis zur Verwendung im Automaten auf Eis gelagert.

Tabelle 2.21 Prähybridisierungsschritte für Gehirn- und Gangliengewebe mittels Pipettierautomat

Schritt	Substanz	Zeit (à ..min)
1	H ₂ O ₂ in MeOH	5 x 5 min
2	1 x PBS	7 x 5 min
3	HCl (0,2 M)	2 x 5min
4	1 x PBS	4 x 5 min
5	Proteinase K-Puffer (PK)	1 x 5 min
6	Protinase K in PK	2 x 10 min
7	1 x PBS	7 x 5 min
8	PFA (4 %)	2 x 5 min
9	1 x PBS	7 x 5 min
10	Hybridisierungspuffer	2 x 15 min
11	RNA-Sonde	2 x 180 min

2.2.1.13.2.3 ISH-Waschschriffe nach der Hybridisierung und Detektion

Nach der Hybridisierung erfolgte eine Reihe von Waschschriffen mit SSC-Puffer, Formamid sowie unterschiedlichen Waschttemperaturen, um überschüssige oder unspezifisch gebundene RNA-Sonde zu entfernen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 20 mM Iodacetamid in NTE-Tween zur

Alkylierung von Cysteinresten, zur Inhibierung möglicher Ribonukleasen. Die Inkubation mit 4 % Lammserum in TNT, TNB sowie Blockierlösung in MWB ermöglichte die Maskierung von Epitopen im Gewebe. Danach wurden die Schnitte mit einem gegen DIG gerichteten mit Peroxidase gekoppeltem Antikörper versetzt. Die Phosphatase bewirkte im nun folgenden Amplifikationsschritt das Umsetzen sowie die Bindung des Tyramin-Biotins (in Amplification Diluent) an das Gewebe. Danach wurden mittels Fluoreszenzfarbstoffen Avidin-Cy3 mit Bindung des Biotins indirekt die RNA-Sonde und mittels DAPI die Zellkerne angefärbt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Objektträger mittels Einbettmedium (fluorescent mounting medium) eingedeckt und bei 4 °C bis zur Analyse mittels Mikroskop (Axio Vision Zeiss) dunkel gelagert.

Während dieser *In-situ*-Hybridisierung enthielten alle wässrigen Lösungen 0,05 % Tween, um die Oberflächenspannung möglichst gering zu halten. Zwischen den einzelnen Schritten der Blockierung wurden die Objektträger mit dem jeweiligen Puffer (TNT, NTE, MWB) vorher äquilibriert und nach dem Blockieren gewaschen.

Tabelle 2.22 Waschschriffe nach der Hybridisierung für Gehirn- und Ganglienschnitte mittel Pipettierautomat

Schritt	Substanz	Zeit à ..min	Schritt	Substanz	Zeit à ..min
12	5 x SSC	5 x 5 min, 62 °C	26	Blockierreagenz (0,5 %)	2 x 10 min
13	Formamid in 2 x SSC	5 x 10 min, 62 °C	27	MWB	2 x 5 min
14	Formamid in 1 x SSC	5 x 12 min, 62 °C	28	TNT	4 x 5 min
15	0,1 x SSC	3 x 8 min, 62 °C	29	TNB	4 x 10 min
16	0,1 x SSC	1 x 8 min, 24 °C	30	Anti-DIG-POD	2 x 30 min
17	NTE	4 x 5 min	31	TNT	6 x 5 min
18	Iodacetamid	6 x 5 min	32	TSA-Amplificant kit (1:50)	1 x 30 min
19	NTE	4 x 5 min	33	TNT	4 x 5 min
20	TNT	2 x 5 min	34	Fluorescein Cy3	2 x 30 min
21	Lammserum	6 x 5 min	35	TNT	4 x 5 min
22	TNT	4 x 5 min	36	DAPI	2 x 5 min
23	TNB	2 x 10 min	37	TNT	4 x 5 min
24	TNT	2 x 5 min			
25	MWB	2 x 5 min			

NTE (5 x NaCl-Tris-EDTA-Puffer)

2,5 M NaCl
50 mM Tris-Base
25 mM Na₂H₂EDTA*2H₂O
pH 8,0

MWB (Maleinsäure Waschpuffer)

0,15 M NaCl
0,1 M Maleinsäure
0,2 M NaOH
pH 7,4, Lagerung 4 °C

2.2.1.13.2.4 Auswertung der Daten

2.2.1.13.2.4.1 Auszählung der Arc-exprimierenden Zellen im NTS

Die Auszählung der Arc-exprimierenden Neurone im *Nucleus tractus solitarii* wurde durch Dr. Jonas Töle durchgeführt (Töle, 2013). Dabei wurden die Arc-Signale innerhalb der Nuclei mittels Photoshop ausgezählt und anschließend mittels Microsoft Excel 2010 sowie SigmaPlot statistisch ausgewertet. Dabei wurde ein *t*-Test und eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) genutzt, um statistisch signifikante Unterschiede herauszustellen. Das Signifikanzniveau (α) wurde dabei auf 0,05 festgesetzt.

2.2.1.13.2.4.2 Auszählung der Arc-exprimierenden Zellen im NPG

Die Auszählung der Arc-exprimierenden Zellen in den *Ganglien nodosum/petrosum* (NPG) sowie im *Ganglion geniculatum* (GG) fand unter Zuhilfenahme der MIRAX-Viewer Software statt. Dabei wurden jeweils alle nukleären Arc-Signale im NPGs ausgezählt. Anschließend wurden die Daten mittels Microsoft Excel 2010 unter Nutzung des *t*-Tests auf statistisch signifikante Unterschiede geprüft. Das Signifikanzniveau (α) wurde dabei auf 0,05 festgesetzt.

2.2.1.13.3 *In-situ*-Hybridisierung mit anschließender Immunhistochemie (manuell)

Zur Analyse einer Koexpression von Tas2r131/tauGFP-exprimierenden Neuronen (Tas2r131/tauGFP-Zellen) und Neuronen im zentralen Nervensystem, die ebenfalls Gustducin exprimieren, war es notwendig nach der *In-situ*-Hybridisierung für Gustducin die Tas2r131-Zellen sichtbar zu machen. Dafür schloss sich an die eigentliche Hybridisierung eine Antikörperfärbung gegen tauGFP an. Ziel war es, Gustducin-exprimierende sowie die Tas2r131/tauGFP-Neurone sichtbar zu machen (siehe Tab. 2.23).

Tabelle 2.23 Inkubations- und Waschschrte für eine Kombination von *in-situ*-Hybridisierung und immunhistochemischer Färbung bei Gehirnschnitten

Schritt	Substanz	Zeit	Schritt	Substanz	Zeit
1	4 % PFA	10 min	13	5 x SSC	3 x 5 min, 62 °C
2	0,9 % NaCl	2 x 2 min	14	2 x SSC, 50 % Formamid	3 x 5 min, 62 °C
3	Triethanolamin (0,1 M) + ESA (0,25 %)	10 min	15	1 x SSC, 50 % Formamid	3 x 5min, 62 °C
4	1 x PBS	2 min	16	0,1 x SSC	2 x 15 min, 62 °C
5	3 % H ₂ O ₂ in 1 x PBS	25 min	17	TNB	60 min
6	1 x PBS	3 x 5 min	18	GFP (1:500 in TNB)	Über Nacht, 4 °C
7	0,2 M HCl	2 x 5 min	19	TNT	3 x 5 min
8	1 x PBS	2 x 5 min	20	Sek. AK + Anti Dig-POD in TNT	120 min
9	2 x SSC-Tween	25 min	21	TNT	3 x 5 min
10	1 x PBS	3 x 5 min	22	TSA-Amplifikant kit (1:50)	30 min
11	Prähybridisierungspuffer	2 h 64 °C	23	TNT	3 x 5 min
12	Hybridisierungspuffer mit RNA-Sonde	ü.N. 64 °C	24	Fluorescein - Cy3	30 min
			25	TNT	3 x 5 min
			26	DAPI 1:1000 in TNT	10 min
			27	TNT	2 x 3 min

Im Anschluss an die *In-situ*-Hybridisierung und die Antikörperfärbung wurden die Objektträger mittels Einbettmedium eingedeckt und bei 4 °C bis zur Analyse am Mikroskop (AxioPlan, Carl Zeiss) dunkel gelagert.

2.2.2 Tierexperimentelle Untersuchungen

2.2.2.1 *Haltungs- und Zuchtbedingungen*

Die Versuchstiere wurden gemäß der Richtlinien zur Tierhaltung und des Tierschutzes gehalten. Dabei stand den Tieren ein Standardfutter zur Haltung von Nagern (ssniff-R/M-H, Soest, D) sowie keimfreies und entkalktes Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Die Versuchstiere wurden auf entstaubter Weichholzfaser (Rettenmaier & Söhne; Ellwangen, D) in Makrolonkäfigen (Typ III, EBECO, Castrop-Rauxel, D) bei einer konstanten Temperatur von 22 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 45±5 % gehalten. Ab morgens 6 Uhr begann der 12-stündige Hell-Dunkelzyklus. In der Kernruhephase der

Mäuse wurden keine Experimente durchgeführt. Ausgenommen waren hierbei Langzeitversuche über 24 h.

2.2.2.2 Gewebeentnahme

Für Expressionsanalysen der Bitterrezeptoren im peripheren Nervensystem wurden die Tiere mit einer Überdosis des Inhalationsanästhetikums Isofluran sowie sich anschließender zervikaler Dislokation getötet. Nachfolgend wurden die Organe wie Ganglien und Rückenmark freipräpariert und in ein spezielles Reaktionsgefäß (2 ml Safe-Lock Tube) überführt. Dann wurde das Reaktionsgefäß kurz in flüssigem Stickstoff schockgefroren und nachfolgend bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.2.3 Perfusion mit Paraformaldehyd

Für eine optimale Fixierung des zu untersuchenden Gewebes mittels immunhistochemischer Methoden war es notwendig die Mäuse mit 4 %-iger Paraformaldehydlösung zu perfundieren. Dazu wurde dem Versuchstier in Abhängigkeit vom Körpergewicht eine Überdosis an Pentobarbital (1:10 in NaCl) intraperitoneal appliziert. Dies bewirkt eine tiefe und letztlich letale Narkose. Sobald bei der Maus die Schnappatmung einsetzte, erfolgte der Eingriff. Dazu wurde die Maus mit dem Rücken auf eine stabile Unterlage fixiert und das Abdomen mittels einer kleinen spitzen chirurgischen Schere geöffnet. Mit weiteren seitlichen Schnitten entlang des Thorax, der Punktion des Diaphragmas sowie der darauf kollabierenden Lungen wurde der Brustraum freigelegt. Danach wurde das das Herz umgebende Perikard vorsichtig abgezogen. Anschließend wurde mit einer stumpfen Pinzette das Herz festgehalten, während in die linke Herzkammer mit leichtem Druck die Kanüle geschoben wurde. Nach dem Anschneiden der oberen Hohlvene nah am rechten Atrium, wurde die Maus zunächst mit 20 ml 1 x PBS und anschließend mit ca. 20 ml PFA-Lösung (4 % in 1 x PBS) perfundiert. Nach Abschluss der Perfusion wurden die benötigten Organe präpariert und zur Nachfixierung in 4 %-ige PFA-Lösung für 2 h inkubiert. Danach wurden die Organe mit 1 x PBS gespült und anschließend über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken in Saccharose-Lösung (30 % in 1 x PBS) gegeben. Abschließend wurden die Organe auf Trockeneis eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Für die sich anschließenden immunhistologischen Untersuchungen wurden am Mikrotom von den Geweben Kryoschnitte zwischen 10 und 14 µm angefertigt und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

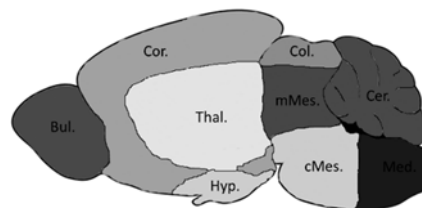
2.2.2.4 Perfusion mit RNAlater

Für die Gehirnentnahme sowie die Präparation der verschiedenen Hirnregionen wurden die Mäuse mit *RNAlater* perfundiert. Dabei erfolgte die Perfusion wie bereits beschrieben (siehe 2.2.2.3). Anstelle von Paraformaldehyd wurde während dieser Perfusion *RNAlater* genutzt, um die RNA vor Degradation durch RNase zu schützen. Im Anschluss an die Perfusion erfolgte die Präparation der neun Hirnregionen: *Bulbi olfactorii*, *Cortex cerebri* (inklusive Hippocampus, Amygdala), thalamische Region (beinhaltet Thalamus, Basalganglien und Striatum), Hypothalamus, *Lamina quadrigemina*, mediales sowie caudales Mesencephalon, Cerebellum und Medulla oblongata. In Tab. 2.25 und Abb. 2.2 wird die jeweilige Region benannt und lokalisiert.

Tabelle 2.24 Liste der präparierten Hirnregionen

Hirnregion (angereichert)	Abkürzung
<i>Bulbi olfactorii</i>	Bul.
<i>Cortex cerebri</i> inklusive Hippocampus und Amygdala	Cor.
Thalamische Region (Thalamus, Basalganglien, Striatum)	Thal.
Hypothalamus	Hyp.
<i>Lamina quadrigemina</i> (Vierhügelplatte)	Col.
Mediales Mesencephalon (inklusive PAG)	mMes.
caudales Mesencephalon (inklusive Pons)	cMes.
Cerebellum	Cer.
Medulla oblongata	Med.

Abbildung 2.2 Lokalisation der neun Hirnregionen



Im Anschluss an die Präparation erfolgten RNA-Isolation, cDNA-Synthese sowie RT-PCR und qRT-PCR-Analysen der präparierten Hirnregionen.

2.2.2.5 Stimulationsexperimente

Die Stimulationsexperimente wurden im Rahmen des genehmigten Versuchstiorvorhabens (Antragsnummern 23-2347-8-10-2008 + 2347-21-2014) im Operationsraum des Max Rubner Laboratorium von ca. 9-13 Uhr durchgeführt.

Um mögliche Interaktion mit zuvor zu sich genommener Nahrung zu vermeiden, wurde ca. eine Stunde vor dem Experiment den Tieren die Nahrungsaufnahme verwehrt.

Anschließend wurde jede Maus mittels Nackengriff fixiert und dann mittels Schlundsonde für 2 min stimuliert. Dabei wurden ca. 1-2 ml Stimuli in die Mundhöhle appliziert, welche durch die Kau- bzw. Kieferbewegung des Tieres von der Zungenspitze bis zum Zungengrund transportiert wurden. Dabei gelangten geringe Mengen der applizierten Stimulus-Lösung in den Gastrointestinal-Trakt der Maus, der Großteil der applizierten Flüssigkeit floss aus der Mundhöhle wieder heraus. Nach der Stimulation wurde das Tier für 3 min in einen separaten Käfig gesetzt, um andere Tiere nicht mit Resten des Stimulus, die am Fell oder an der Schnauze hefteten, in Kontakt zu bringen. Danach erfolgte die Dekapitation des Tieres. Es schloss sich eine zügige Entnahme des Gehirns an, welches umgehend in einem Kunststoffgefäß mit Einbettmedium, in einer Wanne mit 2-Methylbutan auf Trockeneis eingefroren wurde. Parallel wurden die Schädelreste in 4 %-iger PFA-Lösung (in 1 x PBS) für 2 h fixiert. Nach der Fixierung erfolgte die Präparation der NPGs (im Schädelknochen liegend). Diese wurden nach der Entnahme kurz in 1 x PBS gespült und dann über Nacht bei 4 °C in Saccharose-Lösung auf einem Schwenker inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Ganglien in Einbettmedium eingefroren und bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert.

2.2.2.6 Anfertigung von Gewebeschnitten

Für anschließende Analysen wurden mittels Kryomikrotom 14 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Das Gehirn wurde dabei horizontal, von dorsal nach ventral, geschnitten. Die Gewebetemperatur lag bei ca. -11 °C, die Messertemperatur bei ca. -13 °C. Pro Objektträger wurden vier Gefrierschnitte des Mausgehirns aufgezogen. Dabei wurden die Gewebeschnitte in Serien zu je sechs Objektträgern aufgenommen. (Bsp. Objektträger 1 enthält 4 Schnitte, den 1., 7., 13., und 20. Schnitt, Objektträger 2 enthält die Schnitte 2, 8, 14, ... usw.)

Zu Beginn des Schneidens wurde das Mausgehirn im Einbettmedium möglichst horizontal ausgerichtet. Dies geschah unter Zuhilfenahme eines Mausgehirnatlasses. Kurz vor dem Nucleus parabrachialis, sobald ein Durchbruch vom Kleinhirnmark zum Pons erkennbar war, wurden die Schnitte auf die Objektträger aufgenommen (Franklin und Paxinos, 2007) und weiter bis zum ventralen Ende des Hypothalamus seriell gesammelt. Nach dieser Methode ergaben sich pro Mausgehirn ca. zwölf Serien mit entsprechend 72 Objektträgern.

Gefrierschnitte von Mausgehirnen, die für immunhistochemische Untersuchungen genutzt wurden (siehe 2.2.3), wurden dagegen coronal geschnitten und ebenfalls seriell aufgenommen. Gewebe- sowie Messertemperatur betragen hierbei ca. $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nach dem Aufnehmen der Schnitte auf die Objektträger wurden sie an der Luft getrocknet und anschließend im Objektträgerkasten im Mikrotom tiefgefroren und bis auf weiteres bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Das Einlegen eines Silika-Gel-Trockenpäckchens sowie das Verschließen der Kästen mit Elektroisolierband dienen dem Schutz gegen die Luftfeuchtigkeit.

Die $14\text{ }\mu\text{m}$ Gefrierschnitte der entnommenen Ganglien wurden nicht seriell, sondern nacheinander auf die Objektträger aufgenommen, luftgetrocknet, mit dem Luftfeuchtigkeitsschutz versehen, eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.2.7 Kurzzeitpräferenztest mit Mäusen

Um zu testen, ob die Mäuse mit eingeschränkter synaptischer Weiterleitung in Neuronen, die den Bitterrezeptor Tas2r131 exprimieren, ein beeinträchtigtes Geschmacksempfinden aufzeigen, wurden Kurzzeitpräferenztests mittels eines optischen Lickometersystems durchgeführt. Diese Messungen wurden im Rahmen der genehmigten Versuchstiervorhaben Antragsnummern 23-2347-22-2010, 23-2347-22-2010Ä3 sowie V3-2347-35-2012 durchgeführt.

Das Lickometersystem der Firma Coulbourn Instruments besteht aus einem Testkäfig der Maße 7" Breite x 7" Tiefe x 12" Höhe mit einem Gitterboden. Über einer in einer der Seitenwände befindlichen Aussparung erhält die Maus dabei Zugang zu einer speziellen Trinkflasche. Innerhalb des Systems verläuft ein Infrarot-Lichtstrahl waagrecht zur Flaschenöffnung. Leckt die Maus an der Öffnung, wird der Strahl unterbrochen, die Leckantwort vom Detektor aufgezeichnet und an ein Computersystem weitergegeben (siehe Abb. 2.3). Für eine höhere Motivation der Mäuse erfolgte in Abhängigkeit zum präsentierten aversiven Stimulus eine Wasserdeprivation von 18 h. Der Zugang zum Futter wurde nicht reglementiert. Nach der Deprivation wurde das Gewicht der Maus dokumentiert und sie wurde anschließend in den Lickometerkäfig gesetzt. Dort hatte die Maus Zeit, die in der Trinkflasche präsentierte Geschmackslösung bzw. Wasser zu trinken. Nachdem die Maus das erste Mal von der Flasche geleckt hat, konnte sie innerhalb eines Zeitintervall von 30 s so oft an der Flasche lecken, wie sie wollte. Wie viele Male die Maus letztlich von der Flasche geleckt hat, wurde durch das Lickometersystem aufgezeichnet. Anschließend wurde die Maus zurück in den Heimatkäfig gesetzt. Nach einer Pause von 20-30 min wurde die Maus erneut in den Messkäfig gesetzt und einer 30-s-Messung unterzogen. Danach erhielten die Mäuse nach einer Wartezeit von ca. 20 min freien Zugang zu einer Wasserflasche im Heimatkäfig bis sich die nächste Deprivation anschloss. Im Anschluss an eine fünftägige Deprivationsphase fand eine mindestens zweitägige Erholungsphase ohne Wasserentzug statt.

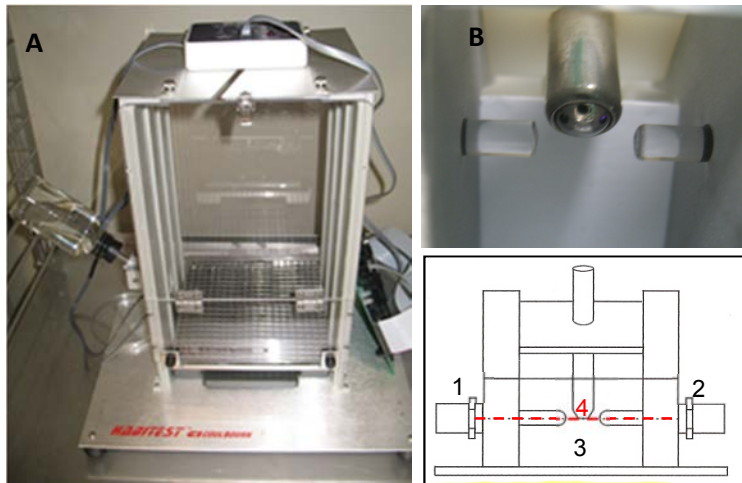


Abbildung 2.3 Das Lickometersystem zur Detektion von Geschmackspräferenzen.

Der Testkäfig (A) mit einer Aussparung an der linken Seitenwand, durch die die Maus Zugang zur Trinkflasche erhält. (B) Ansicht vom Käfiginnenraum in die Aussparung, wo sich die Spitze der Trinkflasche befindet. (C) Schema zur Funktionsweise des optischen Lickometers. Leckt die Maus an der Spitze der Trinkflasche (1), so durchbricht sie mit der Zunge einen Infrarot-Lichtstrahl (4), der waagrecht von einer Lichtquelle (2) zum Detektor (3) verläuft. Die Unterbrechung wird vom Detektor als Leckantwort registriert und an das Computersystem weitergegeben.

Für diese Kurzzeitpräferenztests wurden heterozygote/heterozygote Tiere der Mauslinie *Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}* sowie dazu entsprechende Kontrollgruppen (heterozygot/wildtyp; wildtyp/heterozygot) im Alter von ca. 11 Wochen untersucht. Zunächst fand eine einwöchige Gewöhnungsphase statt. Dazu wurde wie oben beschrieben die Maus in das Lickometersystem gesetzt, wobei für beide 30-s-Messungen Wasser als Stimulus präsentiert wurde. Danach schloss sich die ca. fünfwöchige Messphase an, die stets am ersten Tag mit der Präsentation von Wasser begann. Je nach Protokoll wurden an den vier darauffolgenden Tagen unterschiedliche Geschmacksstimuli getestet wurden (siehe Abb. 2.3 Protokolle der Kurzzeitpräferenztests).

Die tägliche Gewichtskontrolle diente der Beobachtung des Gesundheitsstatus der jeweiligen Maus. Wäre das Gewicht zwei Tage in Folge unter 80 % des vor jeder Testphase gemessenen Ausgangswertes gesunken, dann wäre das entsprechende Tier aus dem Versuch genommen worden. Zudem wurde das Verhalten der Mäuse während der Deprivationsphase sowie während der Detektion beobachtet und dokumentiert. Wären Symptome wie aggressives Verhalten, Teilnahmslosigkeit, Lethargie, Koordinationsstörungen oder sonstiges anormales Verhalten aufgetreten oder erkennbar gewesen, wäre die betreffende Maus aus dem Versuch herausgenommen worden.

	Geschmacksqualität	Substanzen	Konzentration
Protokoll 1	Bitter	Chininhydrochlorid	0,1-10 mM
		Cucurbitacin I	0,1-10 mM
		6-n-Propylthiouracil (PROP)	0,1-10 mM
		Cycloheximid	1-100 µM
Protokoll 1	Bitter	Chlorhexidin	0,003-1 mM
		Denatoniumbenzoat	0,1-10 mM
		Papaverin	0,1-10 mM
		Acesulfam K	0,01-1 M
		Erythromycin	0,1-4 mM
Protokoll 1	Salzig	Natriumchlorid	0,1-3 M
	Sauer	Zitronensäure	1-100 mM
Protokoll 2	Süß	Saccharose	0,1-1 M
		Sucralose	0,01-100 mM
	Umami	Natriumglutamat + Amilorid + IMP	0,003-1 M

Tabelle 2.25 Verwendete Geschmacksstimuli und deren Konzentrationsbereich in Kurzzeitpräferenztests mit Mäusen der Linie *Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}*

Neben dem oben beschriebenen Protokoll für die Testung von aversiven Stimuli wurden anderen Mäusen der *Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}*-Linie attraktive Geschmackslösungen präsentiert. Um die Attraktivität dieser Substanzen wie Saccharose gegenüber Wasser darzustellen, war es notwendig, das Restriktionsprotokoll abzuändern. Während der verkürzten Deprivationszeit auf 16 h wurden den Mäusen 2 ml Wasser sowie 0,7 g Futter zur Verfügung gestellt. Das oben beschriebene Messprinzip blieb erhalten. Aus den gewonnenen Leckantworten wurde das Substanz-Wasser-Verhältnis für jede Konzentration berechnet, graphisch anhand von Dosis-Wirkungskurven dargestellt und statistisch mittels Microsoft Excel 2010 sowie SPSS geprüft. Dazu wurden eine Varianzanalyse für jede Konzentration eines Stoffes sowie ein sich anschließender Kontrasttest mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Das Signifikanzniveau (α) wurde dabei auf 0,05 festgesetzt. Nach Ende des Experiments wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und für die Verifizierung des Genotyps der entsprechenden Maus eine Schwanzbiopsie genommen.

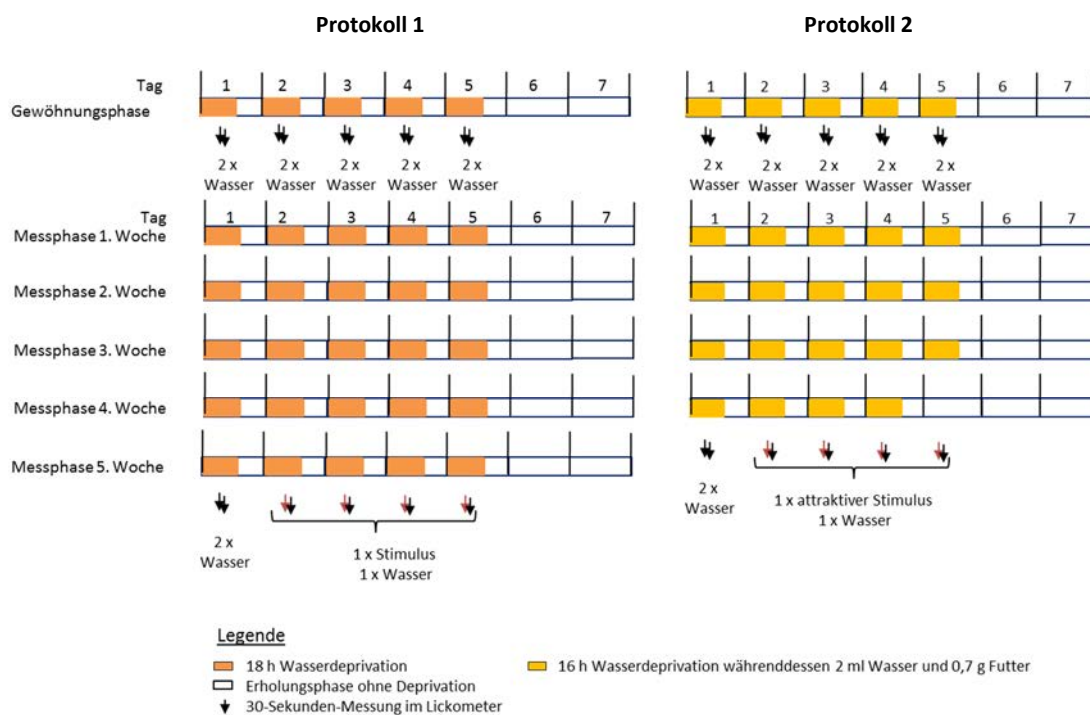


Abbildung 2.4 Protokolle der Kurzzeitpräferenztests. Protokoll 1: Nach einer Gewöhnungsphase im Lickometer-Testsystem mit Wasser als Stimulus folgte eine ca. fünfwöchige Messphase. In dieser Messung wurde am ersten Tag jeweils zweimal Wasser gemessen. An Tag 2-5 wurden der wasserdeprivierten Maus (Futter *ad libitum*) während der 30 s-Messung einmal ein aversiver Geschmacksstimulus sowie einmal Wasser dargeboten. Nach einer mindestens zweitägigen Pause begann eine weitere Messwoche. Insgesamt dauert dieses Protokoll ca. sechs Wochen. Protokoll 2: Während der Messung der Mäuse nach Protokoll 2 wurde anstatt eines aversiven Geschmacksstimulus, attraktive Substanzen getestet. Dabei unterscheidet sich Protokoll 2 lediglich in der Deprivationszeit der Mäuse, die hier nur 16 h beträgt. Während dieser Zeit bekommt die Maus zusätzlich 2 ml Wasser sowie 0,7 g Futter angeboten. Protokoll 2 wurde über einen Zeitraum von ca. fünf Wochen durchgeführt.

2.2.2.8 Zwei-Flaschen-Präferenztest

Für den Test, ob Mäuse freiwillig Bittersubstanzen konsumieren, wurden Zwei-Flaschen-Präferenztests durchgeführt. Dabei wurden die Tiere in je ein „Mouse-E-Motion“-Käfigsystem der Firma Infra-E-Motion gesetzt. Es handelte sich dabei um Standardpolycarbonatkäfige des Typs II, wobei Gitter und Käfigaufsatz speziell gefertigt wurden. In diesen Käfigaufsatz wurden zwei identische Trinkflaschen gehängt. Durch Magnete am oberen Ende des Käfigaufsatzes eingehängt,

wurde das Gewicht der Trinkflaschen dokumentiert. Wenn die Maus von der Flasche trinkt, nimmt diese an Gewicht ab, was über dieses System detektiert und aufgezeichnet wurden. Zusätzlich beinhaltet das System Sensoren, die die Aktivität der Mäuse während des Versuches, sowie Temperatur und Luftfeuchtigkeit dokumentieren. Während des 48-h-Versuches hatten die Mäuse freien Zugang zum Futter (Standardhaltungsdiät) sowie zu den zwei Trinkflaschen. Nach 24 h wurde die Position der Trinkflaschen gewechselt, um Positionseffekte auszuschließen. Im Protokoll A wurden den Mäusen ein Bitterstoff einer bestimmten Konzentration sowie Wasser angeboten. Der Versuchsablauf erstreckte sich über elf Wochen, wobei die Mäuse alle zwei Wochen getestet wurden. Im Protokoll B wurden den Mäusen zwei Bitterstoffe präsentiert. Während dieser Messreihe wurde basierend auf den Ergebnissen von Protokoll A ein Bitterstoff einer Konzentration gegen einen anderen Bitterstoff einer „iso-aversiven“ Konzentration über einen Zeitraum von 48 h getestet. Die Mäuse hatten in dieser Zeit freien Zugang zu besagten Bitterlösungen und Futter. Nach jeder Messung erfolgte eine 48-stündige Erholungsphase. Protokoll B wurde über einen Zeitraum von sieben Wochen durchgeführt.

Die Mäuse wurden während des Versuchszeitraumes beobachtet, falls bei einem Tier ein auffälliges Verhalten, wie aggressives Verhalten, Teilnahmslosigkeit, Lethargie, Koordinationsstörungen oder sonstiges unnormales Verhalten aufgetreten oder erkennbar gewesen wäre, wäre die betreffende Maus aus dem Versuch herausgenommen worden.

Während des Versuchs wurden die aufgenommene Gesamtflüssigkeitsmenge über den Messzeitraum von 48 h sowie der individuelle Konsum aus einer der beiden Flaschen (im Verhältnis zur Gesamtaufnahme) dokumentiert. Ob und wenn eine der beiden Lösungen bevorzugt konsumiert (Präferenz) oder vermieden (Ablehnung) wurde, wurde nach dem Versuchs statistisch mittels zweiseitigem *t*-Test ausgewertet. Dabei wurde das Verhältnis der Aufnahme der Flüssigkeiten in Beziehung gesetzt.

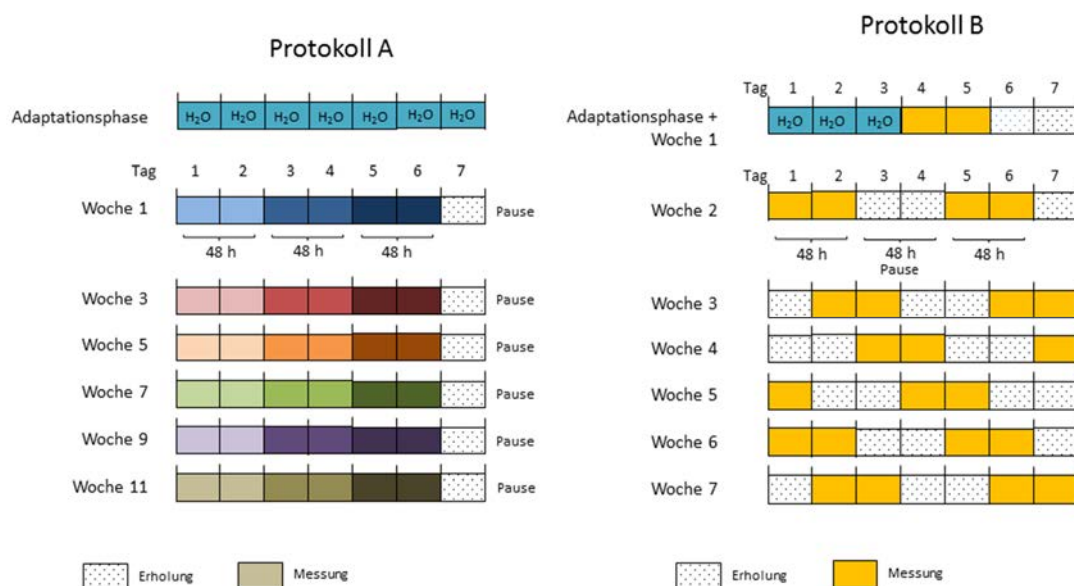


Abbildung 2.5 Zeitlicher Ablauf der Zwei-Flaschen-Präferenztest-Analysen für Protokoll A und B. Protokoll A: Über einen Zeitraum von 48 h wird den Mäusen ein Bitterstoff einer Konzentration sowie Wasser und Futter *ad libitum* angeboten. Nach den 48 h erfolgt eine weitere Messung des Bitterstoffes in einer anderen Konzentration. Nach drei aufeinanderfolgenden Messungen, erfolgte eine 1-wöchige Erholungsphase. Daran schloss sich eine weitere Messreihe an. Die Versuchsreihe in Protokoll A dauerte elf Wochen an. Protokoll B: in dieser Messreihe wurde ein Bitterstoff einer Konzentration gegen einen anderen Bitterstoff einer „iso-aversiven“ Konzentration über einen Zeitraum von 48 h getestet. Die Mäuse hatten in dieser Zeit freien Zugang zu besagten Bitterlösungen und Futter. Nach jeder Messung erfolgte eine 48-stündige Erholungsphase. Protokoll B wurde über einen Zeitraum von sieben Wochen aufgenommen.

Tabelle 2.26 Verwendete Bittergeschmacksstimuli während der 48 h-Zwei-Flaschen-Präferenztests

Protokoll A		Protokoll B in Abhängigkeit der Ergebnisse von Protokoll A	
Substanz	Konzentrationsbereich	Substanz	Konzentrationsbereich
Arbutin	1,0 - 30 mM	Arbutin	1,0 - 30 mM
Chininhydrochlorid	0,1 - 1,0 mM	Chininhydrochlorid	0,1 - 1,0 mM
Denatonium Benzoat	0,3 - 3,0 mM	Denatonium Benzoat	0,3 - 3,0 mM
Papaverin	0,1 - 3,0 mM	Papaverin	0,1 - 3,0 mM
Salicylsäure	1,0 - 10 mM	Salicylsäure	1,0 - 10 mM
Sucroseoctaacetat	0,1 - 1,0 mM	Sucroseoctaacetat	0,1 - 1,0 mM

2.2.3 Immunhistochemie

2.2.3.1 Direkte Immunfluoreszenz / intrinsische Fluoreszenz

Einige Mausmodelle ermöglichen es ein Fluoreszenzsignal zu detektieren, ohne eine spezielle Antikörperfärbung vorzunehmen. Dazu zählte auch die Mauslinie Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{tauGFP}.

Das grünfluoreszierende Protein (tauGFP) konnte mittels konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einem Detektionsbereich von 505-515 nm detektiert werden. Beim Zeiss AxioPlan (MIRAX) Scan-System wurde das tauGFP bei einer Anregungswellenlänge von 455-485 nm und einem Detektionsbereich von 505-555 nm detektiert werden.

2.2.3.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz erlaubt die Darstellung und Lokalisation von Proteinen auf subzellulären Ebenen. Der gegen ein spezifisches Antigen gerichtete Primärantikörper wird seinerseits durch einen Fluorochrom-gekoppelten sekundären Antikörper gebunden. Bei Anregung mittels Licht einer definierten Wellenlänge wird das Fluorochrom angeregt und emittiert energieärmeres, langwelligeres Licht. Dieses emittierte indirekte Fluoreszenzsignal kann mittels Fluoreszenz- bzw. konfokalen Lasermikroskops detektiert und aufgezeichnet werden.

Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden aus dem -80 °C Gefrierschrank entnommen und umgehend für 5 - 10 min in Paraformaldehyd fixiert, um eine vorzeitige Proteindegradation zu vermeiden. Anschließend wurden die Schnitte mit 1 x PBS gewaschen, optional schloss sich bei einigen Färbungen für eine bessere Bindung der Antikörper an die Epitope eine Antigendemaskierung an. Dazu wurde eine 10-minütige Inkubation in Antigen Retrieval-Lösung (1:10 in H₂O) durchgeführt (Shi et al., 2011). Danach folgte die Inkubation mit 0,5 % Triton-X-100 in 1 x PBS für 10 min inkubiert, um eine bessere Zugänglichkeit des Antikörpers durch die eukaryotische Zellmembran zu ermöglichen. Nach erneutem Waschen mit TNT folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper bzw. -serum (siehe Tab. 2.28) für 2 h bei RT und 4 °C über Nacht. Bei Verwendung des Gustducin-Antiserums wurde zur Kontrolle für dessen Spezifität, ein Gustducin-Blockierpeptid verwendet. Sowohl Antiserum als auch Blockierpeptid wurde dafür 24 h zuvor in TNB angesetzt (siehe Tab. 2.29) und bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3 x 10 min in TNT gewaschen, bevor die einstündige Inkubation mit dem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper bei RT erfolgte. Nach erneutem Waschen mit TNT wurden die Schnitte von ungebundenen Antikörpern befreit und anschließend mit mittels Deckgläschen und Eindeckmedium fixiert. Die Objektträger wurden bis zur Verwendung bei

4 °C dunkel gelagert. Die Auswertung erfolgte am Mikroskop (AxioPlan, Carl Zeiss) unter Zuhilfenahme des MIRAX-Viewers bzw. am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop unter Nutzung der Leica Software *LCS-Lite*.

Tabelle 2.27 Inkubations- und Waschschritte während einer immunhistochemischen Färbung

Schritt	Substanz	Zeit
Tag 1		
Fixierung	PFA 4 %	5 min
Waschen	1 x PBS	2 x 5 min
<i>(Optional* Demaskierung der Proteine</i>	<i>Antigen Retrieval Lösung 1:10 in H₂O</i>	<i>9 min)</i>
Permeabilisierung der Zellmembran	0,5 % Triton-X-100 in 1 x PBS	10 min
Waschen	TNT	3 x 5 min
Blockieren	TNB	30 min
Färbung	Primärantikörper	2 h RT, 4 °C über Nacht
Tag 2		
Waschen	TNT	3 x 10 min
Färbung	Sekundärantikörper	1 h RT
Waschen	TNT	3 x 5 min
Kernfärbung	DAPI (1:1000 in TNT)	10 min
Waschen	TNT	2 x 3 min

Tabelle 2.28 Verwendete Primärantikörper bzw. –seren. Dargestellt sind die verwendete Konzentration sowie die Verwendung eines optionalen Antigen-Retrieval-Schritts.

Antigen	Verdünnung	Antigen Retrieval
Calbindin	1:500	+
Cholin-Acetyl-Transferase	1:100	-
Dopamin-β-Hydroxylase	1:200	+
Methionin-Enkephalin	1:200	+
Glutamat-Decarboxylase 67	1:500	+
Glycinrezeptor Untereinheiten α1+2	1:200	+
Gustducin	1:500	+
Gustducin-Blockierpeptid	10x	-
GFP (Hühnchen)	1:500	-
GFP (Kaninchen)	1:500	-
Tryptophanhydroxylase 2	1:1000	+
Tyrosinhydroxylase	1:300	+
Vesikulärer Glutamatttransporter 1	1:500	+
Vesikulärer Glutamatttransporter 2	1:500	-

<u>10 x PBS</u>	<u>TNT</u>	<u>TNB</u>
0,2 M Na ₂ HPO ₄	0,1 M Tris-HCl pH 7,5	0,1 M Tris-HCl pH 7,5
1,4 M NaCl	0,15 M NaCl	0,15 M NaCl
30 mM KCl	0,05 % Tween 20	0,5 % Blocking Reagenz
20 mM KH ₂ PO ₄		
pH 7,4 einstellen		
autoklavieren		

2.2.4 Mikroskopie

2.2.4.1 Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop

Die Aufnahme und Digitalisierung der Gewebeschnitte erfolgte möglichst schnell nach der *in-situ*-Hybridisierung bzw. nach der Immunhistochemie, jedoch erst wenn das Eindeckmedium angetrocknet war und das Deckgläschen genügend Haftung am Objektträger besaß.

Tabelle 2.29 Übersicht verwendeter Farbstoffe. Darstellung des Anregungs- und Detektionsbereiche beim konfokalen Laserscanningmikroskop.

Farbstoff	Alexa-Fluor 488	Alexa-Fluor 546	Alexa-Fluor 633
Anregungsbereich	488 nm	561 nm	633 nm
Detektionsbereich	505-530 nm	580-640 nm	650-740 nm
Assoziiertes Fluoreszenzprotein bzw. Färbung gegen	tauGFP	diverse	TO-PRO®-3 Iodid

2.2.4.2 Automatisiertes Fluoreszenzmikroskop

Ebenso wie beim konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten erst nach ausreichender Trocknung mittels automatisierter Fluoreszenzmikroskopie (Axioplan, MIRAX MIDI-Scan System) digitalisiert. Als Lichtquelle kam eine Quecksilber-Kurzbogenlampe zum Einsatz. Für die Erfassung der Fluoreszenzfarbstoffe wurden die folgende Zeiss-Filtersätze genutzt.

Tabelle 2.30 Übersicht verwendeter Filtersätze bei Nutzung eines automatisierten Fluoreszenzmikroskops.

Farbstoff/Fluoreszenzprotein	DAPI	Alexa-Fluor 488/tauGFP	Alexa-Fluor 546/Cy3
Filterset (Zeiss)	49	44	43
zentraler Anregungsbereich ± Bandbreite	365 nm	475 nm ± 40 nm	545 nm ± 25 nm
Strahlteiler	395 nm	500 nm	Strahlteiler 570
Emissionsbereich ± Bandbreite	445 nm ± 50 nm	530 nm ± 50 nm	605 nm ± 70 nm

3 Ergebnisse

3.1 Expression von Bittergeschmacksrezeptoren im peripheren und zentralen Nervensystem

3.1.1 Expressionsanalysen im zentralen Nervensystem mittels RT-PCR-Analyse

Im Rahmen der Untersuchung einer Expression von Bittergeschmacksrezeptoren im zentralen Nervensystem wurden erste Analysen mittels Endpunkt-RT-PCR vorgenommen. Dazu wurde das Gehirn von C57BL/6-Tieren in neun Regionen unterteilt (siehe 2.2.2.4). Nach RNA-Isolation sowie cDNA-Synthese wurden diese neun Regionen auf die Expression verschiedener Bitterrezeptoren geprüft. Es wurde eine Auswahl von 19 der 35 Bitterrezeptorgene der Maus untersucht.

Die Selektion der untersuchten Rezeptoren erfolgte auf Basis der Lage auf den Chromosomen. Für jeden chromosomalen Bereich bzw. Abschnitt, der Tas2r-Gensequenzen beinhaltet, wurde mindestens ein Bitterrezeptor ausgewählt (siehe Abb. 3.1). Darüber hinaus wurden Rezeptoren ausgewählt, die zusammen mit dem Bitterrezeptor Tas2r131 in Geschmacksrezeptorzellen im Zungengewebe vorkommen. Andere Rezeptoren wie, Tas2r126 und Tas2r143, wurden ausgewählt, da sie nicht mit dem Tas2r131-Rezeptor in den gleichen Typ-II-Zellen im Zungengewebe vorkommen (Hübner, 2014). Für die RT-PCR-Analysen wurden die Bitterrezeptoren Tas2r105, Tas2r108, Tas2r110, Tas2r114, Tas2r115, Tas2r117, Tas2r118, Tas2r119, Tas2r120, Tas2r121, Tas2r126, Tas2r131, Tas2r134, Tas2r136, Tas2r137, Tas2r138, Tas2r140, Tas2r143 und Tas2r144 auf ihre Expression im Gehirn hin untersucht. Die Lage sowie Anordnung dieser Rezeptoren auf den Chromosomen ist in Abb. 3.1 dargestellt.

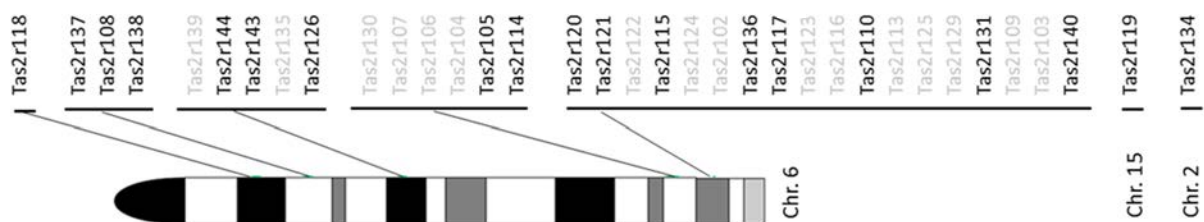


Abbildung 3.1: Lage und Anordnung der Bitterrezeptoren auf den Chromosomen 2, 6 und 15. Schwarz markierte Rezeptoren wurden für die RT-PCR-Analysen ausgewählt.

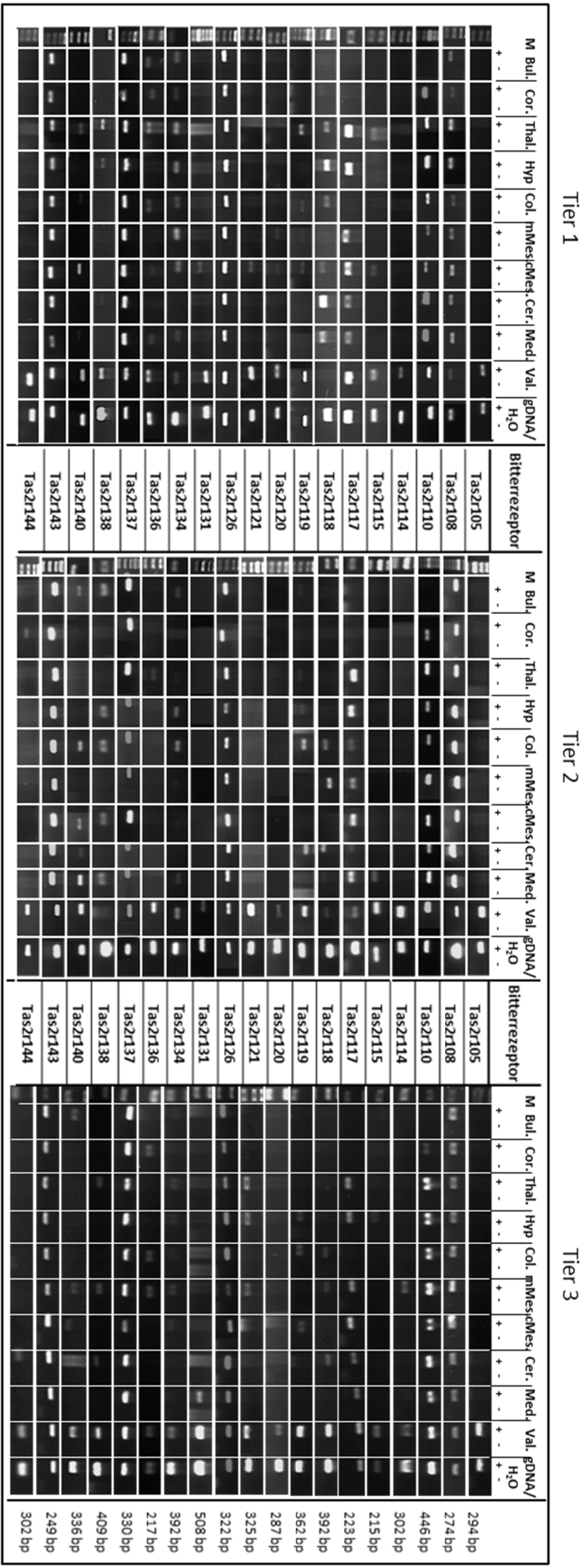


Abbildung 3.2 RT-PCR-Analysen von 19 Bitterrezeptoren in den neun Gehirnregionen. Darstellung der Ergebnisse für die Regionen *Bulbi olfactorii* (Bul.), *Cortex cerebri* (Cor.), *thalamische Region* (Thal.), *Hypothalamus* (Hyp.), *mediales Mesencephalon* (mMes.), *caudales Mesencephalon* (cMes.), *Cerebellum* (Cer.) und *Medulla oblongata* (Med.) in drei C57BL/6-Mäusen (Tier 1-3). Als Positivkontrolle wurde angereichertes Gewebe der Wallpapille (Val.) mitgeführt. +/-: cDNA-Synthese mit/ohne Zusatz von Reverse Transkriptase. Die Expression der 19 Bitterrezeptoren (Tas2r105, Tas2r108, Tas2r110, Tas2r114, Tas2r115, Tas2r117, Tas2r118, Tas2r119, Tas2r120, Tas2r121, Tas2r126, Tas2r131, Tas2r134, Tas2r136, Tas2r137, Tas2r138, Tas2r140, Tas2r143, Tas2r144) wurde in den Gehirnregionen sowie im Zungenewebe untersucht. Die Ergebnisse dieser Endpunkt-RT-PCR-Analysen zeigten einen Nachweis von 18 der 19 untersuchten Bitterrezeptoren in Abhängigkeit der untersuchten Gehirnregion. Einige Rezeptoren wie Tas2r108, Tas2r126, Tas2r137 und Tas2r143 konnten in allen Regionen sowie in allen drei Tieren nachgewiesen werden, wohingegen andere Rezeptoren nur in einigen Gehirnregionen und Tieren nachweisbar waren. Einzig der Bitterrezeptor Tas2r105 konnte in keiner Gehirnregion und keinem Tier detektiert werden. In der Wallpapille der Zunge als Positivkontrolle konnten alle 19 Rezeptoren nachgewiesen werden.

Die Analysen zeigten eine unterschiedliche Expression der Rezeptoren in den neun Gehirnregionen. Die Bitterrezeptoren Tas2r108, Tas2r126, Tas2r137 und Tas2r143 wurden in allen neun Regionen und in allen drei C57BL/6-Tieren exprimiert. Ebenso zeigte sich eine Expression des Tas2r110-Rezeptors mit Ausnahme der *Bulbi olfactorii* in allen Gehirnregionen der drei Tiere. Die Rezeptoren Tas2r117, Tas2r118, Tas2r119, Tas2r134, Tas2r136, Tas2r138 und Tas2r140 wurden in verschiedenen Gehirnregionen sowie zum Teil in mehreren Tieren exprimiert. Eine Expression der Bitterrezeptoren Tas2r114, Tas2r115, Tas2r120, Tas2r121, Tas2r131 und Tas2r144 konnte dagegen nur in einigen wenigen Regionen wie z.B. der Medulla oblongata, dem medialen und caudalen Mesencephalon gezeigt werden. Einzig die Expression des Tas2r105 wurde in keiner der neun Gehirnregionen nachgewiesen (siehe Abb. 3.2, Zusammenfassung Abb. 3.3).

Im Wesentlichen zeigte sich, dass mit 18 der 19 untersuchten Tas2rs die Mehrheit im Gehirn exprimiert wird. Darüber hinaus deutet sich für jeden Rezeptor ein spezielles Expressionsmuster in den neun Regionen an. Gleichwohl konnte eine Expression teilweise nur bei einem oder zwei der drei Tiere nachgewiesen werden.

In der Wallpapille der Zunge, als Positivkontrolle, konnte eine Expression aller 19 Bitterrezeptoren nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.2, 3.3).

Bitterrezeptor	Bul.			Cor.			Thal.			Hyp.			Col.			mMes.			cMes.			Cer.			Med.			Val.		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Tas2r105																														
Tas2r108																														
Tas2r110																														
Tas2r114																														
Tas2r115																														
Tas2r117																														
Tas2r118																														
Tas2r119																														
Tas2r120																														
Tas2r121																														
Tas2r126																														
Tas2r131																														
Tas2r134																														
Tas2r136																														
Tas2r137																														
Tas2r138																														
Tas2r140																														
Tas2r143																														
Tas2r144																														

Abbildung 3.3 Zusammenfassung der RT-PCR-Analysen der neun Gehirnregionen. Schematische Darstellung der Regionen *Bulbi olfactorii* (Bul.), *Cortex cerebri* (Cor.), thalamische Region (Thal.), Hypothalamus (Hyp.), *Lamina quadrigemina* (Col.), mediales Mesencephalon (mMes.), caudales Mesencephalon (cMes.), Cerebellum (Cer.) und Medulla oblongata (Med.) sowie der Wallpapille (Papillae vallatae – Val.) als Positivkontrolle in drei C57BL/6-Tieren (1-3). Der Nachweis der Rezeptoren in der cDNA ist durch ein grünes Feld dargestellt. Getestet wurde ein Set von 19 Bitterrezeptoren. Für die Rezeptoren Tas2r108, Tas2r126, Tas2r137 und Tas2r143 konnten in allen Regionen in den drei Tieren eine Expression detektiert werden. Der Expressionsnachweis einiger Rezeptoren gelang dagegen vorwiegend in einigen bestimmten Regionen. Hierzu zählen Tas2r110, Tas2r117, Tas2r118, Tas2r119, Tas2r134, Tas2r136, Tas2r138 und Tas2r140. Teilweise gelang der Nachweis der Expression in nur einem bzw. zwei der drei Tiere. Vereinzelt war es möglich, die Expression der Rezeptoren Tas2r114, Tas2r115, Tas2r120, Tas2r121, Tas2r131 und Tas2r144 in den neun Regionen zu detektieren. Der Bitterrezeptor Tas2r105 war in keiner Region und keinem Tier per RT-PCR nachweisbar.

Zur Kontrolle der Übereinstimmung des amplifizierten PCR-Fragmentes mit dem zu untersuchenden Rezeptor, wurde für jeden Rezeptor mindestens eine positive RT-PCR-Probe sequenziert. Hierzu wurde das zu amplifizierende PCR-Produkt zuvor über eine Kieselgelsäule aufgereinigt. Die Sequenzierungsergebnisse zeigten für alle Proben eine 99-100 %-ige Übereinstimmung zum *in-silico* errechneten Produkt.

3.1.2 Expressionsanalysen im zentralen Nervensystem mittels qRT-PCR

Zur Untersuchung der Expressionspegel der 19 Bitterrezeptoren (siehe 3.1.1) in den neun Gehirnregionen wurden Analysen mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Zum Großteil wurde dasselbe Material untersucht, welches bereits während der RT-PCR-Analysen verwendet wurde. In Einzelfällen wurden die Gehirnregionen eines weiteren C57BL/6-Tieres untersucht, um eine Gruppengröße von n = 3 zu erzielen.

Für 16 der 19 untersuchten Bitterrezeptoren konnte eine Expression in den neun Gehirnregionen nachgewiesen werden. Die Rezeptoren Tas2r108, Tas2r126, Tas2r137 und Tas2r143 konnten wie bereits in den Endpunkt-PCR-Analysen in allen Gehirnregionen nachgewiesen werden. Die höchsten Expressionsniveaus waren im Cerebellum detektierbar. Generell wiesen diese vier Rezeptoren im Vergleich zu anderen Tas2rs stets die höchsten Expressionspegel auf (siehe Abb. 3.4 sowie Anhang Tab. A1).

Die Rezeptoren Tas2r118, Tas2r134 und Tas2r138 wurden ebenfalls in allen neun Regionen nachgewiesen; ihr Expressionspegel ist im Vergleich zu den vier bereits erwähnten Tas2rs dagegen deutlich geringer. Für die Bitterrezeptoren Tas2r110 sowie Tas2r117 konnte mit Ausnahme der *Bulbi olfactorii* in allen Gehirnregionen ein mittleres Expressionsniveau gezeigt werden (siehe Abb. 3.4).

Die Analysen des Tas2r119-Rezeptors zeigten mittlere bis schwache Expressionspegel für sieben der neun Gehirnregionen *Bulbi olfactorii*, thalamische Region, mediales und caudales Mesencephalon, Hypothalamus, *Lamina quadrigemina* und Medulla oblongata (siehe Abb. 3.4). Im Cerebellum und im *Cortex cerebri* war eine Expression des Rezeptors dagegen in keinem der drei Tiere detektierbar. Ein Nachweis der überwiegend geringen Expressionspegel der Bitterrezeptoren Tas2r131 und Tas2r140 gelang in je vier der neun Gehirnregionen (Tas2r131-Rezeptor - *Bulbi olfactorii*, mediales und caudales Mesencephalon, *Lamina quadrigemina*; Tas2r140-Rezeptor - *Bulbi olfactorii*, mediales und caudales Mesencephalon, Cerebellum).

Die Analysen der Rezeptoren Tas2r120, Tas2r121, Tas2r136 und Tas2r144 zeigten, wenn deren Detektion möglich war, nur sehr geringe Expressionspegel auf. Allerdings konnten selbst Rezeptoren mit geringer Expression in mindestens zwei Regionen nachgewiesen werden. Der Tas2r144-Bitterrezeptor konnte beispielsweise im medialen Mesencephalon und der Medulla oblongata, die Rezeptoren Tas2r120 und Tas2r136 in der thalamischen Region und im medialen Mesencephalon, der Tas2r121-Rezeptor in der thalamischen Region und im Cerebellum detektiert werden.

Die Rezeptoren Tas2r105, Tas2r114 und Tas2r115 waren dagegen mittels qRT-PCR-Analysen in keiner der Gehirnregionen der drei Tiere nachweisbar (siehe Abb. 3.4, 3.5).

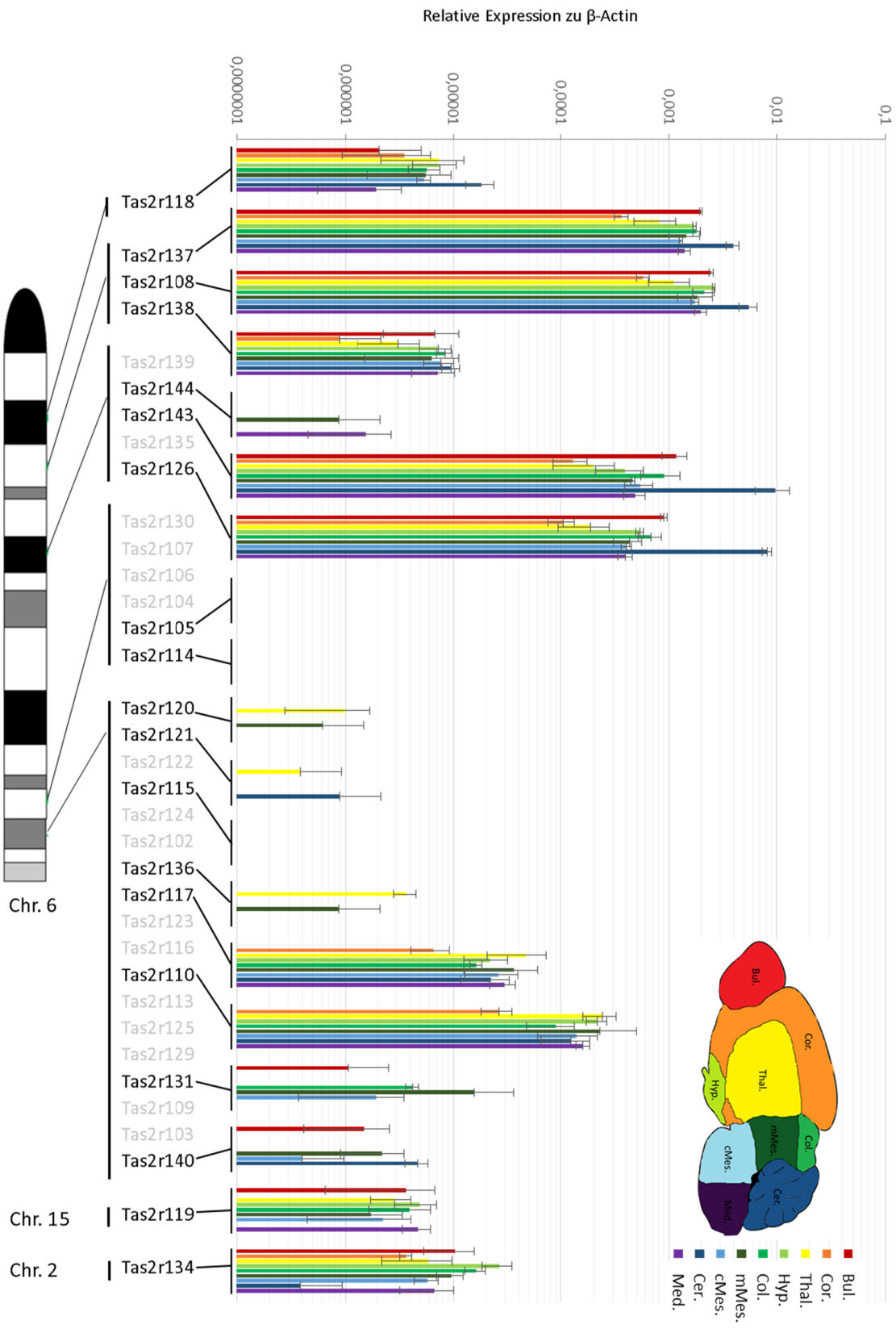


Abbildung 3.4 Quantitative RT-PCR-Daten der 19 Bitterrezeptoren in den neun Gehirngebieten. Untersucht wurden die Regionen *Bulbi olfactorii* (Bul., rot), *Cortex cerebri* (Cor., orange), thalamische Region (Thal., gelb), Hypothalamus (Hyp., hellgrün), *Lamina quadrigemina* (Col., grün), mediales Mesencephalon (mMes., dunkelgrün), caudales Mesencephalon (cMes., hellblau), Cerebellum (Cer., dunkelblau) und Medulla oblongata (Med., violett) von drei C57BL/6-Mäusen (Tier 1-3) im Vergleich der Expression zum Referenzgen β -Actin. Logarithmische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung der entsprechenden Bittergeschmacksrezeptorexpression. Weiterhin dargestellt sind die Lage und Anordnung der Rezeptoren auf den Chromosomen 2, 6 und 15.

Bitterrezeptor	Bul.			Cor.			Thal.			Hyp.			Col.			mMes.			cMes.			Cer.			Med.		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Tas2r105																											
Tas2r108																											
Tas2r110																											
Tas2r114																											
Tas2r115																											
Tas2r117																											
Tas2r118																											
Tas2r119																											
Tas2r120																											
Tas2r121																											
Tas2r126																											
Tas2r131																											
Tas2r134																											
Tas2r136																											
Tas2r137																											
Tas2r138																											
Tas2r140																											
Tas2r143																											
Tas2r144																											

Abbildung 3.5 Zusammenfassung der qRT-PCR-Analysen der neun Gehirnregionen von drei C57BL/6-Tieren. Der Nachweis einer Bitterrezeptorexpression ist durch ein grünes Feld dargestellt. Getestet wurde eine Auswahl von 19 der 35 Tas2rs. Für Tas2r108, Tas2r126, Tas2r137 und Tas2r143 konnten in allen Regionen in den drei Tieren (1-3) eine Expression detektiert werden. Auch für die Rezeptoren Tas2r118, Tas2r134 und Tas2r138 konnten eine Expression in allen neun Gehirnregionen in mindestens einem Tier nachgewiesen werden. Die Expression des Tas2r110- und des Tas2r117-Rezeptor konnten bis auf die *Bulbi olfactorii* in den anderen acht Regionen detektiert werden. Ein Expressionsnachweis der Rezeptoren Tas2r119, Tas2r131 und Tas2r140 gelang in Abhängigkeit der untersuchten Gehirnregion. Darüber hinaus war es möglich vereinzelt die Expression der Rezeptoren Tas2r120, Tas2r121, Tas2r136 und Tas2r144 in den neun Regionen zu detektieren. Die Bitterrezeptor Tas2r105, Tas2r114 und Tas2r115 konnten indes in keiner Region und keinem Tier per qRT-PCR nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Echtzeit-(qRT)-PCR-Analysen zeigten, dass eine Auswahl von 16 der 19 Bitterrezeptoren im Gehirn exprimiert wird. Das wurde ebenfalls durch die Endpunkt-(RT)-PCR gezeigt. Allerdings konnten mittels Echtzeit-PCR im Gegensatz zur Endpunkt-PCR die Rezeptoren Tas2r114 und Tas2r115 nicht nachgewiesen werden.

Die Analysen mittels RT- und qRT-PCR zeigten weiterhin, dass die Expression der 19 untersuchten Tas2rs zwischen den neun Gehirnregionen zum Teil stark variiert. So konnten einige Bitterrezeptoren nur in bestimmten, andere in allen Gehirnregionen detektiert werden. Darüber hinaus variierten auch die Expressionspegel der Bitterrezeptoren zwischen den neun Regionen. Ferner zeigten die verschiedenen Bitterrezeptoren generell unterschiedliche Expressionspegel auf. Für Rezeptoren, die benachbart auf dem Chromosom liegen, konnten dagegen ähnliche Expressionspegel detektiert werden (siehe Abb. 3.4, Abb. A1).

Im Wesentlichen zeigten die Analysen in den neun Gehirnregionen eine ähnliche Tas2r-Expression und vergleichbare Tas2r-Expressionspegel in allen untersuchten C57BL/6-Tieren. Das deutet auf ein einheitliches Tas2r-Expressionsmuster innerhalb des C57BL/6-Inzuchtstammes hin.

3.1.3 Expressionsanalysen aller Bittergeschmacksrezeptoren in ausgewählten Gehirnregionen mittels qRT-PCR in verschiedenen Mauslinien

Zur Untersuchung, ob die Lage der Rezeptorgene auf den Chromosomen einen Einfluss auf deren Expression besitzt, wurden alle 35 murinen Tas2rs untersucht. Dazu wurden exemplarisch die drei Gehirnregionen thalamische Region, mediales Mesencephalon und das Cerebellum von C57BL/6-

Tieren analysiert. Die Auswahl basiert auf dem Nachweis vieler Tas2rs mittels qRT-PCR in diesen Regionen sowie deren neurophysiologischen Funktionen während der Bittergeschmacksverarbeitung bzw. dem Verhalten. So ist beispielsweise der Thalamus an der Weiterleitung und Verarbeitung von gustatorischen Signalen beteiligt. Von dort werden die Bittergeschmacksinformationen zu Bereichen des agranulären Inselcortex weitergeleitet. Zum medialen Mesencephalon gehört unter anderem das periaquäduktale Grau, das neben der Schmerzunterdrückung auch an Angst- und Fluchreflexen beteiligt ist und in Kontakt zur *Formatio reticularis* steht (Böhni et al., 2015). Das Cerebellum ist an der Koordination von Bewegungsabläufen beteiligt, wie zum Beispiel dem Zurückweichen oder Wegrennen vor potentiellen Gefahren.

Die Analyse von funktionell divergierenden Regionen sollte einen Überblick der Tas2r-Expression in spezifischen Arealen des ZNS geben, was Rückschlüsse auf potentielle Funktionen ermöglicht.

Im Rahmen der Analyse des Expressionsmusters sollte zudem ermittelt werden, ob eine heterogene Tas2r-Expression (siehe 1.2.1) in Bitterrezeptor-exprimierenden Zellen im ZNS besteht, d.h. ob verschiedene Tas2rs in denselben Zellen vorliegen.

Dazu wurden gentechnisch modifizierte Mäuse der Linie Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA} verwendet. In Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+DTA}-Mäusen werden selektiv alle Tas2r131-exprimierenden Zellen (Tas2r131-Zellen) durch DTA abgetötet (siehe 2.1.8.3). Tas2r-Expressionsanalysen im Zungengewebe dieser Mäuse mit eliminierten Tas2r131-Zellen zeigten eine signifikant reduzierte Expression auch anderer Bitterrezeptoren (Hübner, 2014). Man kann daraus schließen, dass Rezeptoren, deren Expression stark erniedrigt ist, in denselben Zellen exprimiert werden wie Tas2r131. Tas2r131^{+/+}/Rosa26^{+DTA}-Mäuse dienen als Kontrolle, um eine Cre-unabhängige DTA-Expression auszuschließen (siehe 2.1.8.3).

Ziel dieser Analysen war es zu untersuchen, ob solch eine Kolo-kalisation von Bitterrezeptoren ebenfalls im zentralen Nervensystem nachweisbar ist. Im Folgenden werden daher die Ergebnisse der drei ausgewählten Gehirnregionen in C57BL/6-Tieren sowie der Mauslinie Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA} dargestellt (Abb. 3.6, 3.7, 3.8). Aufgrund des unterschiedlichen genetischen Hintergrundes der zwei Mauslinien wird in den nachfolgenden Abbildungen nur der Test auf Signifikanz zwischen Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+DTA}- sowie den entsprechenden Kontrolltieren dargestellt. Weitere Informationen auch zum Vergleich der C57BL/6-Tiere befinden sich im Anhang.

3.1.3.1 Expressionsanalysen in der thalamischen Region

Betrachtet man die Ergebnisse für alle drei untersuchten Mausgruppen konnte, für die thalamische Region eine Expression von 21 der 35 Bittergeschmacksrezeptoren gezeigt werden (C57BL/6: 17 Tas2rs; Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+DTA}: 19 Tas2rs; Kontrolltiere: 20 Tas2rs).

Die Ergebnisse der Tas2r-Expressionsanalysen in den C57BL/6-Tieren bestätigten ein spezifisches Expressionsmuster, das bereits in ersten qRT-PCR-Analysen mit 19 Bitterrezeptoren erkennbar war. So weisen Rezeptoren, deren Gensequenzen auf eng benachbarten Bereichen des Chromosoms liegen und in der gleichen Leserichtung transkribiert werden, ähnliche Expressionspegel auf. Das wurde beispielsweise für die Rezeptoren Tas2r117, Tas2r123, Tas2r116, Tas2r110, Tas2r113 und Tas2r125 erkennbar. Im Gegensatz dazu konnte die Expression der Rezeptoren Tas2r130, Tas2r107, Tas2r106, Tas2r104 und Tas2r105, deren Gensequenzen ebenfalls auf benachbarten Bereichen liegen, in keinem Fall nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.6). Ferner wurde die Expression von 16 der 35 Bitterrezeptoren in beiden Mauslinien gezeigt. In C57BL/6-Tieren konnte zudem für einen

weiteren, in Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA}-Tieren für vier weitere Rezeptoren eine Expression nachgewiesen werden. 14 der 35 Rezeptoren waren dagegen in keinem der Mausmodelle exprimiert.

Das weist zum einen auf ein konstantes Expressionsmuster mit ähnlichen Expressionspegeln für 30 Tas2rs hin, zum anderen für fünf Tas2rs auf eine Expression in Abhängigkeit der Mauslinie. Letzteres könnte auf die genetische Variabilität der beiden Linien zurückzuführen sein.

Darüber hinaus konnte für keinen der 35 Bitterrezeptoren eine Reduktion der Expressionspegel in Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+DTA} nachgewiesen werden. Das zeigt, dass der Tas2r131 in den untersuchten Regionen nicht mit anderen Tas2rs koexprimiert wird.

Interessanterweise konnte in der thalamischen Region für den Bitterrezeptor Tas2r109 eine signifikante Erhöhung des Expressionsniveaus in Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+DTA}-Tieren mit eliminierten Tas2r131-Zellen im Vergleich zu den Kontrolltieren detektiert werden. Die Gensequenz des Tas2r109 liegt in Leserichtung direkt vor dem Tas2r131-Gen (siehe Abb. 3.6, Abb. A1, Tab. A2).

3.1.3.2 Expressionsanalysen im medialen Mesencephalon

Im medialen Mesencephalon konnte die Expression von 23 der 35 Bitterrezeptoren nachgewiesen werden (C57BL/6: 21 Tas2rs; Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+DTA}: 21 Tas2rs; Kontrolltiere: 20 Tas2rs).

Die Ergebnisse ähneln denen der thalamischen Region. 19 Rezeptoren wurden in beiden Mauslinien nachgewiesen, 2 weitere jeweils in C57BL/6- oder Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA}-Tieren. 12 Bitterrezeptoren konnten in keinem der Tiere detektiert werden.

Auch hier zeigte sich ein ähnliches Expressionsmuster bei benachbarten Bitterrezeptorgenen. Wie in der thalamischen Region konnten ebenfalls keine Hinweise für eine Koexpression des Tas2r131 mit anderen Bitterrezeptoren gefunden werden (siehe Abb. 3.7).

Für die Bitterrezeptoren Tas2r109, Tas2r103, Tas2r140 sowie Tas2r118 konnten signifikant erhöhte Expressionspegel in den Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+DTA}-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren detektiert werden. Die Gene der Rezeptoren Tas2r109, Tas2r103 und Tas2r140 liegen in Leserichtung direkt vor dem Tas2r131-Gen. Das Tas2r118-Gen liegt dagegen in einem entfernteren Bereich innerhalb des Chromosom 6 (siehe Abb. 3.7, Abb. A1, Tab. A3).

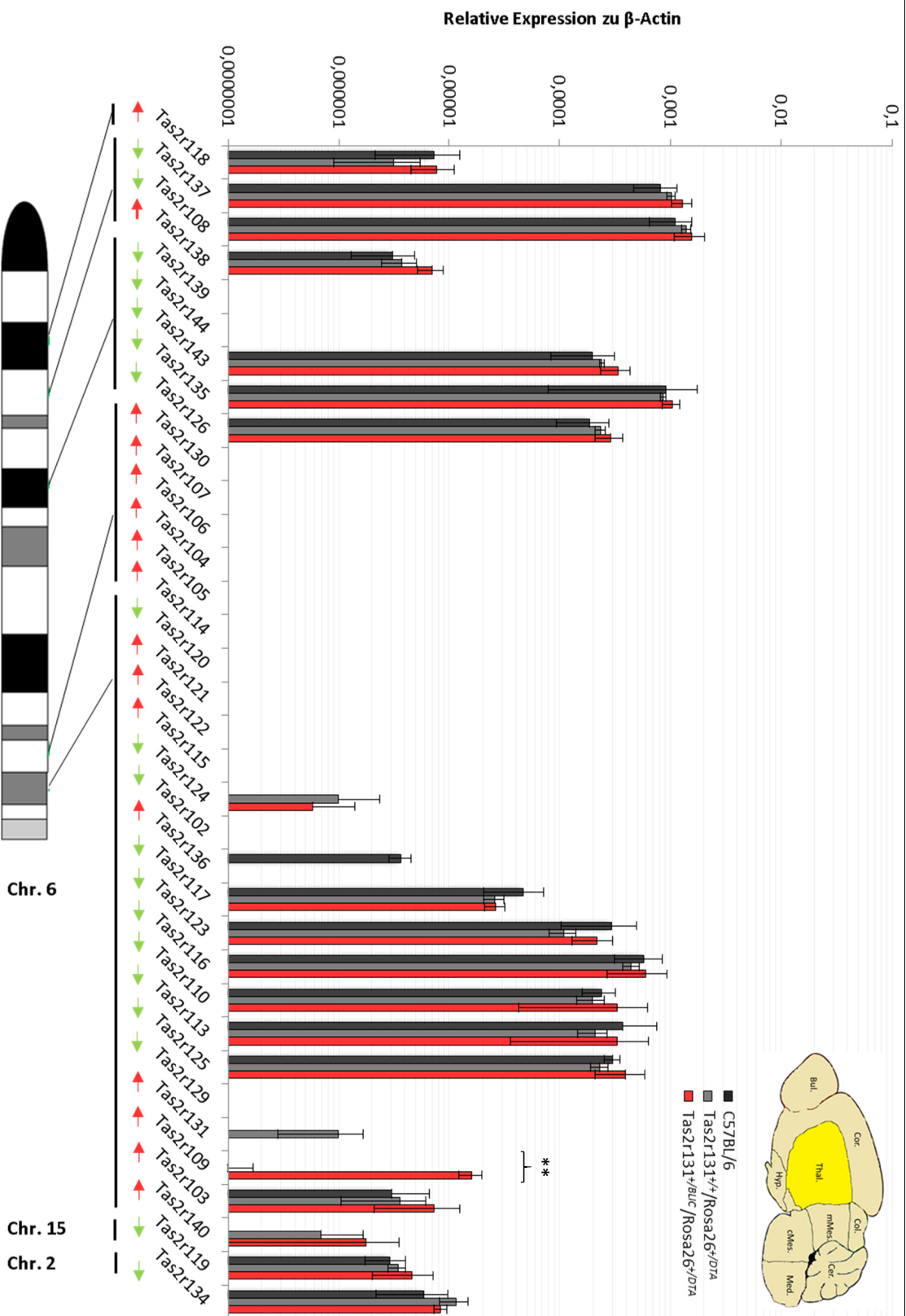


Abbildung 3.6 Quantitative RT-PCR-Analysen aller 35 Bittergeschmacksrezeptoren im Bereich der thalamischen Region inklusive der Basalganglien und dem Striatum. Die Analysen wurden in C57BL/6-Tieren (dunkelgrau) sowie in gentechnisch veränderten Mäusen der Linie *Tas2r131^{+/+}/Rosa26^{DTR}* (rot) und deren kontrollierte *Tas2r131^{+/+}/Rosa26^{Y/DTR}* (hellgrau) untersucht. Logarithmische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Rezeptoren in Abhängigkeit der Lage und Anordnung auf den Chromosomen 2, 6, und 15. Gruppengröße n = 3. Test auf Signifikanz mittels zweiseitigem t-Test (** p ≤ 0,01).

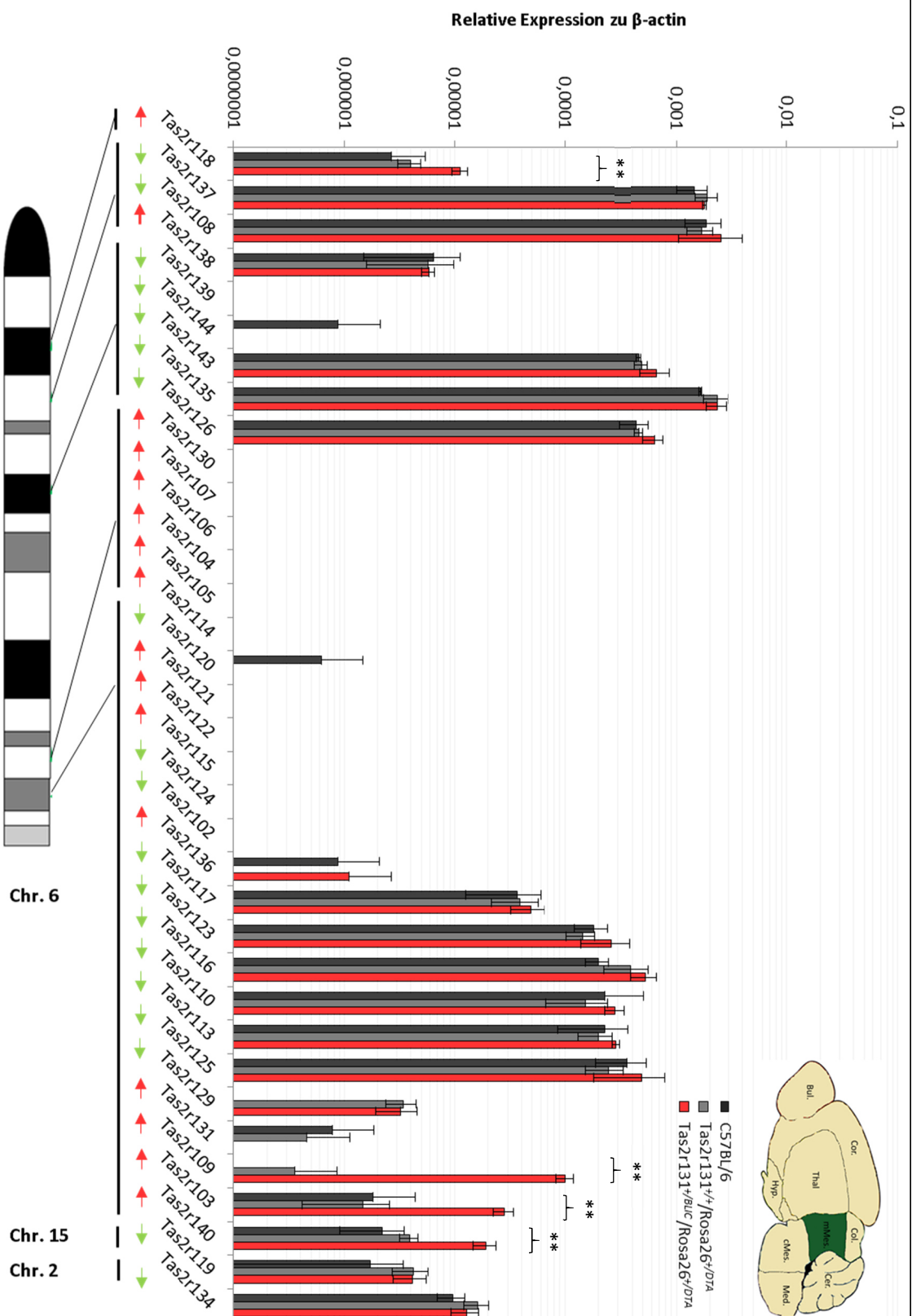


Abbildung 3.7 Quantitative RT-PCR-Analysen aller 35 Bittergeschmacksrezeptoren im Bereich des medialen Mesencephalon. Die Analysen wurden in C57BL/6-Tieren (dunkelgrau) sowie in gentechnisch veränderten Mäusen der Linie Tas2r131^{+/BULC}/Rosa26^{+/DTR} (rot) und deren kontrollierte Tas2r131^{+/+}/Rosa26^{+/DTR} (hellgrau) untersucht. Logarithmische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Rezeptoren in Abhängigkeit der Lage und Anordnung auf den Chromosomen 2, 6, und 15. Gruppengröße n = 3. Test auf Signifikanz mittels zweiseitigem t-Test (** p ≤ 0,01).

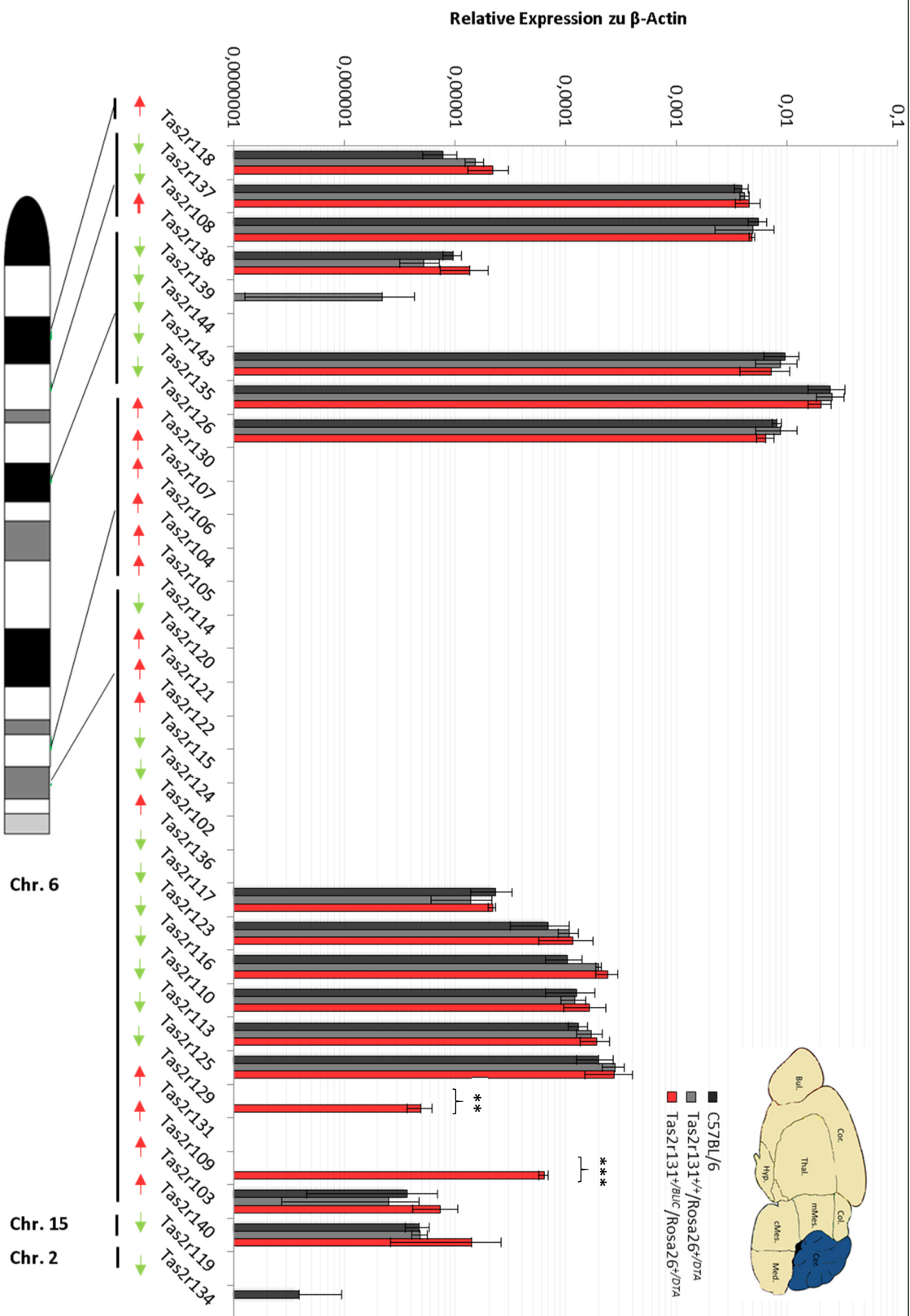


Abbildung 3.8 Quantitative RT-PCR Analysen aller 35 Bittergeschmacksrezeptoren im Cerebellum. Die Analysen wurden in C57BL/6-Tieren (dunkelgrau) sowie in gentechnisch veränderten Mäusen der Linie Tas2r131^{+/+}/BulC/Rosa26^{YDTR} (rot) und deren kontrollierte Tas2r131^{+/+}/Rosa26^{YDTR} (hellgrau) untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Rezeptoren in Abhängigkeit der Lage und Anordnung auf den Chromosomen 2, 6, und 15. Gruppengröße n = 3. Test auf Signifikanz mittels zweiseitigem t-Test (** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001).

3.1.3.3 Expressionsanalysen im Cerebellum

Im Cerebellum konnte eine Expression von insgesamt 19 der 35 Bitterrezeptoren nachgewiesen werden (C57BL/6: 16 Tas2rs; Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+DTA}: 17 Tas2rs; Kontrolltiere: 16 Tas2rs).

Die Analysen zeigten eine konstante Expression von 15 Bitterrezeptoren in beiden Mauslinien. Zudem konnte in C57BL/6-Tieren für einen weiteren, in Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA}-Tieren für drei weitere Rezeptoren eine Expression nachgewiesen werden. Für 16 der 35 Tas2rs war dagegen keine Expression in keiner der Mäuse detektierbar (siehe Abb. 3.8, Tab. A4).

Wie bereits in der thalamischen Region und dem medialen Mesencephalon konnten auch im Cerebellum ähnliche Expressionspegel von Rezeptoren gezeigt werden, deren Gene eng benachbart auf dem Chromosom liegen (siehe Abb. 3.8). Das weist erneut auf eine Abhängigkeit der Tas2r-Expression von der chromosomalen Lage hin. Ferner konnte auch im Cerebellum keine Reduktion der Tas2r-Expression in Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+DTA}-Tieren gezeigt werden, was auf eine getrennte Expression von Tas2r131 und anderen Bitterrezeptoren in Neuronen hinweist.

Die Analysen zeigten indes signifikant erhöhte Expressionspegel für Tas2r109 und Tas2r129. Die Gensequenzen beider Rezeptoren liegen benachbart zur Sequenz des Tas2r131-Rezeptors (siehe Abb. 3.8, Abb. A1, Tab. A4).

3.1.3.4 Vergleich der Tas2r-Expressionsanalysen der unterschiedlichen Gehirnregionen

Die Expressionsanalysen der thalamischen Region, des medialen Mesencephalon und des Cerebellum in C57BL/6- und Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA}-Tieren erbrachten einen Nachweis von insgesamt 25 der 35 Bitterrezeptoren (siehe Abb. 3.9 schwarz markierte Tas2rs). Dagegen konnte die Expression von 10 der 35 Rezeptoren in keiner der Regionen in diesen Mäusen detektiert werden. Interessanterweise liegen die Gene dieser Rezeptoren vorwiegend benachbart auf dem Chromosom 6 (siehe Abb. 3.9 rot-markierte Tas2rs).

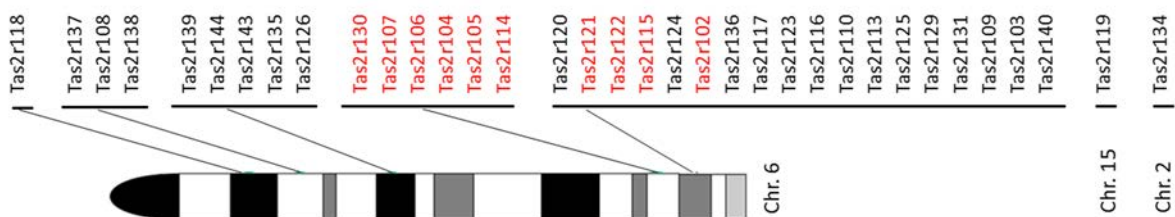


Abbildung 3.9 Kombinierte Ergebnisse der Tas2r-Expressionsanalysen mittels qRT-PCR in drei ausgewählten Gehirnregionen. Es konnte eine Expression von insgesamt 25 Tas2rs (schwarz) gezeigt werden. Zehn Tas2rs konnten dagegen nicht nachgewiesen werden (rot). Darstellung der Bitterrezeptoren in Abhängigkeit der chromosomalen Lage.

Für 15 der 35 Tas2rs war es möglich, eine Expression in allen drei Gehirnregionen sowie in C57BL/6- und Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA}-Tieren zu detektieren. Überdies konnten Unterschiede der Tas2r-Expression in Abhängigkeit der Gehirnregion bzw. der Mauslinie beobachtet werden. Im Cerebellum wurden die höchsten Expressionspegel von einigen Tas2rs detektiert, allerdings wurden hier auch die wenigsten Tas2rs exprimiert. Ein Nachweis der Expression des Tas2r119- und Tas2r131-Rezeptors war beispielsweise im Gegensatz zu den beiden anderen Regionen im Cerebellum nicht möglich (siehe Abb. 3.6, 3.7, 3.8).

Die Analysen zeigten ferner, dass in jeder der drei Regionen eine konstante sowie eine spezifische Auswahl von Tas2rs exprimiert wurden. So war zum Beispiel der Tas2r124-Rezeptor nur in der thalamischen Region von Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA}-Tieren nachweisbar.

Darüber hinaus zeigten die Analysen in allen drei Gehirnregionen von Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+DTA}-Tieren keine Reduktion von Expressionspegeln anderer Tas2rs auf. Dies deutet für alle Regionen auf eine getrennte Expression des Tas2r131-Rezeptors und anderer Tas2rs in neuronalen Zellen hin.

Im Gegenteil, in Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+DTA}-Tieren konnten erhöhte Expressionspegel der Bitterrezeptoren Tas2r109, Tas2r103 und Tas2r140 im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet werden. Dieser Effekt war in allen drei Gehirnregionen sichtbar, zum Teil auch signifikant. Die Gene dieser drei Rezeptoren liegen in Leserichtung direkt vor dem Tas2r131-Gen (siehe Abb. A1), was auf einen Zusammenhang der Tas2r-Expression mit der chromosomalen Lage ihrer Gene andeutet.

3.1.4 Auswirkung der Manipulation von Tas2r131-Zellen auf die Expression ausgewählter Tas2rs im Gehirn

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass die Elimination Tas2r131-exprimierender Zellen zu signifikant erhöhten Expressionspegeln für einzelne Bitterrezeptoren führt. Um zu prüfen, ob dieser Effekt allein auf das Fehlen des Tas2r131-Bitterrezeptors oder auf die Manipulation der Tas2r131-Zellen zurückzuführen ist, wurden drei Mausmodelle bezüglich ihrer Tas2r-Expression im ZNS untersucht.

Im Mausmodell Tas2r131^{BLIG/BLIG} wurde die kodierende Sequenz des Tas2r131-Rezeptors durch ein modifiziertes Targeting-Konstrukt ersetzt. Dabei wird unter Kontrolle der bislang unbekannt Promotorregion des Tas2r131-Rezeptors ein humanisiertes grünfluoreszierendes Protein (hrGFP) exprimiert. Tas2r131-Zellen können mithilfe des hrGFP visualisiert werden, eine Expression des Tas2r131-Gens ist dagegen nicht mehr nachweisbar. In den Expressionsanalysen werden die Ergebnisse aufgrund des genetischen Hintergrundes mit denen von C57BL/6-Tieren verglichen.

Die Mauslinie Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA} wurde bereits unter 3.1.3 eingeführt. Die Besonderheit des Mausmodells Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+DTA} liegt in der selektiven Elimination Tas2r131-exprimierender Zellen. Zum Ausschluss einer ungerichteten bzw. unkontrollierten Elimination anderer Zellen durch das DTA wurden Tas2r131^{+/+}/Rosa26^{+DTA} als Kontrolltiere untersucht.

Im Mausmodell Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT} wird selektiv die synaptische Weiterleitung in Tas2r131-Zellen gestört. Dabei spaltet das Tetanustoxin (TeNT) Synaptobrevin, welches an der Vesikelausschüttung an der präsynaptischen Membran beteiligt ist (Zhang et al., 2008). Dies führt in Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+TeNT}-Tieren im ZNS zu einer unterbrochenen Erregungsweiterleitung in Tas2r131-Neuronen. Zum Ausschluss einer Cre-Rekombinase unabhängigen Störung der Erregungsweiterleitung durch das Tetanustoxin wurden Tas2r131^{+/+}/Rosa26^{+TeNT} als Kontrolltiere untersucht.

Zur Analyse der Auswirkung von manipulierten Tas2r131-Zellen auf die Tas2r-Expression wurde eine Auswahl von 10 der 35 Bitterrezeptoren analysiert. Diese Auswahl erfolgte auf Grundlage der Ergebnisse der Tas2r-Expressionsanalysen im ZNS. Die Rezeptoren Tas2r126 und Tas2r143 wurden aufgrund eines konstant hohen, die Rezeptoren Tas2r116 und Tas2r125 aufgrund eines konstant mittleren Expressionsniveaus aller Tas2rs in den Gehirnregionen ausgewählt. Die Bitterrezeptoren Tas2r105 und Tas2r106 wurden ausgewählt, da diese in den Expressionsanalysen im ZNS nicht nachweisbar waren. Darüber hinaus wurden der Rezeptor Tas2r131 als Kontrolle der Mausmodelle sowie die Rezeptoren Tas2r109, Tas2r103 und Tas2r140 untersucht. Deren Gene liegen benachbart zum Tas2r131-Gen und zeigten in Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+DTA}-Tieren erhöhte Expressionspegel im

Vergleich zu Kontrolltieren. Nachfolgend werden die Ergebnisse der qRT-PCR-Expressionsanalysen für die zehn Bitterrezeptoren exemplarisch im medialen Mesencephalon sowie im Cerebellum in den sechs Mausgruppen dargestellt.

3.1.4.1 Einfluss der Manipulation von Tas2r131-Neuronen auf die Tas2r-Expression im medialen Mesencephalon

Für die Rezeptoren Tas2r143, Tas2r126, Tas2r106, Tas2r105, Tas2r116 und Tas2r125 zeigte sich in allen sechs Mausgruppen eine ähnliche bzw. keine Expression sowie vergleichbare Expressionspegel der Tas2rs. Der Tas2r131-Rezeptor konnte erwartungsgemäß in Tas2r131^{+BLIC/Rosa26^{+DTA}}-Tieren mit eliminierten Tas2r131-Zellen sowie in Tas2r131^{BLIG/BLIG}-Tieren nicht mehr nachgewiesen werden. In den dazugehörigen Kontrolltieren sowie in Tas2r131^{+BLIC/Rosa26^{+TeNT}}-Tieren war eine Expression des Tas2r131-Bitterrezeptors indes detektierbar. Generell waren die Expressionspegel des Tas2r131-Rezeptors gering (siehe Abb. 3.10, Tab A5).

Darüber hinaus konnten für die Rezeptoren Tas2r109, Tas2r103 und Tas2r140 erhöhte Expressionspegel in allen Mäusen mit manipulierten Tas2r131-Zellen im Vergleich zu den Kontrolltieren detektiert werden. Für den Tas2r109-Rezeptor wurden signifikant erhöhte Expressionspegel zum einen in Tas2r131^{BLIG/BLIG}-Tieren nachgewiesen. Zum anderen konnten signifikant erhöhte Expressionspegel des Tas2r109, Tas2r103 und Tas2r140 auch in Tas2r131^{+BLIC/Rosa26^{+DTA}}- und in Tas2r131^{+BLIC/Rosa26^{+TeNT}}-Tieren detektiert werden (siehe Abb. 3.10, Tab A5). Die Gene der drei Rezeptoren liegen in derselben Leserichtung wie die des Tas2r131-Gens. Am nächsten zum Tas2r131-Gen liegt die Sequenz des Tas2r109-Rezeptors. Die Gensequenzen von Tas2r103 und Tas2r140 liegen weiter entfernt zum Tas2r131-Gen (siehe Abb. A1).

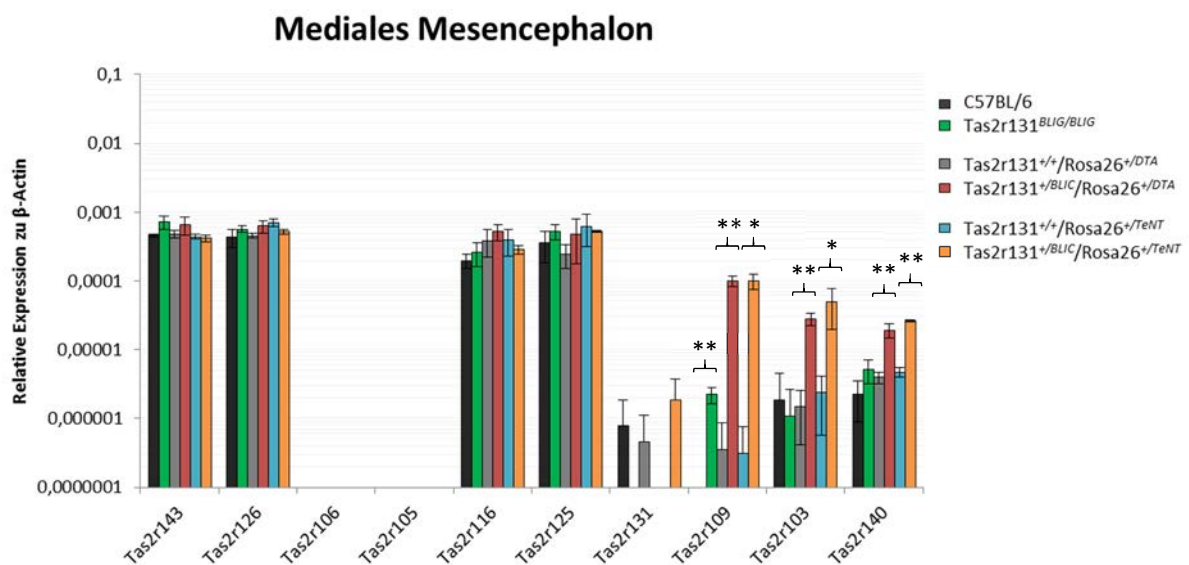


Abbildung 3.10 Vergleich der Expressionspegel von zehn Bitterrezeptoren im medialen Mesencephalon in sechs Mausgruppen. Untersucht wurden die Mausgruppen Tas2r131^{BLIG/BLIG}- (grün) und C57BL/6-Tiere (dunkelgrau), Tas2r131^{+BLIC/Rosa26^{+DTA}} (rot) und deren Kontrolltiere Tas2r131^{+BLIC/Rosa26^{+DTA}} (hellgrau) sowie Tas2r131^{+BLIC/Rosa26^{+TeNT}} (gelb) und deren Kontrolltiere Tas2r131^{+BLIC/Rosa26^{+TeNT}} (blau). Die Ergebnisse der Expressionsanalysen zeigten für die Rezeptoren Tas2r143, Tas2r126, Tas2r116 und Tas2r125 eine ähnliche Expression sowie vergleichbare Expressionspegel in allen Mauslinien. Ferner konnte in keinem Tier eine Expression der Bitterrezeptoren Tas2r106 und Tas2r105 nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten in Tas2r131^{BLIG/BLIG}-, Tas2r131^{+BLIC/Rosa26^{+DTA}}- und Tas2r131^{+BLIC/Rosa26^{+TeNT}}-Tieren signifikant erhöhte Expressionspegel der Rezeptoren Tas2r109, Tas2r103 und Tas2r140 im Vergleich zu den Kontrolltieren detektiert werden. Logarithmische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Rezeptoren in Abhängigkeit der Lage und Anordnung auf dem Chromosom 6. Test auf Signifikanz mittels zweiseitigem *t*-Test (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$). Gruppengröße $n=3$.

3.1.4.2 Einfluss der Manipulation von *Tas2r131*-Neuronen auf die *Tas2r*-Expression im Cerebellum

Im Cerebellum konnten erneut für die Rezeptoren *Tas2r143*, *Tas2r126*, *Tas2r106*, *Tas2r105*, *Tas2r116* und *Tas2r125* in allen sechs Mausgruppen eine ähnliche bzw. keine Expression sowie vergleichbare Expressionspegel nachgewiesen werden. Im Vergleich zum medialen Mesencephalon konnten im Cerebellum bis 100-fach höhere Expressionsniveaus der Rezeptoren *Tas2r143* und *Tas2r126* detektiert werden. Dieser Effekt war bereits in den vorherigen qRT-PCR-Analysen des Cerebellums (siehe 3.1.3.3) sichtbar und konnte hier erneut bestätigt werden.

Ein Nachweis der Expression des *Tas2r131*-Bitterrezeptors gelang nur für *Tas2r131*^{+/*BLIC*}/*Rosa26*^{+/*TeNT*}-Tiere. Ferner konnten hier erneut nur geringe Expressionspegel des *Tas2r131*-Rezeptors detektiert werden. Darüber hinaus wurden teils tendenziell, teils signifikant erhöhte Expressionspegel der Bitterrezeptoren *Tas2r109*, *Tas2r103*, *Tas2r140* in Mäusen mit manipulierten *Tas2r131*-Zellen detektiert. Für *Tas2r131*^{*BLIG/BLIG*}-Tiere konnte tendenziell ein höheres Expressionsniveau des *Tas2r109*-Rezeptors im Vergleich zu C57BL/6-Tieren nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.11, Tab A6). *Tas2r131*^{+/*BLIC*}/*Rosa26*^{+/*TeNT*}-Tiere wiesen stets signifikant erhöhte Expressionspegel der Rezeptoren *Tas2r109*, *Tas2r103* und *Tas2r140* im Vergleich zu den Kontrolltieren auf. In *Tas2r131*^{+/*BLIC*}/*Rosa26*^{+/*DTA*}-Tieren wurde für den Rezeptor *Tas2r109* ein signifikant erhöhtes, für *Tas2r103* und *Tas2r140* ein tendenziell erhöhtes Expressionsniveau nachgewiesen (siehe Abb. 3.11, Tab A6).

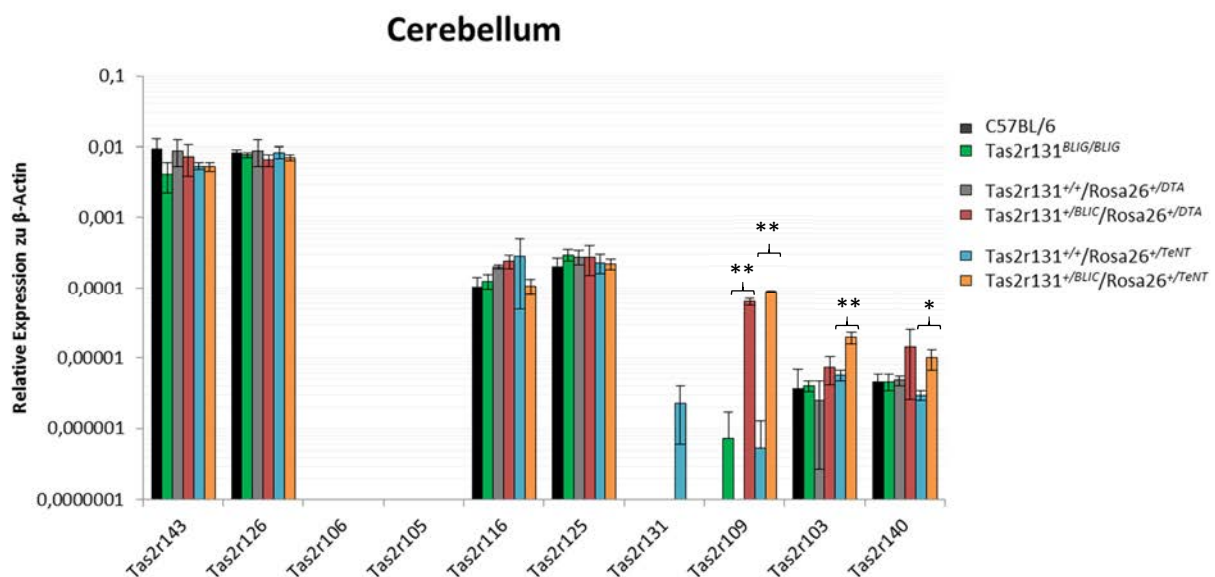


Abbildung 3.11 Vergleich der Expressionspegel von zehn Bitterrezeptoren im Cerebellum in sechs Mausgruppen. Untersucht wurden die Mauslinien *Tas2r131*^{*BLIG/BLIG*}- (grün) mit C57BL/6-Tieren (dunkelgrau), *Tas2r131*^{+/*BLIC*}/*Rosa26*^{+/*DTA*}- (rot) und deren Kontrolltiere *Tas2r131*^{+/*BLIC*}/*Rosa26*^{+/*DTA*}- (hellgrau) und *Tas2r131*^{+/*BLIC*}/*Rosa26*^{+/*TeNT*}- (gelb) sowie deren Kontrolltiere *Tas2r131*^{+/*BLIC*}/*Rosa26*^{+/*TeNT*}- (blau). Die Analysen zeigten für die Rezeptoren *Tas2r143*, *Tas2r126*, *Tas2r116* und *Tas2r125* eine ähnliche Expression sowie vergleichbare Expressionspegel zwischen den Mauslinien. Ferner konnte in keinem Tier die Expression der Bitterrezeptoren *Tas2r106* und *Tas2r105* nachgewiesen werden. Zudem konnten in *Tas2r131*^{+/*BLIC*}/*Rosa26*^{+/*DTA*}- und *Tas2r131*^{+/*BLIC*}/*Rosa26*^{+/*TeNT*}-Tieren teils tendenziell, teils signifikant erhöhte Expressionspegel der Rezeptoren *Tas2r109*, *Tas2r103* und *Tas2r140* im Vergleich zu den Kontrolltieren detektiert werden. Logarithmische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Rezeptoren in Abhängigkeit der Lage und Anordnung auf Chromosom 6. Test auf Signifikanz mittels zweiseitigem *t*-Test (* *p* ≤ 0,05; ** *p* ≤ 0,01). Gruppengröße *n* = 3.

3.1.4.3 Einfluss der Manipulation von *Tas2r131*-Zellen auf die *Tas2r*-Expression in der Wallpapille

Analog zu den Expressionsanalysen der Gehirnregionen mediales Mesencephalon und Cerebellum erfolgte die Untersuchung der Wallpapille als Kontrollorgan.

Es wurden erneut die sechs Mausgruppen analysiert (siehe 3.1.4), wobei die Daten der Mauslinie *Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA}* durch Dr. Sandra Hübner (DIfE) erhoben wurden. Diese zeigten in *Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+ /DTA}*-Tieren, dass die Elimination von *Tas2r131*-Zellen die Expressionspegel von acht der hier dargestellten zehn *Tas2rs* signifikant reduzierte. Dies wies auf die Koexpression des *Tas2r131* mit diesen acht *Tas2rs* in denselben Bitterrezeptorzellen hin. Darüber hinaus konnte für *Tas2r143* und *Tas2r126* ein ähnliches oder sogar erhöhtes Expressionsniveau in *Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+ /DTA}*- im Vergleich zu Kontrolltieren gezeigt werden (siehe Abb. 3.12, Tab A7). Das weist darauf hin, dass der *Tas2r131* nicht mit diesen *Tas2rs* kolokalisiert ist (Hübner, 2014).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten in *C57BL/6*- und *Tas2r131^{BLIG/BLIG}*- sowie Mäusen der Linie *Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}* ähnliche *Tas2r*-Expressionspegel für neun der zehn Bitterrezeptoren. Für den *Tas2r131*-Rezeptor konnten ähnliche Expressionsniveaus in *C57BL/6*- und *Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}*-Tieren detektiert werden (siehe Abb. 3.12). Im Mausmodell *Tas2r131^{BLIG/BLIG}* war dieser Rezeptor erwartungsgemäß nicht nachweisbar (siehe 3.1.4).

Generell konnten im Zungengewebe von *Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}* und *Tas2r131^{BLIG/BLIG}*-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren keine Expressionsunterschiede anderer *Tas2rs* nachgewiesen werden.

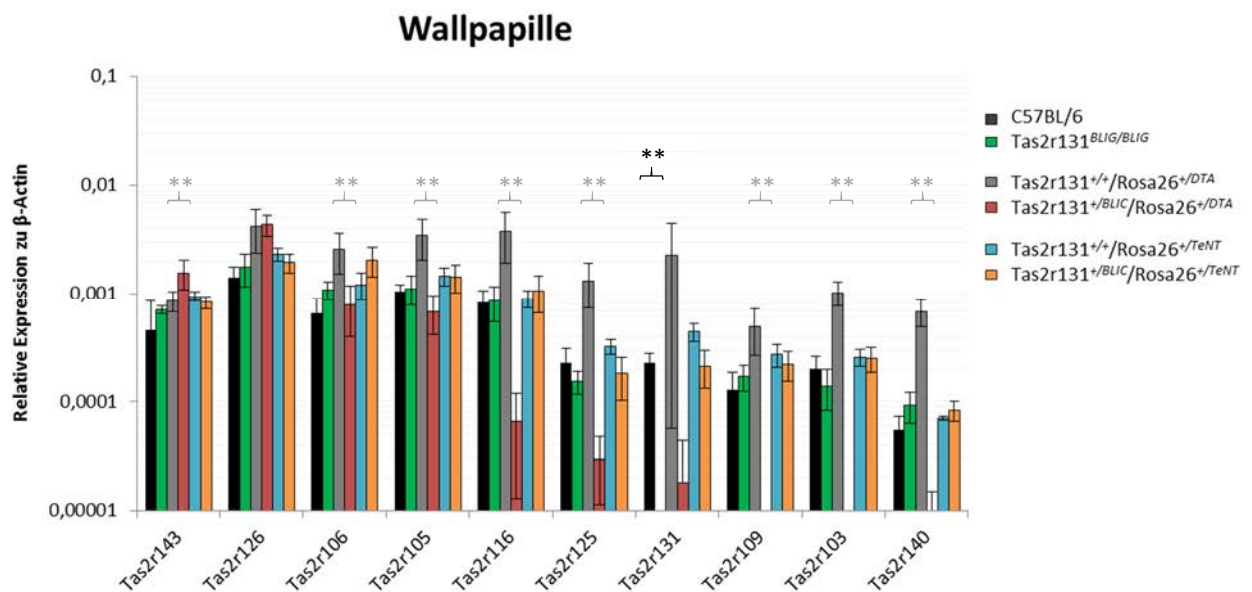


Abbildung 3.12 Vergleich der Expressionspegel von zehn Bittergeschmacksrezeptoren in der Wallpapille. Untersucht wurden die Mauslinien *Tas2r131^{BLIG/BLIG}* (grün) mit *C57BL/6*-Tieren (dunkelgrau), *Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/DTA}* (rot) und deren Kontrolltiere *Tas2r131^{+/+/Rosa26^{+/DTA}}* (hellgrau) und *Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/TeNT}* (gelb) sowie deren Kontrolltiere *Tas2r131^{+/+/Rosa26^{+/TeNT}}* (blau). Die Daten der *Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/DTA}* und deren Kontrolltiere sowie die Signifikanzanalysen (graue Sterne) wurden durch Dr. Sandra Hübner (DIfE) erhoben. In der Wallpapille zeigte sich eine ähnliche Expression sowie vergleichbare Expressionspegel der zehn Rezeptoren in *Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/TeNT}* (gelb) und deren Kontrolltieren *Tas2r131^{+/+/Rosa26^{+/TeNT}}* (blau) sowie für *C57BL/6*-Tiere. Auch für *Tas2r131^{BLIG/BLIG}*-Tiere konnten bis auf den *Tas2r131*-Rezeptor, dessen Expression erwartungsgemäß nicht mehr nachweisbar war, ähnliche Expressionspegel zu *C57BL/6*-Tieren gezeigt werden. Logarithmische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Rezeptoren in Abhängigkeit der Lage und Anordnung auf dem Chromosom 6. Test auf Signifikanz mittels zweiseitigem *t*-Test (** $p \leq 0,01$).

3.1.4.4 Vergleich des Einflusses der Manipulation von Tas2r131-Zellen auf die Tas2r-Expression im ZNS und der Zunge

Im Gegensatz zur Wallpapille (siehe Abb. 3.12) zeigten die Analysen der Gehirnregionen keine Reduktion von Expressionspegeln bei Elimination von Tas2r131-Zellen in Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+DTA}-Tieren. Das weist auf eine getrennte Expression des Tas2r131 und anderen Bitterrezeptoren im ZNS hin. Im Gegenteil, während in der Wallpapille die Expressionspegel verschiedener Tas2rs reduziert wurden, waren sie im ZNS in Tas2r131^{BLIG/BLIG}-, Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+DTA}- und Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+DTA}-Tieren zum Teil stark erhöht. Dies betraf die Bitterrezeptoren Tas2r109, Tas2r103 und Tas2r140 (siehe Abb. 3.10, 3.11). Die Gene dieser drei Rezeptoren liegen in Leserichtung direkt vor dem Tas2r131-Gen (siehe Abb. A1). Die erhöhten Expressionspegel des Tas2r109 wurden zum einen in Tas2r131^{BLIG/BLIG}-Tieren mit manipulierten Tas2r131 Rezeptor gezeigt. Darüber hinaus konnten noch stärker erhöhte Expressionspegel von Tas2r109 sowie von Tas2r103 und Tas2r140 in Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+DTA}- und Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+TeNT}-Tieren mit manipulierten Tas2r131-Zellen nachgewiesen werden.

Für die sechs Bitterrezeptoren Tas2r143, Tas2r126, Tas2r105, Tas2r106, Tas2r116 und Tas2r125 wurden dagegen vergleichbare Expressionspegel im ZNS in allen sechs Mausgruppen detektiert.

Die Ergebnisse der Wallpapille von Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+TeNT}-Tieren zeigten zudem, dass die Störung der synaptischen Weiterleitung in Tas2r131-Neuronen keinen Einfluss auf die Expression verschiedener Tas2rs in der Zunge besitzt.

3.1.5 Expressionsanalysen im Rückenmark

Zur Klärung der Frage, ob sich die bisherigen Ergebnisse der Tas2r-Expression der Gehirnregionen auf das gesamte ZNS übertragen lassen, wurde die Expression von zehn Bitterrezeptoren in einem Abschnitt des thorako-lumbalen Rückenmarks von Mäusen der Linie Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA} untersucht (siehe 3.1.4).

Die Bitterrezeptoren Tas2r143, Tas2r126, Tas2r116 sowie Tas2r105, Tas2r106 und Tas2r131 wurden sowohl in Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+DTA} als auch in Kontrolltieren ähnlich stark bzw. nicht exprimiert (siehe Abb. 3.13). Darüber hinaus konnte, wie in der thalamischen Region, im medialen Mesencephalon und im Cerebellum ein signifikant erhöhtes Expressionsniveau der Bitterrezeptoren Tas2r109, Tas2r103 und Tas2r140 in Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+DTA}-Tieren detektiert werden. Ein solcher Effekt konnte hier ebenfalls für den Bitterrezeptor Tas2r125 beobachtet werden (siehe Abb. 3.13, Tab A8).

Ein Vergleich der Gehirnregionen und des Rückenmarks zeigte ein ähnliches Tas2r-Expressionsmuster mit ähnlichen Expressionspegeln für neun Tas2rs. Ferner konnte auch im Rückenmark keine reduzierte Tas2r-Expression in Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+DTA}-Tieren detektiert werden. Daher scheint der Tas2r131 im ZNS nicht zusammen mit anderen Tas2rs in denselben Zellen exprimiert zu werden. (siehe Abb. 3.13, Tab A8).

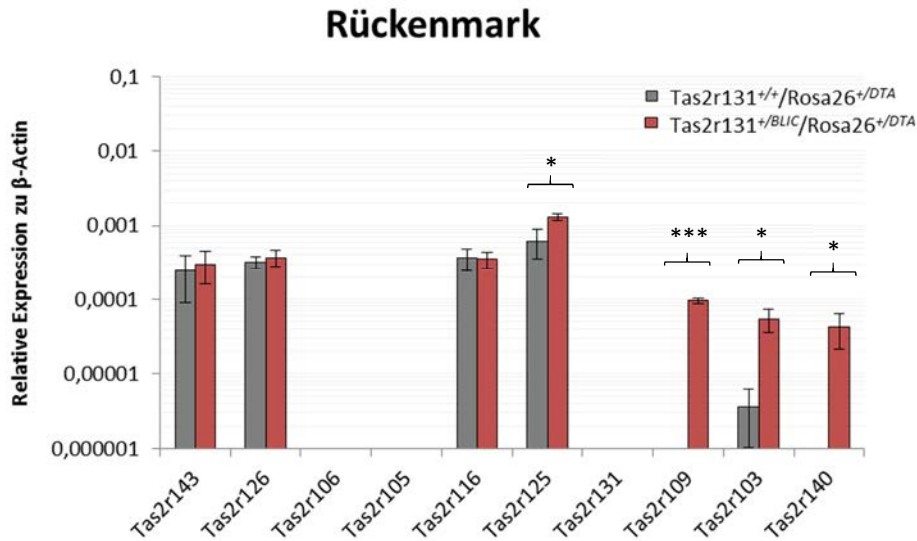


Abbildung 3.13 Quantitative RT-PCR-Analysen von zehn Bitterrezeptoren im thorako-lumbalen Rückenmark. Die Analysen wurden in Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/DTA}-Mäusen (rot) und deren Kontrolltiere Tas2r131^{+/+}/Rosa26^{+/DTA} (hellgrau) durchgeführt. Logarithmische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Rezeptoren in Abhängigkeit der Lage und Anordnung auf dem Chromosom 6. Test auf Signifikanz mittels zweiseitigem t-Test (* p ≤ 0,05; *** p ≤ 0,001).

3.1.6 Nachweis der Expressionsstärke von Bitterrezeptoren im peripheren Nervensystem.

Neben den Tas2rs-Expressionsanalysen im zentralen Nervensystem wurden auch Teile des peripheren Nervensystems untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse für zehn Bitterrezeptoren (siehe 3.1.4) in den *Ganglien nodosum/petrosum* (NPG) sowie *Ganglion geniculi* (GG) vorgestellt. Die *Ganglien nodosum/petrosum* stellen die unteren Ganglien des IX. und X. Hirnnerven dar und liegen außerhalb der Schädelhöhle. Das *Ganglion geniculi*, zum VII. Hirnnerv gehörend, liegt innerhalb des Fazialiskanals im Felsenbein. Die Expression der zehn Bitterrezeptoren in diesen Geweben wurde in C57BL/6- und Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA}-Tieren untersucht.

3.1.6.1 Ganglion nodosum/petrosum (NPG)

Die Analysen im NPG zeigten für die Bitterrezeptoren Tas2r143, Tas2r126 und Tas2r106 ähnliche bzw. keine Expression sowie vergleichbare Pegel in C57BL/6- und Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA}-Tieren (siehe Abb. 3.14, Tab A9). Ein Nachweis der Rezeptoren Tas2r105 und Tas2r131 gelang nur in C57BL/6-Tieren. In Tieren der Linie Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA} waren diese Rezeptoren nicht nachweisbar.

Die Rezeptoren Tas2r116, Tas2r125 und Tas2r140 zeigten darüber hinaus tendenziell niedrigere Expressionspegel in Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/DTA}-Tieren im Vergleich zu C57BL/6- und Tas2r131^{+/+}/Rosa26^{+/DTA}-Kontrolltieren. Dieser Trend war für keinen der drei Rezeptoren signifikant. Im Gegensatz dazu konnten in Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/DTA}-Tieren teils signifikant, teils tendenziell erhöhte Expressionspegel für Tas2r109 und Tas2r103 gegenüber den Kontrolltieren nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.14, Tab A9). Diese Ergebnisse wurden für beide Rezeptoren ebenfalls in verschiedenen Gehirnregionen und im Rückenmark gezeigt.

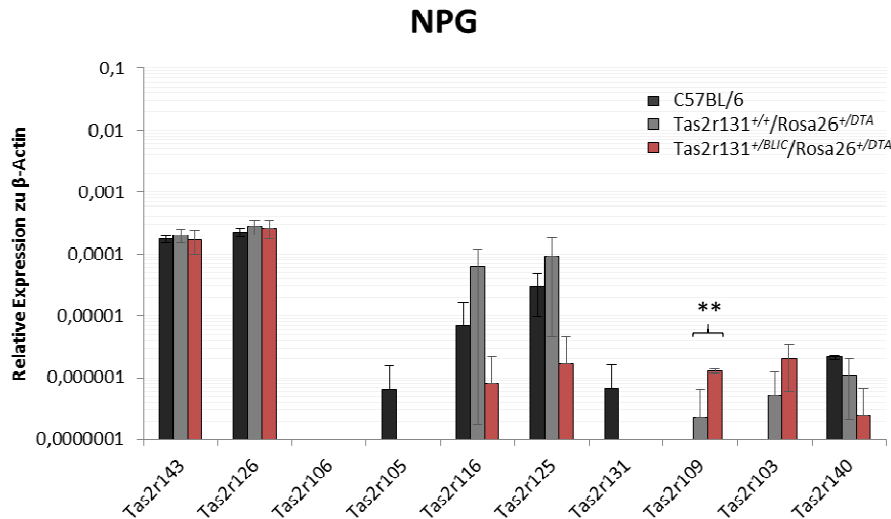


Abbildung 3.14 Vergleich der Expressionspegel von zehn Bitterrezeptoren im NPG. Die Analysen wurden in Mäusen der Linie C57BL/6 (schwarz) sowie in Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/DTA} (rot) und deren Kontrolltiere Tas2r131^{+/+}/Rosa26^{+/DTA} (hellgrau) durchgeführt. Die Expressionsanalyse im NPG zeigten für die Rezeptoren Tas2r143 und Tas2r126 eine ähnliche Expression sowie vergleichbare Expressionspegel in C57BL/6-, Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/DTA}- und Tas2r131^{+/+}/Rosa26^{+/DTA}-Kontrolltieren. Eine Expression des Tas2r106 konnte in keinem Tier detektiert werden. Ein Nachweis von Tas2r105 und Tas2r131 gelang dagegen vereinzelt in C57BL/6-Tieren. Für die Bitterrezeptoren Tas2r116, Tas2r125 und Tas2r140 konnten tendenziell niedrigere Expressionspegel in Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/DTA}-Tieren detektiert werden, als in den Kontrolltieren. Die Expressionsanalysen zeigten ferner teils signifikant, teils tendenziell erhöhte Expressionspegel der Bitterrezeptoren Tas2r109 und Tas2r103 in Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/DTA} im Vergleich zu den Kontrolltieren. Ein Nachweis dieser Rezeptoren in C57BL/6-Tieren gelang nicht. Logarithmische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Rezeptoren in Abhängigkeit der Lage und Anordnung auf dem Chromosom 6. Gruppengröße n = 3-4. Test auf Signifikanz mittels zweiseitigem t-Test (** p ≤ 0,01).

3.1.6.2 Ganglion geniculi (GG)

Im GG zeigten sich wie bereits im NPG ein ähnliches Expressionsmuster sowie vergleichbare Expressionspegel für die Bitterrezeptoren Tas2r126 und Tas2r143 in C57BL/6- und in Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA}-Tieren.

Ein Nachweis der Expression der Rezeptoren Tas2r105 und Tas2r106 war nur vereinzelt in Tas2r131^{+/+}/Rosa26^{+/DTA}-Kontrolltieren möglich. Die Expression des Tas2r131 konnte nur in C57BL/6- und Tas2r131^{+/+}/Rosa26^{+/DTA}-Kontrolltieren, nicht aber in Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/DTA}-Tieren detektiert werden (siehe Abb. 3.15, Abb. 3.1). Die Analyse der Rezeptoren Tas2r116, Tas2r125 und Tas2r140 zeigte wie im NPG tendenziell niedrigere Expressionspegel in Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/DTA}-Tieren im Vergleich zu C57BL/6- und Tas2r131^{+/+}/Rosa26^{+/DTA}-Kontrolltieren (siehe Abb. 3.15). Dieser Trend war für keinen der drei Rezeptoren signifikant.

Eine Expression des Tas2r109 konnte in Tieren der Linie Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA} und C57BL/6-Tieren detektiert werden, letztere wiesen allerdings höhere Expressionspegel auf (siehe Abb. 3.15, Tab A10). Der Tas2r103 konnte in C57BL/6- und Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/DTA}-Tieren mit vergleichbaren Expressionspegeln nachgewiesen werden. In Tas2r131^{+/+}/Rosa26^{+/DTA}-Kontrolltieren war er nicht nachweisbar.

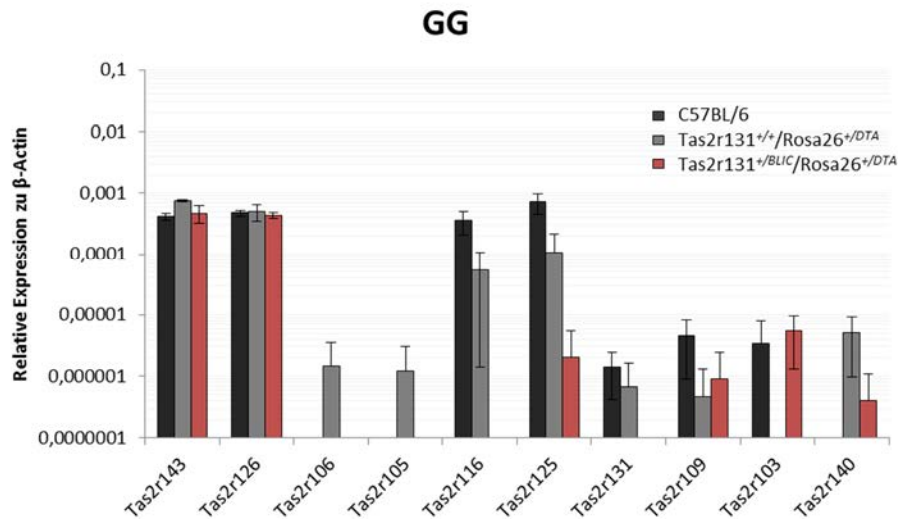


Abbildung 3.15 Vergleich der Expressionspegel von zehn Bitterrezeptoren im GG. Die Analysen wurden in Mäusen der Linie C57BL/6 (schwarz) sowie in Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/DTA} (rot) und deren Kontrolltiere Tas2r131^{+/+}/Rosa26^{+/DTA} (hellgrau) durchgeführt. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse im GG zeigten eine ähnliche Expression sowie vergleichbare Expressionspegel für die Rezeptoren Tas2r143, Tas2r126 und Tas2r109. Die Rezeptoren Tas2r106 und Tas2r105 konnten vereinzelt nur in Tas2r131^{+/+}/Rosa26^{+/DTA} Kontrolltieren detektiert werden. Für die Bitterrezeptoren Tas2r116, Tas2r125 und Tas2r140 konnten tendenziell niedrigere Expressionspegel in Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/DTA}-Tieren detektiert werden, als in den Kontrolltieren. Die Expressionsanalysen zeigten ferner eine Expression des Tas2r131 Rezeptors in C57BL/6- sowie in Tas2r131^{+/+}/Rosa26^{+/DTA}-Kontrolltieren. Der Bitterrezeptor Tas2r103 konnte in Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/DTA}-Tieren sowie vereinzelt in C57BL/6-Tieren nachgewiesen werden. Logarithmische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Rezeptoren in Abhängigkeit der Lage und Anordnung auf dem Chromosom 6. Gruppengröße n = 3-4. Test auf Signifikanz mittels zweiseitigem t-Test.

3.1.6.3 Vergleich der Expression von Bitterrezeptoren im peripheren und zentralen Nervensystem.

Die Expressionsanalysen im NPG und GG zeigten für alle zehn Bitterrezeptoren gemeinsame Expressionsmuster im peripheren Nervensystem (siehe 3.1.6.1, 3.1.6.2). Darüber hinaus glichen die Ergebnisse von NPG und GG im Wesentlichen denen im ZNS. Für die Rezeptoren Tas2r143, Tas2r126, Tas2r116 und Tas2r125 wurden ähnliche Expressionspegel zwischen C57BL/6- und Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA}-Tieren detektiert. Zudem konnten wie im ZNS für die Rezeptoren Tas2r109 und Tas2r103 teils signifikant, teils tendenziell höhere Expressionspegel in Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/DTA}- im Vergleich zu den Kontrolltieren nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass auch im PNS der Tas2r131 vermutlich nicht mit anderen Tas2rs koexpressiert wird.

Allerdings zeigten die Analysen für Tas2r116 und Tas2r125 tendenziell niedrigere Expressionspegel in Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/DTA}- im Vergleich zu den Kontrolltieren. Dieser Trend war aber in keinem Fall signifikant.

Ferner konnte im NPG der Rezeptor Tas2r105, im GG die Rezeptoren Tas2r106 und Tas2r105 sporadisch nachgewiesen werden. Im ZNS war eine Expression dieser Rezeptoren dagegen nie detektierbar.

3.2 Nachweis einzelner Bitterrezeptoren auf zellulärer Ebene mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Ergänzend zum Nachweis mittels qRT-PCR-Analyse wurde untersucht, ob eine Visualisierung von Bitterrezeptor-exprimierenden Zellen auf zellulärer Ebene im zentralen Nervensystem möglich ist. In Ermangelung spezifischer Antikörper, wurde zunächst die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) angewandt. Dazu wurden DIG-markierte Antisense- (as) und Sense-RNA-Sonden (s) für verschiedene Bitterrezeptoren generiert.

Die Auswahl der zu untersuchenden Rezeptoren erfolgte auf Grundlage der Tas2r-Expressionsanalysen (siehe 3.1). Die Rezeptoren Tas2r135 und Tas2r137 wurden gewählt, da diese die höchsten Expressionspegel aufwiesen. Darüber hinaus wurden Sonden für die Rezeptoren Tas2r123 und Tas2r125 aufgrund mittlerer bis hoher Expressionspegel sowie Sonden für den Tas2r105-Rezeptor, generiert, da dieser im ZNS nicht nachweisbar war. Ferner wurden Sonden für den Tas2r109 getestet, da dieser in Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+DTA}-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren stark erhöhte Expressionspegel aufwies. Weiterhin wurden Sonden für α -Gustducin, Teil der gustatorischen Signalkaskade, während der FISH-Analysen mitgeführt.

Nach Generierung der RNA-Sonden wurde ihre Qualität mittels Dot-Blot-Hybridisierung eruiert. Anschließend wurde durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung auf Zungengewebe getestet, ob diese Sonden zur Visualisierung der Bitterrezeptoren geeignet sind. Hierzu wurden Gefrierschnitte von C57BL/6-Tieren verwendet.

Zum Nachweis der Rezeptoren Tas2r105, Tas2r123, Tas2r125, Tas2r135 und Tas2r137 im zentralen Nervensystem wurden Gefrierschnitte von C57BL/6-Tieren verwendet. Für den Bitterrezeptor Tas2r109 wurden aufgrund höherer Expressionspegel (siehe 3.1.3) Gefrierschnitte von Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+DTA}-Mäusen genutzt.

3.2.1 Validierung der RNA-Sonden im Zungengewebe

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) der RNA-Sonden (siehe 3.2) im Zungengewebe der Wallpapille dargestellt. Für alle getesteten Antisense-RNA-Sonden konnten zelluläre Signale in der Wallpapille detektiert werden. Die stärksten Signale zeigte die Hybridisierung mit der Gustducin-Sonde. Das schwächste Signal wurde bei Verwendung der Tas2r125-Sonde detektiert. Die Sense-Sonden führten erwartungsgemäß im Zungengewebe sowie nachfolgend dargestellt im Gehirn nie zu Signalen (siehe Abb. 3.16).

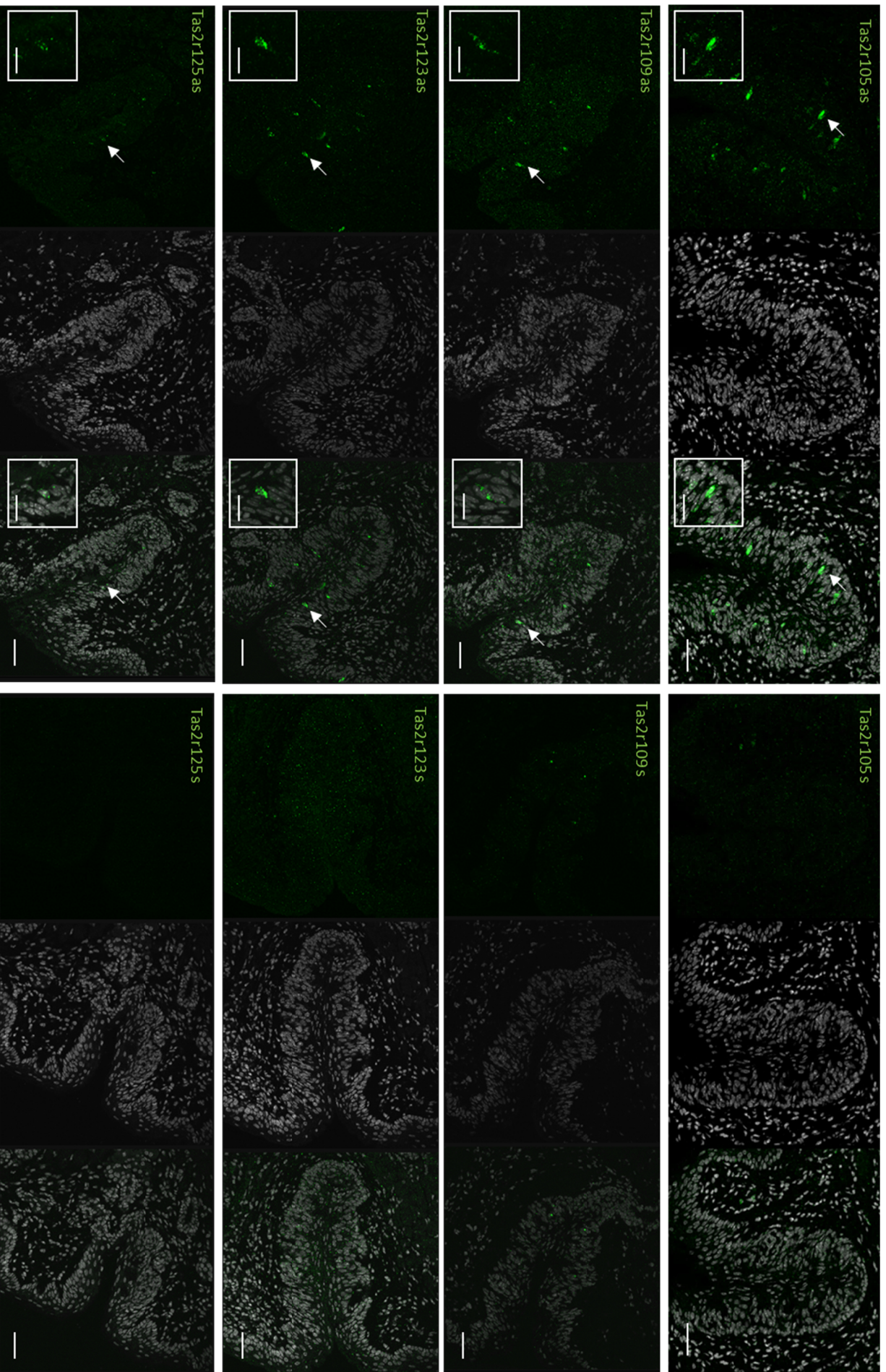


Abbildung wird fortgesetzt

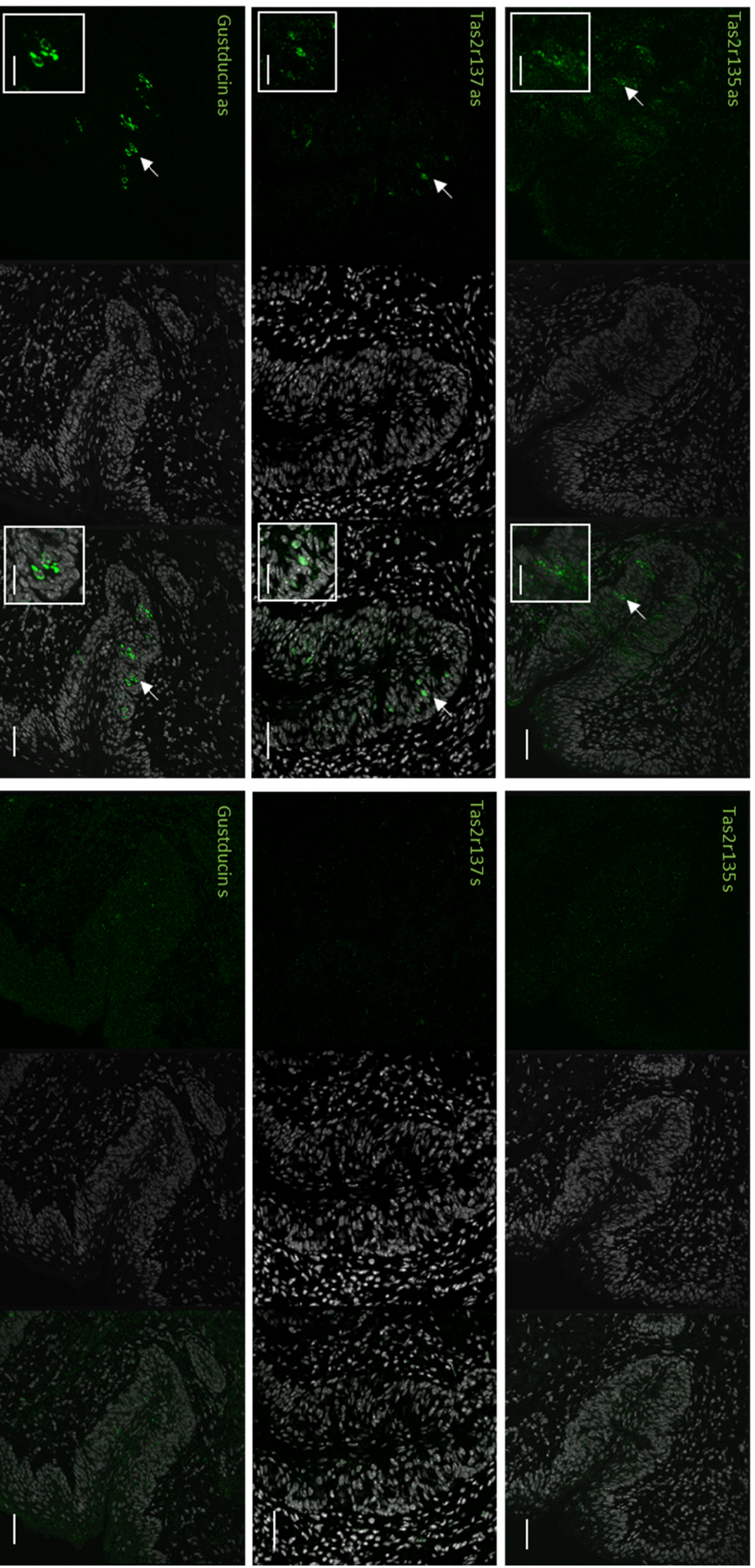


Abbildung 3.16 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung der generierten RNA-Sonden im Zungengewebe der Wallpapille. Alle Antisense-Sonden (as) generierten Signale im Zungengewebe der Wallpapille, bei den Sense-Sonden (s) konnten keine Signale detektiert werden. Die jeweilige Sonde ist in grün dargestellt, die Zellkerne sind durch TOPRO-3-Iodid in grau gezeigt. Maßstab: 40 μ m, Vergrößerung 20 μ m. Die Antisense-Sonden für *Tas2r105*, *Tas2r109*, *Tas2r123*, *Tas2r125*, *Tas2r135*, *Tas2r137* und *Gustducin* führten zu zellulären Signalen in der Wallpapille. Die stärksten Signale konnten durch die as RNA-Sonde für *Gustducin* detektiert werden. Die *Tas2r125*-Sonde ergab die schwächsten Signale. Keine Sense-Sonde zeigte Signale in der Wallpapille.

3.2.2 Visualisierung von Bitterrezeptoren auf zellulärer Ebene im ZNS

Nach dem Testen der RNA-Sonden im Zungengewebe wurde untersucht, ob Bitterrezeptoren in den Gehirnregionen thalamische Region, mediales Mesencephalon und im Cerebellum auf zellulärer Ebene visualisiert werden können. Auf eine Untersuchung des Bitterrezeptors Tas2r125 mittels RNA-Sonde wurde verzichtet, da bereits im Zungengewebe der Wallpapille nur schwache Signale bei Verwendung der Antisense-Sonde detektiert wurden. Die Ergebnisse der FISH-Analysen für die Bitterrezeptoren Tas2r105, Tas2r109, Tas2r123, Tas2r135 und Tas2r137 sowie Gustducin werden nachfolgend dargestellt.

3.2.2.1 *Thalamische Region*

Unter Verwendung der Antisense-Sonden für die Bitterrezeptoren Tas2r105, Tas2r109 und Tas2r123 konnten in der thalamischen Region im Bereich des Thalamus keine Signale detektiert werden (siehe Abb. 3.17A). Schwache zelluläre Signale waren mithilfe der Sonden für Tas2r135, Tas2r137 und Gustducin im Thalamus nachweisbar (siehe Abb. 3.17B).

3.2.2.2 *Mediales Mesencephalon*

Die Ergebnisse der FISH-Analysen im Bereich des medialen Mesencephalons, genauer im ventralen sowie lateralen periaquäduktalen Grau, ähnelten im Wesentlichen denen der thalamischen Region. Für Tas2r105 und Tas2r109 konnten keine Signale und damit auch keine RNA dieser Rezeptor nachgewiesen werden. Dagegen konnten schwache zelluläre Signale für den Tas2r123-, Tas2r135- und Tas2r137-Rezeptor oder für Gustducin detektiert werden. Die Tas2r123-Expression war im Vergleich zur Tas2r135 und Tas2r137 allerdings schwächer und weniger zahlreich (siehe Abb. 3.18A,B).

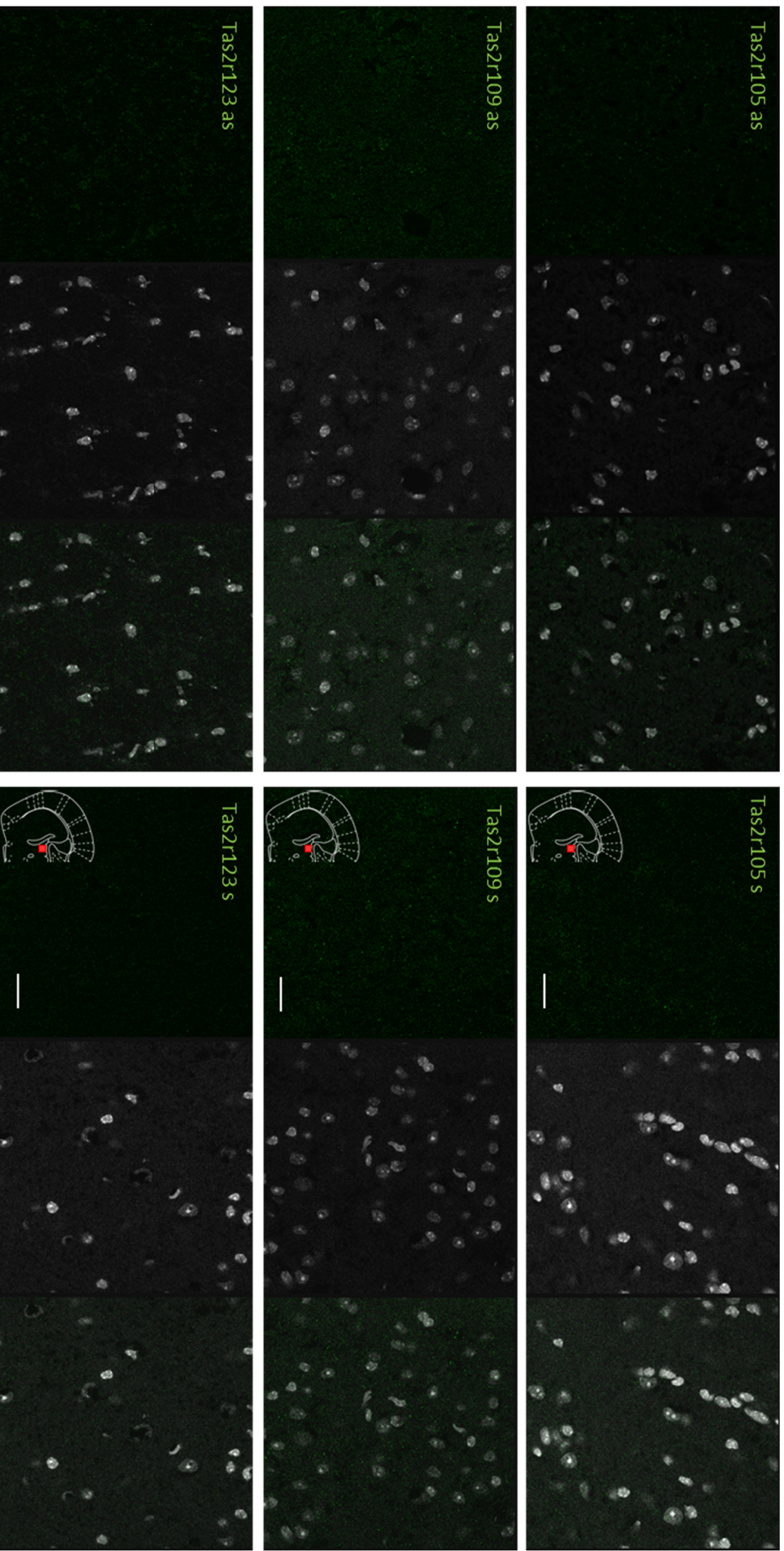


Abbildung 3.17A Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zum Nachweis Tas2r-exprimierender Zellen im Thalamus (rotes Kästchen) des Gehirns. Die jeweilige Sonde ist in grün und Zellkerne sind durch TOPRO-3-Iodid in grau gezeigt. Bregma -1,46 mm, Maßstab 40 µm. Die Ergebnisse der FISH zeigten unter Verwendung der as sowie s RNA-Sonden für Tas2r105, Tas2r109 und Tas2r123 keine Signale im Thalamus von C57Bl/6-Mäusen.

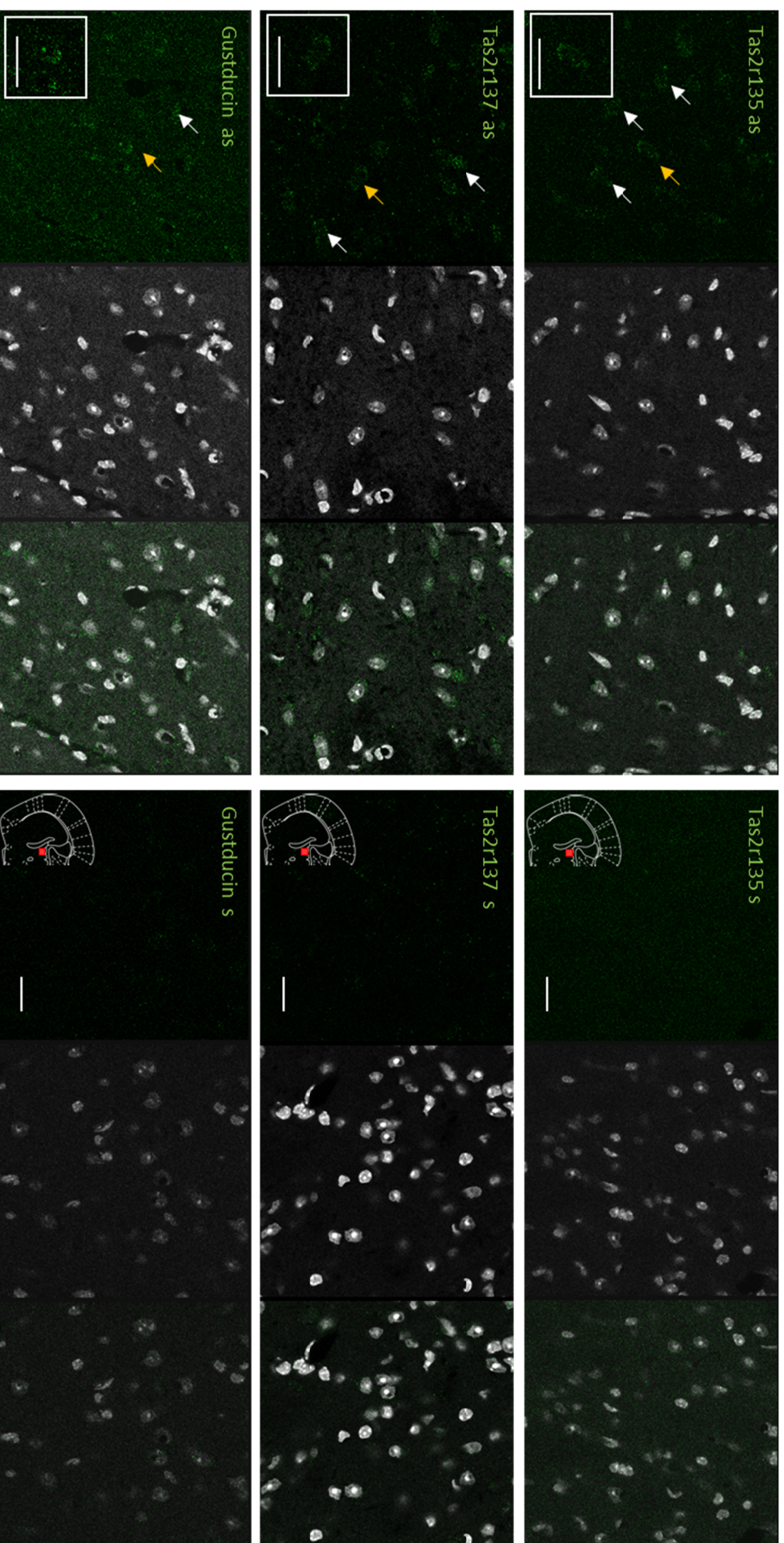


Abbildung 3.17B Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung zum Nachweis Tas2r-exprimierender Zellen im Thalamus (rotes Kästchen) des Gehirns. Die jeweilige Sonde ist in grün und Zellkerne sind durch TOPRO-3-Iodid in grau gezeigt. Bregma -1,46 mm, Maßstab 40 µm. Die Ergebnisse der FISH zeigten unter Verwendung der as RNA-Sonden für Tas2r135, Tas2r137 und Gustducin schwache Signale im Thalamus auf Gehirnschnitten von C57BL/6-Mäusen. Bei Verwendung der s RNA-Sonden konnten keine Signale detektiert werden.

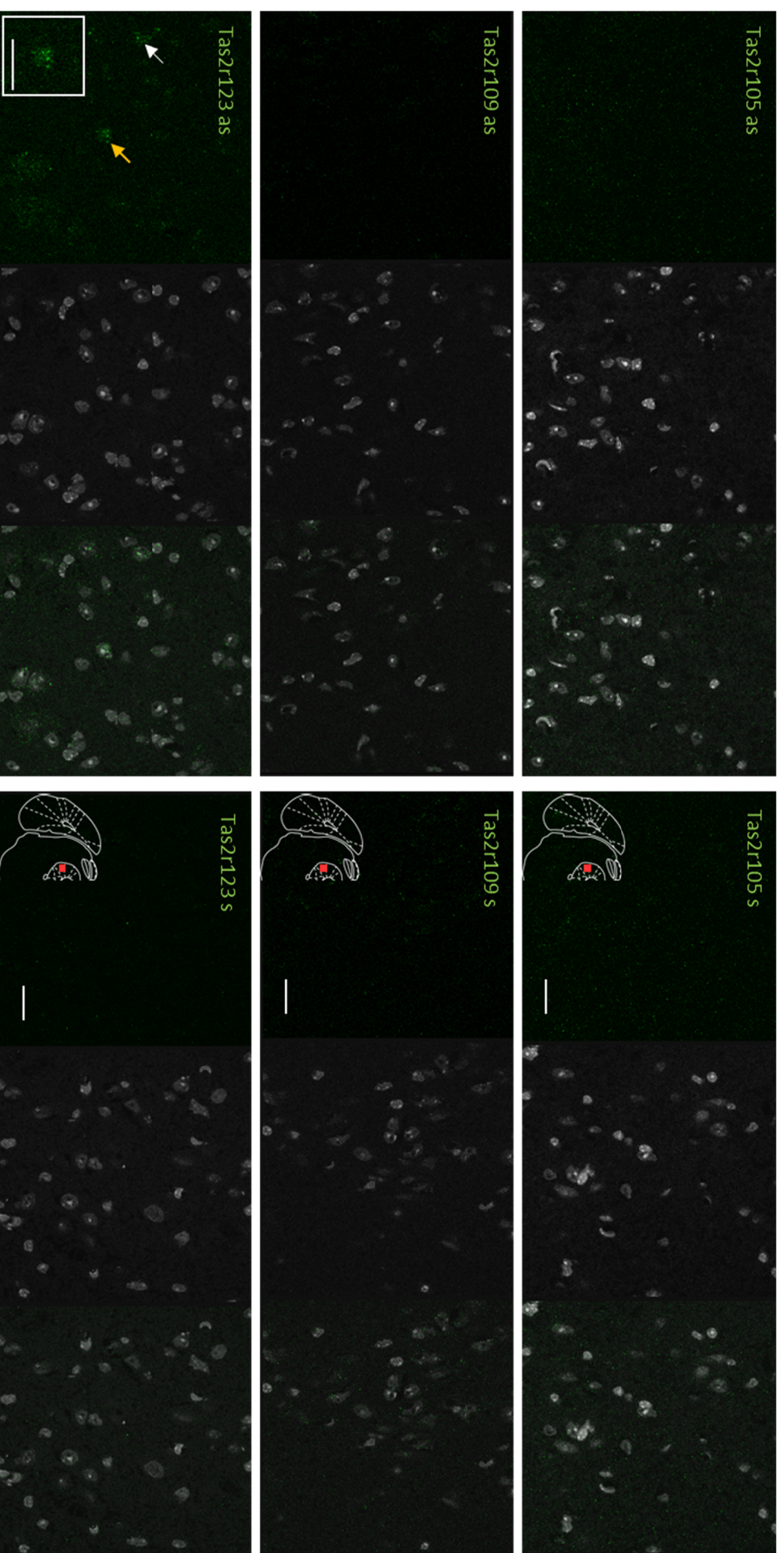


Abbildung 3.18A Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zum Nachweis Tas2r-exprimierender Zellen im periaquäduktalen Grau im medialen Mesencephalon des Gehirns (rotes Kästchen). Die jeweilige Sonde ist in grün und Zellkerne sind durch TOPRO-3-Iodid in grau gezeigt. Der gelbe Pfeil zeigt die Zelle, die in Vergrößerung dargestellt wird, weiße Pfeile zeigen weitere positive Signale. Bregma -4,72 mm, Maßstab 40 µm. Die Ergebnisse der FISH zeigten unter Verwendung der as RNA-Sonden für Tas2r105 und Tas2r109 keine Signale im PAG. Die as RNA-Sonde für Tas2r123 generiert wenige schwache Signale in der Region des PAG im medialen Mesencephalon (Pfeile). Bei Verwendung der s RNA-Sonden der Bitterrezeptoren wurden keine Signale detektiert.

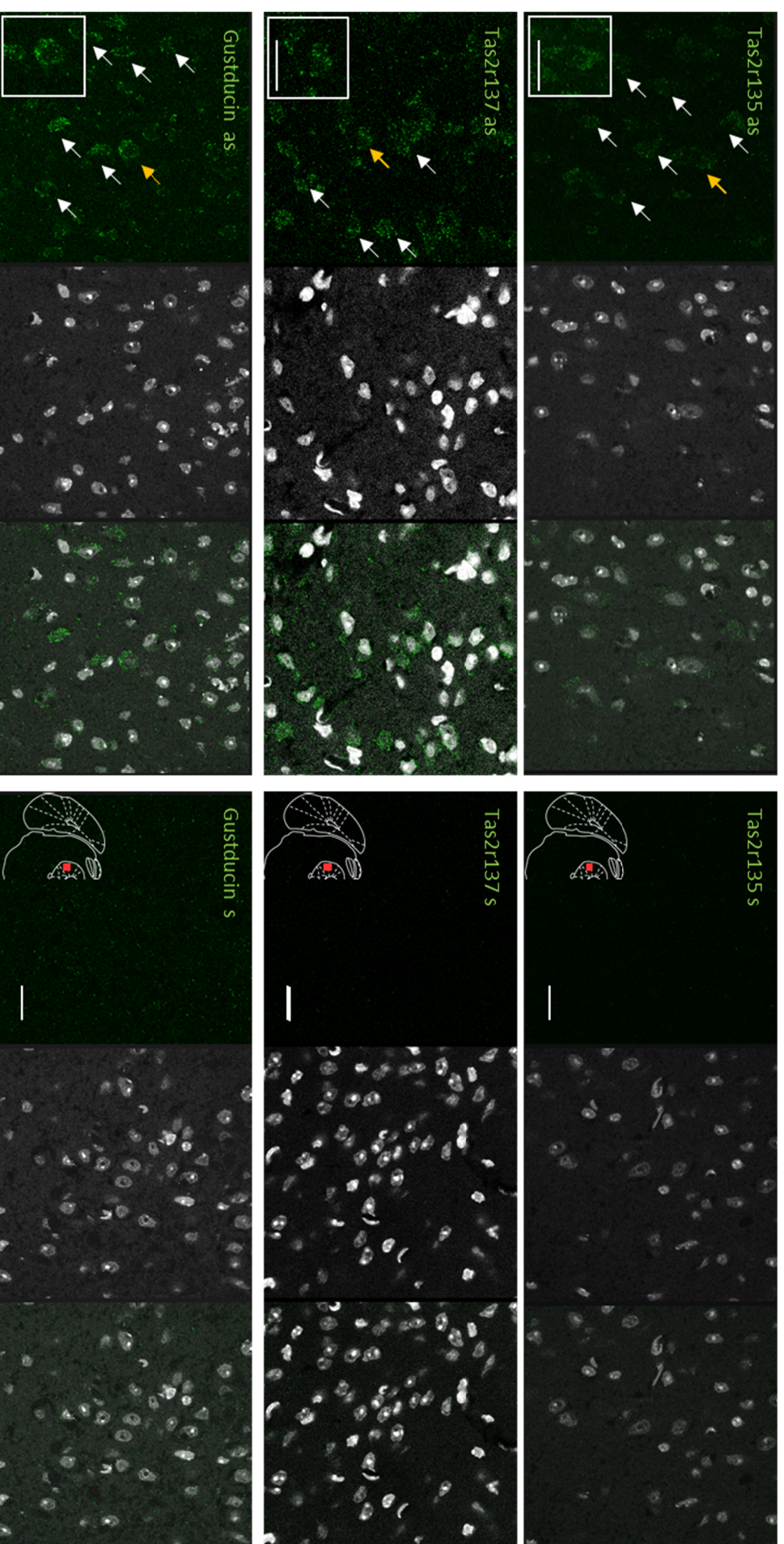


Abbildung 18B Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zum Nachweis **Tas2r-exprimierender Zellen im periaquäduktalen Grau im medialen Mesencephalon des Gehirns (rotes Kästchen)**. Die jeweilige Sonde ist in grün und Zellkerne sind durch TOPRO-3-Iodid in grau gezeigt. Der gelbe Pfeil zeigt die Zelle, die in Vergrößerung dargestellt wird, weiße Pfeile zeigen weitere positive Signale. Bregma -4,72 mm, Maßstab 40 µm. Die as RNA-Sonden für Tas2r135, Tas2r137 und Gustducin generierten Signale in der Region des PAG im medialen Mesencephalon (Pfeile). Bei Verwendung der s RNA-Sonden der Bitterrezeptoren wurden keine Signale detektiert.

3.2.2.3 Cerebellum

Die FISH-Analysen im Cerebellum im *Lobulus ansiformis Crus I* zeigten, dass bei Verwendung der Tas2r105- und Tas2r109-Sonden sowie bei allen Sense-RNA-Sonden keine Signale detektiert werden konnten. Durch Antisense-RNA-Sonden für die Bitterrezeptoren Tas2r135 und Tas2r137 sowie für Gustducin konnten dagegen zelluläre Signale nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.19A). Diese Signale wurden sowohl im *Stratum granulosum* (Körnerzellschicht), im *Stratum purkinjense* (Purkinjzellschicht) sowie wenige im *Stratum moleculare* (Molekularschicht) detektiert. Im Vergleich zu den untersuchten Gehirnregionen thalamische Region und mediales Mesencephalon konnten im Cerebellum stärkere bzw. intensivere Signale der beiden Bitterrezeptoren und Gustducin nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.19B).

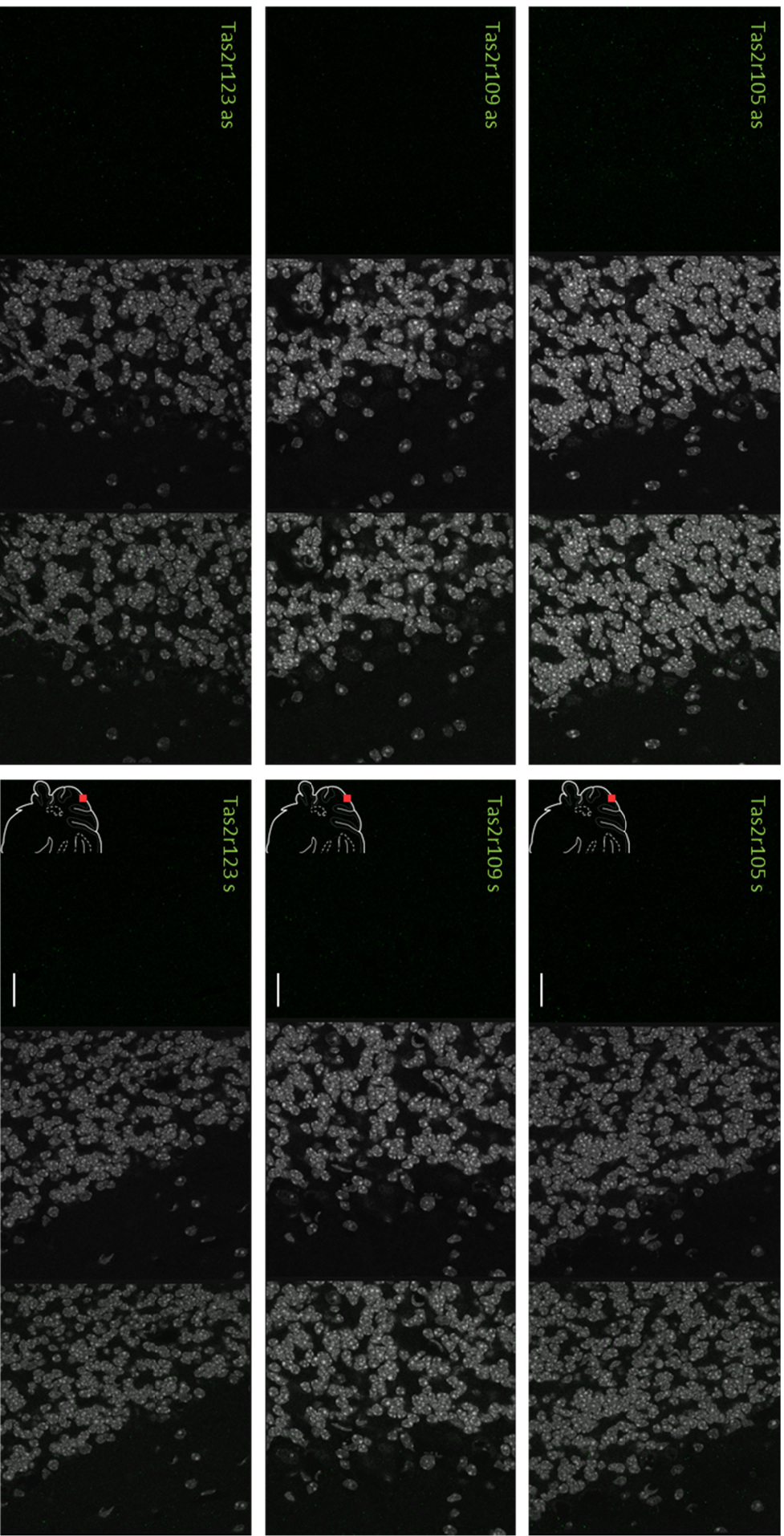


Abbildung 19A Fluoreszenz-*In-situ*-Hybridisierung zum Nachweis Tas2r-exprimierender Zellen im Cerebellum (*Lobulus ansiformis Crus 1*, rotes Kästchen). Die jeweilige Sonde ist in grün und Zellkerne sind durch TOPRO-3-Iodid in grau gezeigt. Bregma -6,00 mm, Maßstab 40 µm. Die Ergebnisse der FISH zeigten unter Verwendung der as sowie s RNA-Sonden für Tas2r105, Tas2r109 und Tas2r123 keine Signale im Cerebellum der untersuchten murinen Gehirnschnitte.

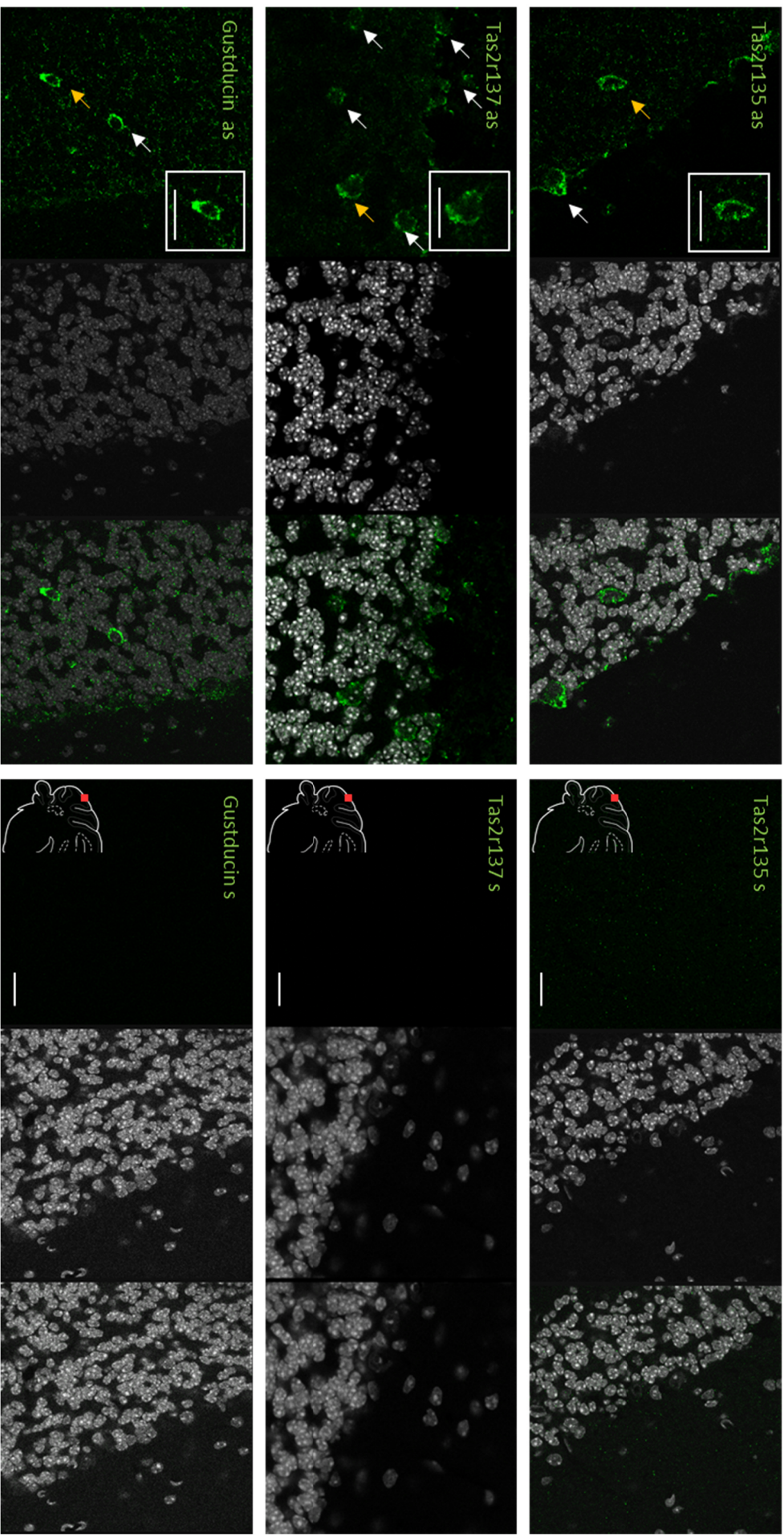


Abbildung 19B Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung zum Nachweis *Tas2r*-exprimierender Zellen im Cerebellum (*Lobulus ansiformis Crux 1*, rotes Kästchen). Die jeweilige Sonde ist in grün und Zellkerne sind durch TOPO-3-lodid in grau gezeigt. Bregma -6,00 mm. Maßstab 40 µm. Der gelbe Pfeil zeigt die Zelle, die in der Vergrößerung dargestellt wird; weiße Pfeile zeigen weitere positive Signale. Die Ergebnisse der FISH zeigten unter Verwendung der *as* RNA-Sonden für *Tas2r135*, *Tas2r137* und *Gustducin* starke zelluläre Signale im *Stratum moleculare* sowie im *Stratum purkinjense* im Cerebellum der untersuchten murinen Gehirnschnitte. Bei Verwendung der *s* RNA-Sonden der Bitterrezeptoren wurden dagegen keine Signale detektiert.

3.3 Identifikation des Zelltyps von Tas2r-exprimierenden Zellen im ZNS

Zur Untersuchung der Identität Bitterrezeptor-exprimierender Zellen wurden immunhistochemische Färbungen mit verschiedenen neuronalen Markern durchgeführt. Dazu wurden exemplarisch die Tas2r131-exprimierenden Neurone untersucht. Hierfür wurden Gefrierschnitte von Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+tauGFP}-Mausgehirnen verwendet. Tas2r131/tauGFP-exprimierende Neurone (Tas2r131/tauGFP-Neurone) wurden dabei stets durch ein GFP-Antiserum visualisiert. In Kombination mit den neuronalen Markern für cholinerge, dopaminerge, GABAerge, glutamaterge, glycinerg-angesteuerte, noradrenerge, Enkephalin-positive und serotonerge Neurone sowie Interneurone wurden Kolokalisationsstudien durchgeführt.

Nach den immunhistochemischen Färbungen wurden mittels des Fluoreszenzmikroskopsaufnahmen erstellt und diese ausgewertet.

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Kolokalisationsstudien mit neuronalen Markern einzeln dargestellt. Es werden jeweils die Ergebnisse aus den drei Gehirnregionen thalamische Region (Thal.), mediales Mesencephalon im Bereich des periaquäduktalen Graus (PAG) und Cerebellum (Cer.) vorgestellt. In einigen Fällen wird eine weitere Gehirnregion gezeigt, wenn der entsprechende neuronale Marker in diesen drei Regionen nicht exprimiert wird bzw. eine Kolokalisation in einer anderen Region nachgewiesen werden konnte.

3.3.1 Visualisierung von Tas2r131/tauGFP-exprimierenden und cholinergen Neuronen

Cholinerge Neurone nutzen zur Übertragung erregender Signale den Neurotransmitter Acetylcholin. Neben Aufgaben an der motorischen Endplatte der quergestreiften Muskulatur in der Peripherie erfüllen cholinerge Neurone wichtige Aufgaben im vegetativen und zentralen Nervensystem. Zur Validierung einer Kolokalisation von Tas2r131/tauGFP- mit cholinergen Neuronen wurde die folgende Studie durchgeführt. Als Marker für cholinerge Neurone wurde ein Antiserum gegen die Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT) genutzt. Diese Transferase katalysiert die Bildung von Acetylcholin aus Acetyl-Coenzym A und Cholin.

Es wurden insgesamt 52 Gehirnschnitte von vier Tieren auf eine Kolokalisation von cholinergen und Tas2r131/tauGFP-Neuronen untersucht. Die Ergebnisse dieser immunhistochemischen Färbungen zeigten dabei viele Überlappungen von Tas2r131/tauGFP mit ChAT sowohl im Thalamus als auch im ventralen Teil des PAG im medialen Mesencephalon (siehe Abb. 3.21, Pfeile). Eine komplette Kolokalisation lag allerdings nicht vor.

Im Cerebellum hingegen konnte keine Kolokalisation nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.20), vermutlich aufgrund der Tatsache, dass cholinerge Neurone selten im Cerebellum, sondern vorwiegend im Vorderhirn vorkommen.

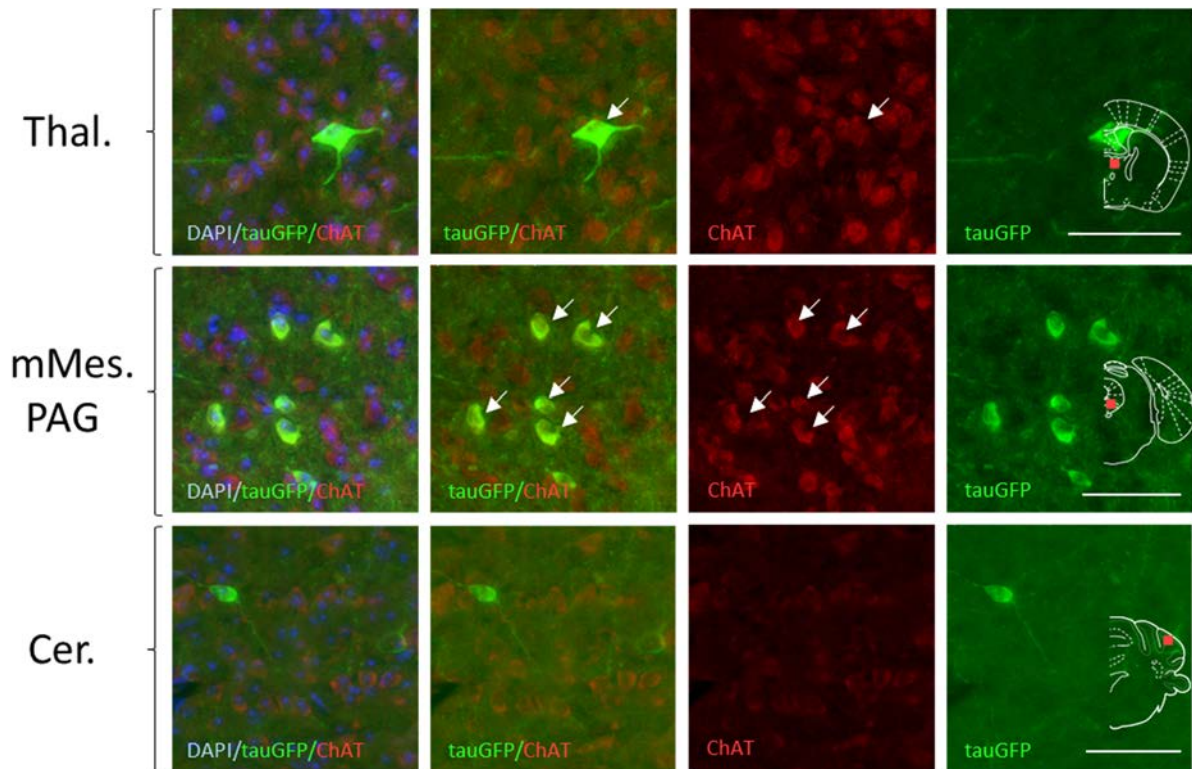


Abbildung 3.20 Visualisierung Tas2r131/tauGFP-exprimierender und cholinergen Neurone. Immunhistochemische Färbungen von Tas2r131/tauGFP-Neuronen mittels GFP-Antiserum und cholinergen Neuronen durch ein Antiserum gegen die Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT). Dargestellt sind Färbungen im Bereich des Thalamus (Thal., Bregma -1,46 mm), im ventralen Teil des PAG im medialen Mesencephalons (PAG, Bregma -4,72 mm) sowie im Cerebellum (Cer., Bregma -6,00 mm). Zellkerne sind durch DAPI gefärbt. Die Ergebnisse der IHC-Färbungen zeigten viele Überlappungen von Tas2r131/tauGFP mit ChAT im Thalamus und im PAG. Eine komplette Kolokalisation konnte indes nicht gezeigt werden (siehe mMes). Im Cerebellum konnte keine Kolokalisation von Tas2r131/tauGFP mit ChAT detektiert werden. Maßstab 50 µm.

3.3.2 Visualisierung von Tas2r131/tauGFP-exprimierenden und dopaminergen Neuronen

Dopamin, ein biogenes Amin aus der Gruppe der Katecholamine, stellt einen wichtigen Bestandteil in der Antriebssteigerung und Motivation durch neuronale Modulation dar. Dopaminerge Neuronenpopulationen befinden sich vorwiegend in der Substantia nigra und der *Area tegmentalis ventralis* des Mittelhirns. Für die Untersuchung, ob Tas2r131/tauGFP-Neurone ebenfalls dopaminerg sind, wurden die nachfolgenden Kolokalisationsstudien durchgeführt. Als Marker für dopaminerge Neurone diente ein Antiserum gegen die Tyrosinhydroxylase. Die Tyrosinhydroxylase wandelt L-Tyrosin zu Levodopa um, eine Vorstufe für die Biosynthese von Dopamin.

Es wurden insgesamt 48 Gehirnschnitte von drei Tieren auf eine Kolokalisation von Tas2r131/tauGFP und der Tyrosinhydroxylase untersucht. Die Ergebnisse dieser Analysen zeigten wenige Kolokalisationen im Bereich des ventralen PAG im medialen Mesencephalon (siehe Abb. 3.21, Pfeile). In der thalamischen Region sowie im Cerebellum dagegen konnte solch eine Kolokalisation nicht nachgewiesen werden, da in diesen Bereichen keine dopaminergen Neurone vorkommen (siehe Abb. 3.21).

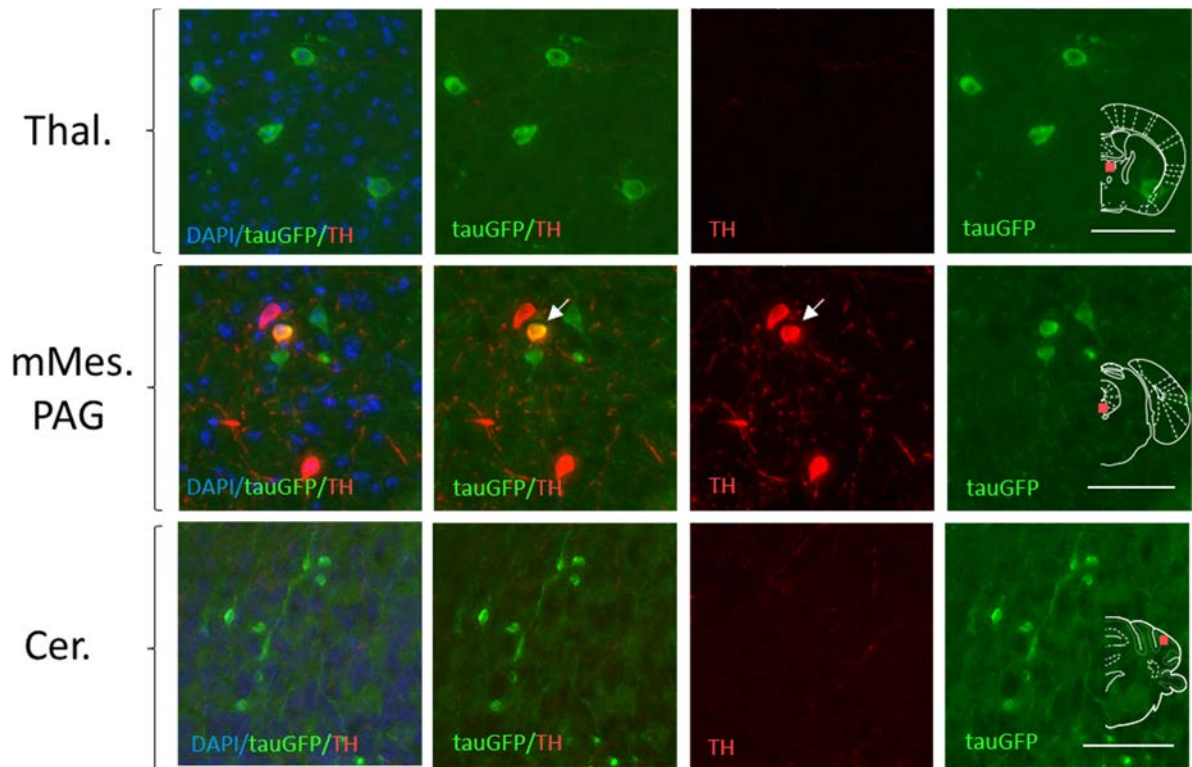


Abbildung 3.21 Visualisierung Tas2r131/tauGFP-exprimierender und dopaminergen Neuronen. Immunhistochemische Färbungen von Tas2r131/tauGFP-Neuronen mittels GFP-Antiserum und dopaminergen Neuronen durch ein Antiserum gegen die Tyrosinhydroxylase. Dargestellt sind Färbungen im Bereich der thalamischen Region, Thalamus (Thal., Bregma -1,46 mm), im ventralen PAG des medialen Mesencephalons (PAG, Bregma -4,72 mm) sowie im Cerebellum (Cer., Bregma -6,00 mm). Zellkerne sind durch DAPI gefärbt. Die IHC-Färbungen zeigten einen geringen Grad der Überlappung der Tyrosinhydroxylase und Tas2r131/tauGFP im ventralen PAG. In der thalamischen Region sowie im Cerebellum konnten keine Kolokalisierungen detektiert werden, da in diesen Bereichen dopaminerge Neurone nicht vorkommen. Untersucht wurden insgesamt 48 Gehirnschnitte von drei Tieren. Maßstab 50 μ m.

3.3.3 Visualisierung von Tas2r131/tauGFP-exprimierenden und GABAergen Neuronen

GABAerge Neurone sind im Gehirn und im Rückenmark weit verbreitet und stellen eine der wichtigsten inhibitorischen Neuronenpopulationen dar. Zur Analyse, ob Tas2r131/tauGFP-Neurone ebenfalls GABAerge Neurone sind, wurden die folgenden Kolokalisationsstudien durchgeführt. Dabei wurde als Marker für GABAerge Neurone ein Antiserum gegen die Glutamat-Decarboxylase-Isoform 67 verwendet.

Es wurden insgesamt 56 Gehirnschnitte von vier Tieren untersucht. Die Ergebnisse der IHC-Färbungen zeigten im *Stratum granulosum* des Cerebellums einige Überlappungen von Tas2r131/tauGFP- und GABAergen Neuronen. Wie bei den cholinergen Neuronen konnte auch hier keine komplette Kolokalisation nachgewiesen werden. In der thalamischen Region, dem piriformen Cortex sowie im medialen Mesencephalon konnte dagegen keine Kolokalisation von Tas2r131/tauGFP- und GABAergen Neuronen detektiert werden (siehe Abb. 3.22).

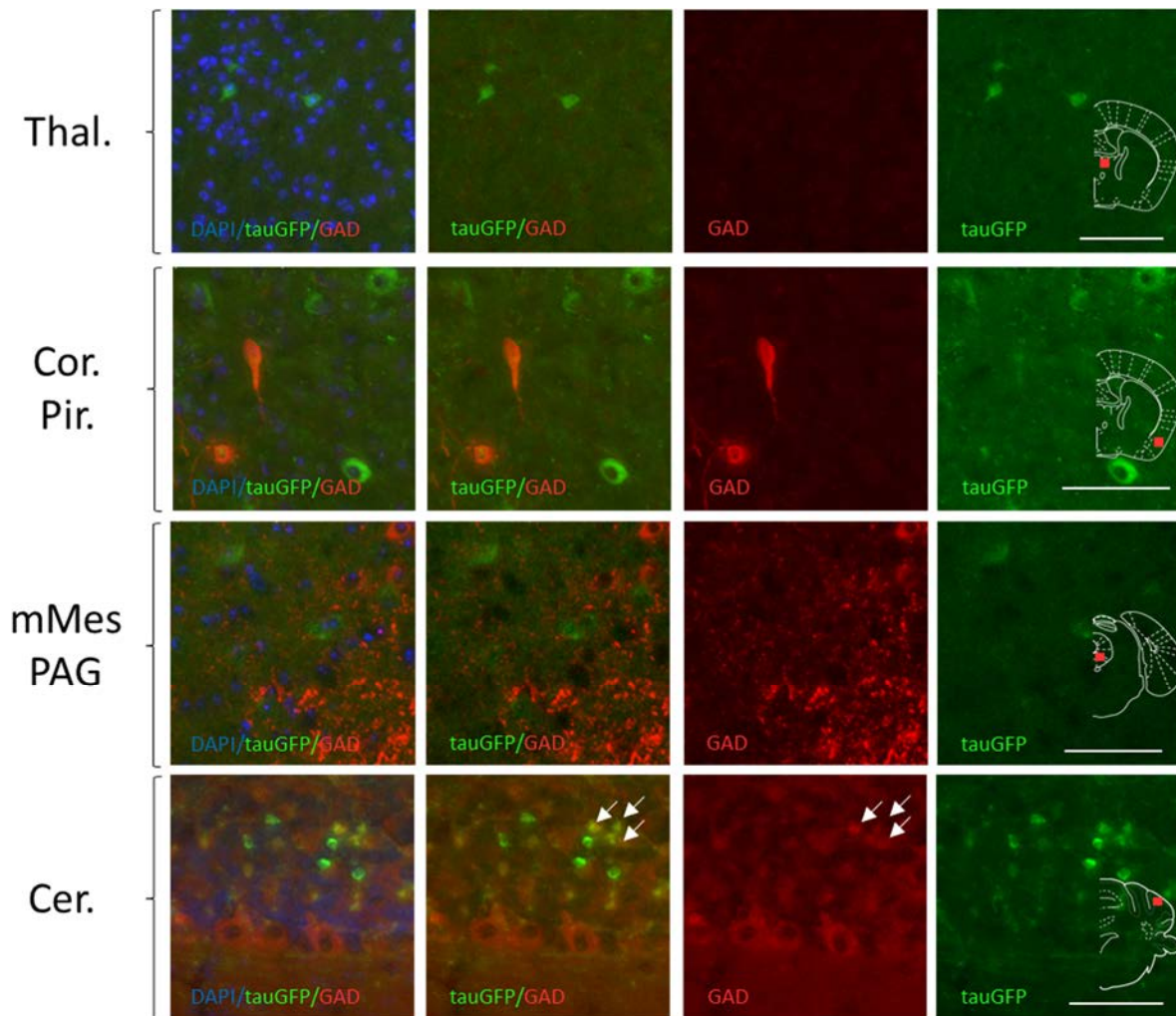


Abbildung 3.22 Visualisierung Tas2r131/tauGFP-exprimierender und GABAerger Neurone. Immunhistochemische Färbungen von Tas2r131/tauGFP-Neuronen mittels GFP-Antiserum und GABAergen Neuronen durch ein Antiserum gegen die Glutamat-Decarboxylase Isoform 67 (GAD). Dargestellt sind Färbungen im Bereich der thalamischen Region (Thal., Bregma -1,46 mm), im piriformen Cortex (Cor. Pir., Bregma -1,46 mm) im PAG im medialen Mesencephalon (PAG, Bregma -4,72 mm) sowie im Cerebellum (Cer., Bregma -6,00 mm). Zellkerne sind durch DAPI gefärbt. Maßstab 50 µm. Die IHC-Färbungen zeigten einen mittleren bis hohen Grad der Überlappung von GAD67 und Tas2r131/tauGFP im *Stratum moleculare* des Cerebellums. In der thalamischen Region, im piriformen Cortex sowie im medialen Mesencephalon wurde keine Kolokalisation detektiert. Untersucht wurden insgesamt 56 Gehirnschnitte von vier Tieren.

3.3.4 Visualisierung von Tas2r131/tauGFP-exprimierenden mit glutamatergen Neuronen

Als der wohl wichtigste erregende Transmitter des zentralen Nervensystems der Wirbeltiere gilt die Aminosäure Glutamat. Glutamaterge Neurone sind in allen Regionen des Gehirns weit verbreitet. Es wurden daher Kolokalisationsstudien durchgeführt, um zu testen, ob Tas2r131/tauGFP-Zellen auch glutamaterge Neurone sind. Als Marker für glutamaterge Neurone wurden zwei Antiseren gegen die vesikulären Glutamattransporter 1 und 2 (VGLUT1, VGLUT2) verwendet.

Es wurden insgesamt 48 Gehirnschnitte für VGLUT1 und 32 Gehirnschnitte für VGLUT2 in drei Tieren untersucht. Die vesikuläre Färbung der beiden Glutamattransporter 1 und 2 erstreckte sich über weite Teile des gesamten zentralen Nervensystems. Die Visualisierung und Detektion einzelner Zellen war allerdings nur schwer möglich. Über eine Kolokalisation von Tas2r131/tauGFP mit den vesikulären Glutamattransportern kann daher keine Aussage getroffen werden. Allerdings konnte

beobachtet werden, dass Tas2r131/tauGFP-Zellen vorwiegend in nicht gefärbten Bereichen von VGLUT1 und VGLUT2 liegen (siehe Abb. 3.23, Abb. 3.24). Zudem liegen vesikuläre Glutamatransporter vorwiegend in der Präsynapse vor. Folglich könnte dies darauf hindeuten, dass Tas2r131/tauGFP-Zellen wenige Informationen von glutamatergen Neuronen bekommen.

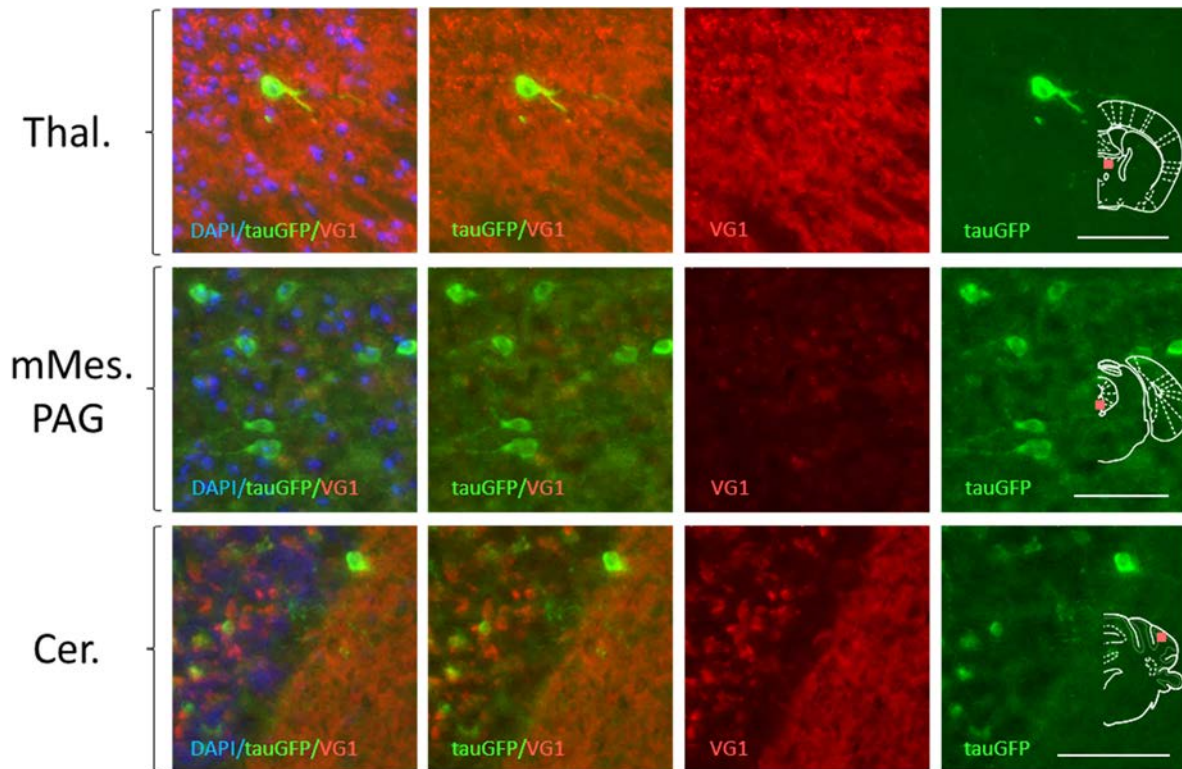


Abbildung 3.23 Visualisierung Tas2r131/tauGFP-exprimierender sowie glutamaterger Neurone durch VG1. Immunhistochemische Färbungen von Tas2r131/tauGFP-Neuronen mittels GFP-Antiserum und glutamatergen Neuronen durch ein Antiserum gegen den vesikulären Glutamatransporter 1 (VG1). Dargestellt sind Färbungen im Bereich des Thalamus (Thal., Bregma -1,46 mm), im ventralen PAG des medialen Mesencephalons (PAG, Bregma -4,72 mm) sowie im Cerebellum (Cer., Bregma -6,00 mm). Zellkerne sind durch DAPI gefärbt. Maßstab 50 μ m. Aufgrund der weiten Verbreitung glutamaterger Neurone im ZNS sowie der vesikulären Färbung durch VG1 können keine Aussagen über eine mögliche Kollokalisation von Tas2r131/tauGFP und dem vesikulären Glutamatransporter 1 getroffen werden. Es scheint allerdings, dass Tas2r131/tauGFP-Neurone vorwiegend in Bereichen liegen, die nicht durch VG1 angefärbt sind (siehe Thal.; *Stratum purkinjense* des Cerebellums). Dies könnte darauf hindeuten, dass Tas2r131/tauGFP-Neurone nur wenige Informationen von glutamatergen Neuronen bekommen. Untersucht wurden insgesamt 48 Schnitte von drei Tieren.

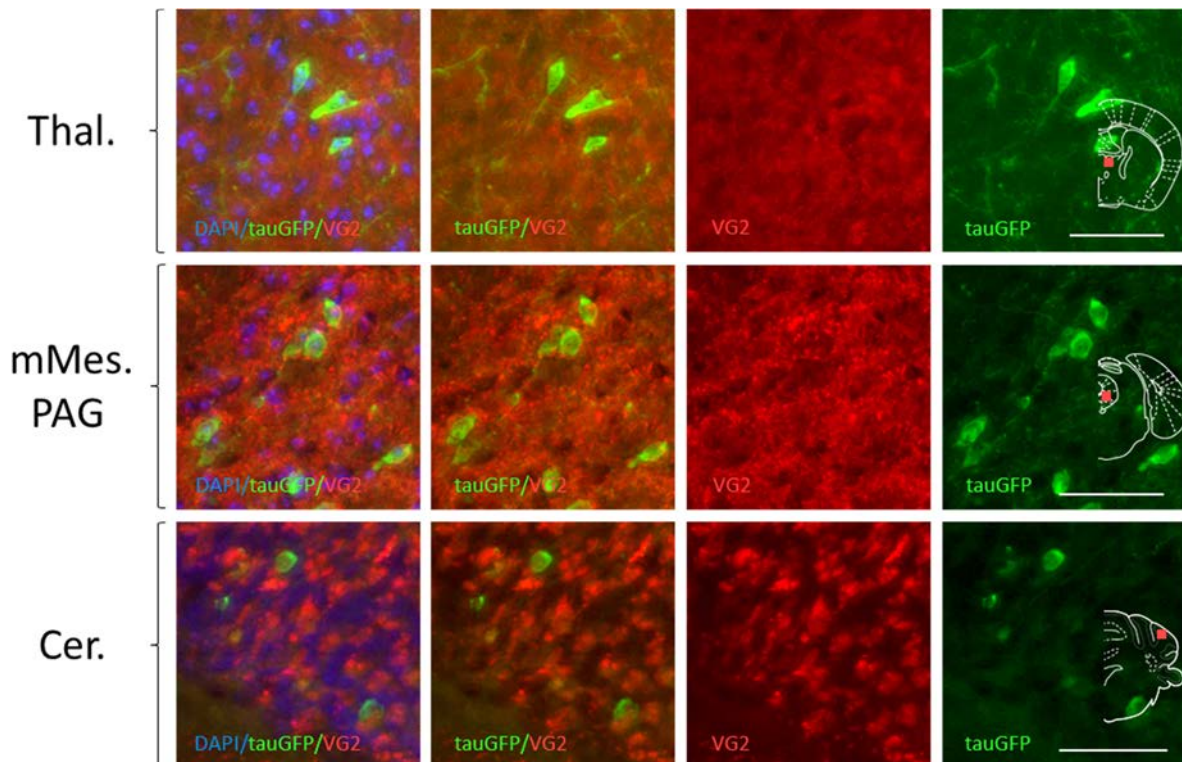


Abbildung 3.24 Visualisierung Tas2r131/tauGFP-exprimierender sowie glutamaterger Neurone durch VG2. Immunhistochemische Färbungen von Tas2r131/tauGFP-Neuronen mittels GFP-Antiserum und glutamatergen Neuronen durch ein Antiserum gegen den vesikulären Glutamatttransporter 2 (VG2). Dargestellt sind Färbungen im Bereich des Thalamus (Thal., Bregma -1,46 mm), im PAG des medialen Mesencephalons (PAG, Bregma -4,72 mm) sowie im Cerebellum (Cer., Bregma -6,00 mm). Zellkerne sind durch DAPI gefärbt. Aufgrund der weiten Verbreitung glutamaterger Neurone im ZNS sowie der vesikulären Färbung durch VG2 können keine Aussagen über eine mögliche Kolokalisation von Tas2r131/tauGFP und dem vesikulären Glutamatttransporter 2 getroffen werden. Es scheint allerdings, dass Tas2r131/tauGFP vorwiegend in Bereichen liegen, die nicht durch VG2 angefärbt sind (siehe Thal.; *Stratum purkinjense* des Cerebellums). Dies könnte darauf hindeuten, dass Tas2r131/tauGFP-Neurone nur wenige Informationen von glutamatergen Neuronen bekommen. Untersucht wurden insgesamt 32 Schnitte von drei Tieren. Maßstab 50 µm.

3.3.5 Visualisierung von Tas2r131/tauGFP-exprimierenden und glycinerg-angesteuerten Neuronen

Im zentralen Nervensystem wirkt Glycin über Glycinrezeptoren als inhibitorischer Neurotransmitter. Glycinerge Neurone befinden sich vorwiegend im Pons, der Medulla oblongata und im Mesencephalon. Für die Analyse einer Kolokalisation von Tas2r131/tauGFP und glycinerg-angesteuerte Neurone wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Als Marker für glycinerg-angesteuerte Neurone wurde ein Antiserum gegen die Glycinrezeptor-Untereinheiten $\alpha 1+2$ verwendet.

Es wurden 48 Gehirnschnitte von vier Tieren untersucht. Die Ergebnisse zeigten wenige Überlappungen von Tas2r131/tauGFP und den Glycinrezeptor-Untereinheiten $\alpha 1+2$ im Bereich des PAG sowie im *Nucleus reticularis* des Pons. In der thalamischen Region konnten keine glycinerg-angesteuerte Neurone detektiert werden, sodass dort keine Kolokalisation vorliegen kann. Im Cerebellum konnten trotz Vorkommen von glycinerg-angesteuerten Neuronen keine Überlappungen mit Tas2r131/tauGFP nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.25).

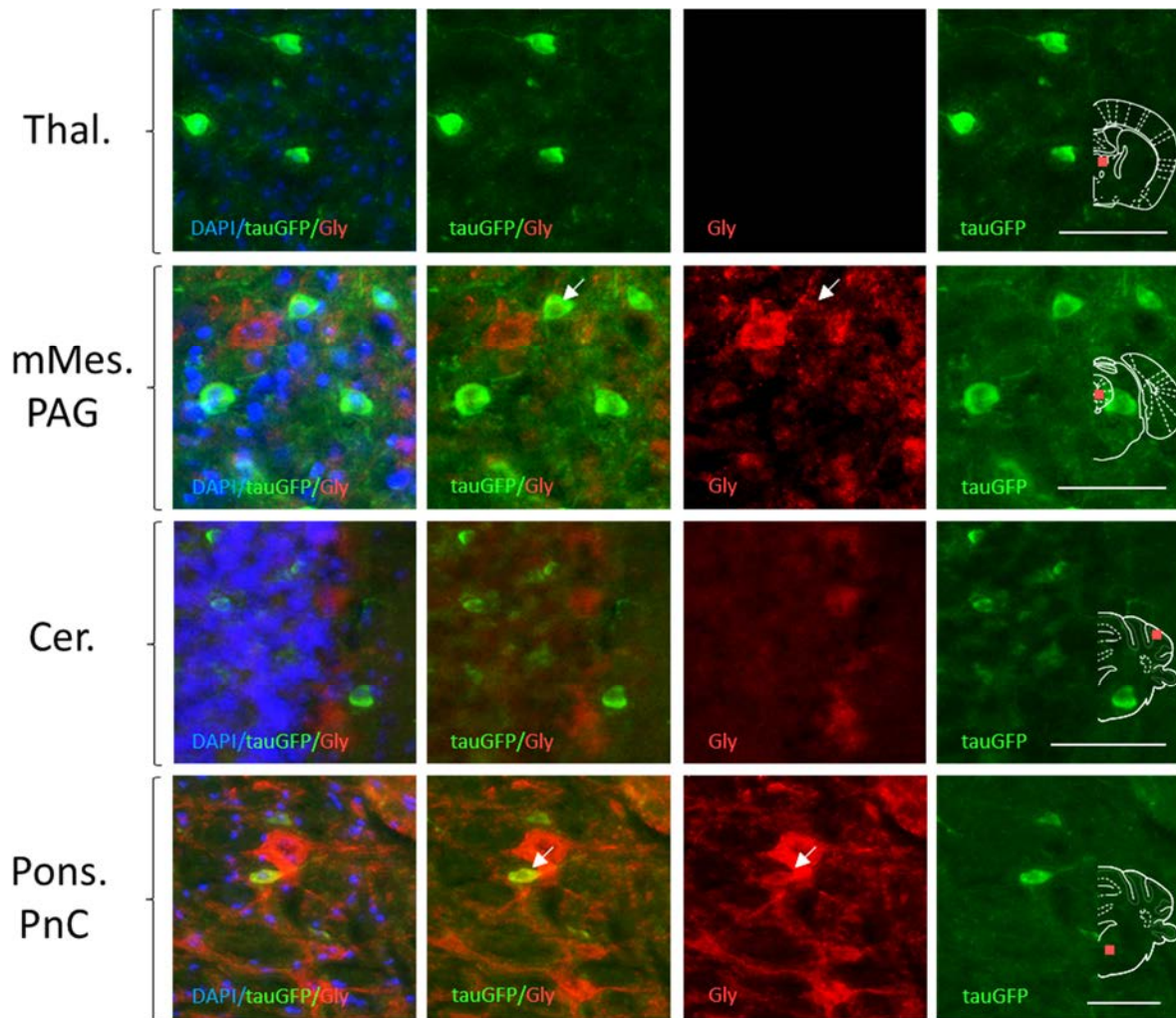


Abbildung 3.25 Visualisierung Tas2r131/tauGFP-exprimierender und glycinerg-angesteuerter Neurone. Immunhistochemische Färbungen von Tas2r131/tauGFP-Neuronen mittels GFP-Antiserum und glycinerg-angesteuerte Neurone durch ein Antiserum gegen den Glycinrezeptor-Untereinheiten $\alpha 1+2$ (Gly). Dargestellt sind Färbungen im Thalamus (Thal., Bregma -1,46 mm), im PAG des medialen Mesencephalons (PAG, Bregma -4,72 mm) im Cerebellum (Cer., Bregma -6,00 mm) sowie im *Nucleus reticularis* des Pons (PnC, Bregma -6,00 mm). Zellkerne sind durch DAPI angefärbt. Die IHC-Färbungen zeigten einen geringen Grad der Überlappung von Tas2r131/tauGFP und Glycinrezeptor-Untereinheiten $\alpha 1+2$ im ventralen PAG des Mesencephalons sowie im *Nucleus reticularis* des Pons. In der thalamischen Region konnten keine glycinerg-angesteuerte Neurone und damit keine Kolokalisation mit Tas2r131/tauGFP-Zellen nachgewiesen werden. Im Cerebellum konnte ebenfalls keine Überlappungen von den wenigen Glycinrezeptor-Untereinheiten $\alpha 1+2$ positiven Signalen mit Tas2r131/tauGFP detektiert werden. Untersucht wurden insgesamt 48 Gehirnschnitte von vier Tieren. Maßstab 50 μm .

3.3.6 Visualisierung von Tas2r131/tauGFP-exprimierenden und noradrenergen Neuronen

Noradrenalin, ein weiteres biogenes Amin, das als Neurotransmitter fungiert, besitzt eine große Bedeutung innerhalb des sympathischen Nervensystems. Insbesondere bei Angst- bzw. Fluchtreaktionen wirkt Noradrenalin als Koordinator in der Peripherie. Noradrenerge Neurone kommen vorwiegend im Pons und in der *Formatio reticularis* vor, ihre Axone reichen allerdings bis in den Thalamus und den Cortex. Für die Untersuchung, ob Tas2r131/tauGFP-Neurone gleichzeitig noradrenerge Neurone sind, wurden die nachfolgenden Kolokalisationsstudien durchgeführt. Als Marker für noradrenerge Neurone wurde ein Antiserum gegen die Dopamin- β -Hydroxylase (D β H) verwendet. Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von Dopamin zu Noradrenalin.

Es wurden insgesamt 108 Gehirnschnitte von vier Tieren untersucht. Die Ergebnisse der IHC-Färbungen zeigten wenige Überlappungen von Tas2r131/tauGFP und D β H im Bereich des *Nucleus raphe dorsalis* sowie im *Nucleus tegmentalis dorsolateralis*. In der thalamischen Region konnten keine noradrenergen Neurone detektiert und somit keine Kolokalisation mit Tas2r131/tauGFP gezeigt werden. Im Cerebellum konnten nur Nervenfasern noradrenerger Neurone visualisiert werden, sodass auch hier eine solche Kolokalisation nicht nachweisbar war (siehe Abb. 3.26).

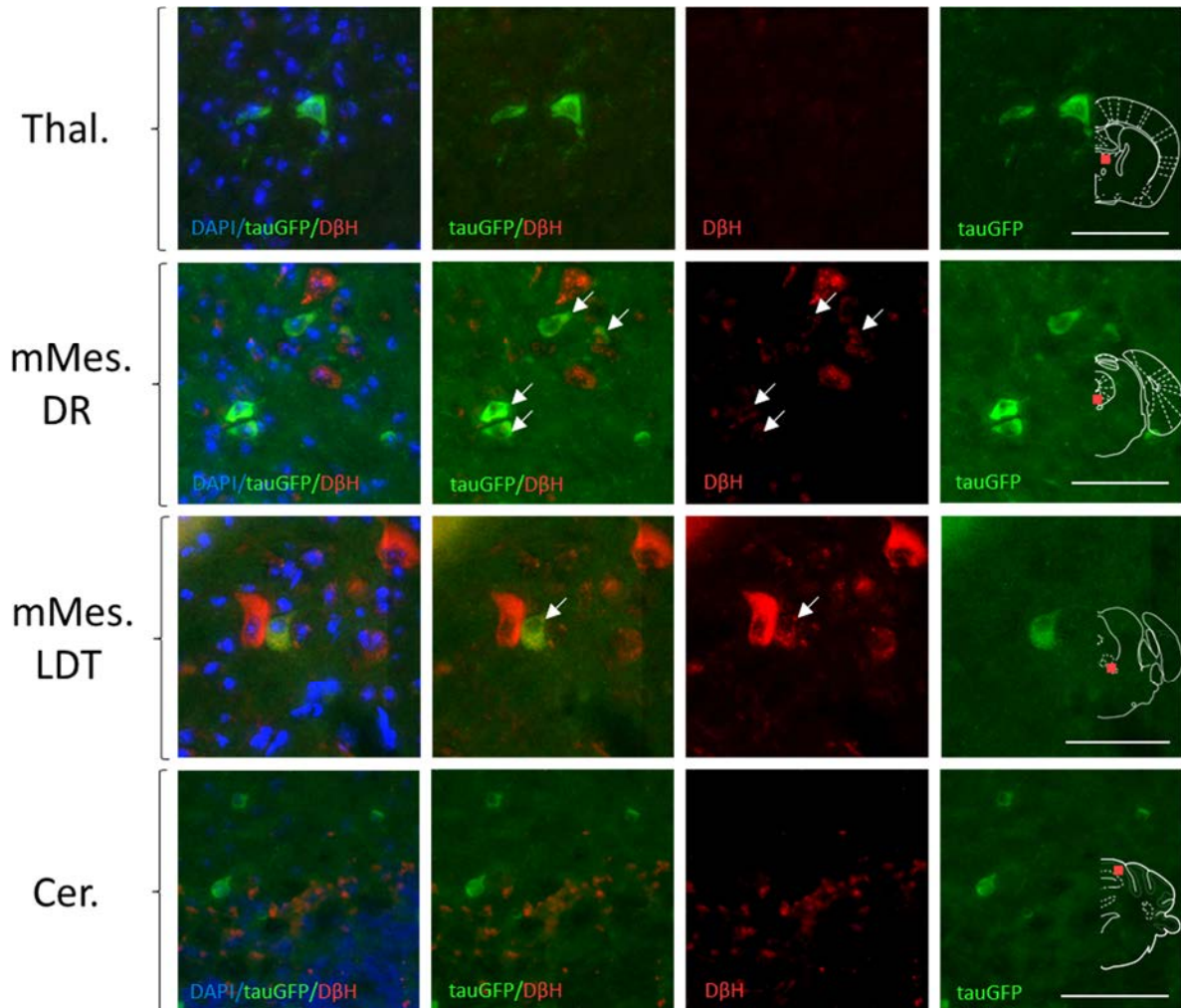


Abbildung 3.26 Visualisierung Tas2r131/tauGFP-exprimierender und noradrenerger Neurone. Immunhistochemische Färbungen von Tas2r131/tauGFP-Neuronen mittels GFP-Antiserum und noradrenergen Neuronen durch ein Antiserum gegen die Dopamin- β -Hydroxylase (D β H). Dargestellt sind Färbungen im Bereich der thalamischen Region (Thal., Bregma -1,46 mm), im *Nucleus raphe dorsalis* (DR, Bregma -4,72 mm) und im *Nucleus tegmentalis dorsolateralis* (LDT, Bregma -5,02 mm) des medialen Mesencephalons sowie im Cerebellum (Cer., Bregma -6,00 mm). Zellkerne sind durch DAPI gefärbt. Die IHC-Färbungen zeigten einen geringen Grad der Überlappung von D β H und Tas2r131/tauGFP im *Nucleus raphe dorsalis* und im *Nucleus tegmentalis dorsolateralis* des medialen Mesencephalons. In der thalamischen Region konnten keine noradrenergen Neurone und damit keine Kolokalisation von D β H mit Tas2r131/tauGFP nachgewiesen werden. Im Cerebellum konnten zwar Nervenfasern noradrenerger Neurone, allerdings keine Überlappungen von D β H mit Tas2r131/tauGFP detektiert werden. Untersucht wurden insgesamt 108 Gehirnschnitte von vier Tieren. Maßstab 50 μ m.

3.3.7 Visualisierung von Tas2r131/tauGFP-exprimierenden und Enkephalin positiven Neuronen

Enkephalin, ein endogenes Opioidpeptid, bindet an verschiedene Arten von Opioidrezeptoren im peripheren und zentralen Nervensystem und fungiert so als Schmerzmodulator bzw. als Analgetikum. Eine hohe Dichte an Opioidrezeptoren findet sich in Bereichen des Thalamus. Zur Analyse einer möglichen Kolo­kalisation von Tas2r131/tauGFP- und Enkephalin-positiven Neurone wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Als Marker für Enkephalin-positive Neurone wurde ein met-Enkephalin-Antiserum verwendet.

Es wurden insgesamt 24 Gehirnschnitte von drei Tieren mittels IHC-Färbungen untersucht. Die Ergebnisse dieser Studien zeigten, dass Tas2r131/tauGFP und met-Enkephalin nicht kolokalisiert sind. In keinem der hier dargestellten Bereiche, der thalamischen Region, dem *Nucleus raphe dorsalis* des medialen Mesencephalons sowie im Cerebellum (siehe Abb.3.27) oder in anderen Gehirnregionen konnte eine Kolo­kalisation von Tas2r131/tauGFP und Enkephalin nachgewiesen werden.

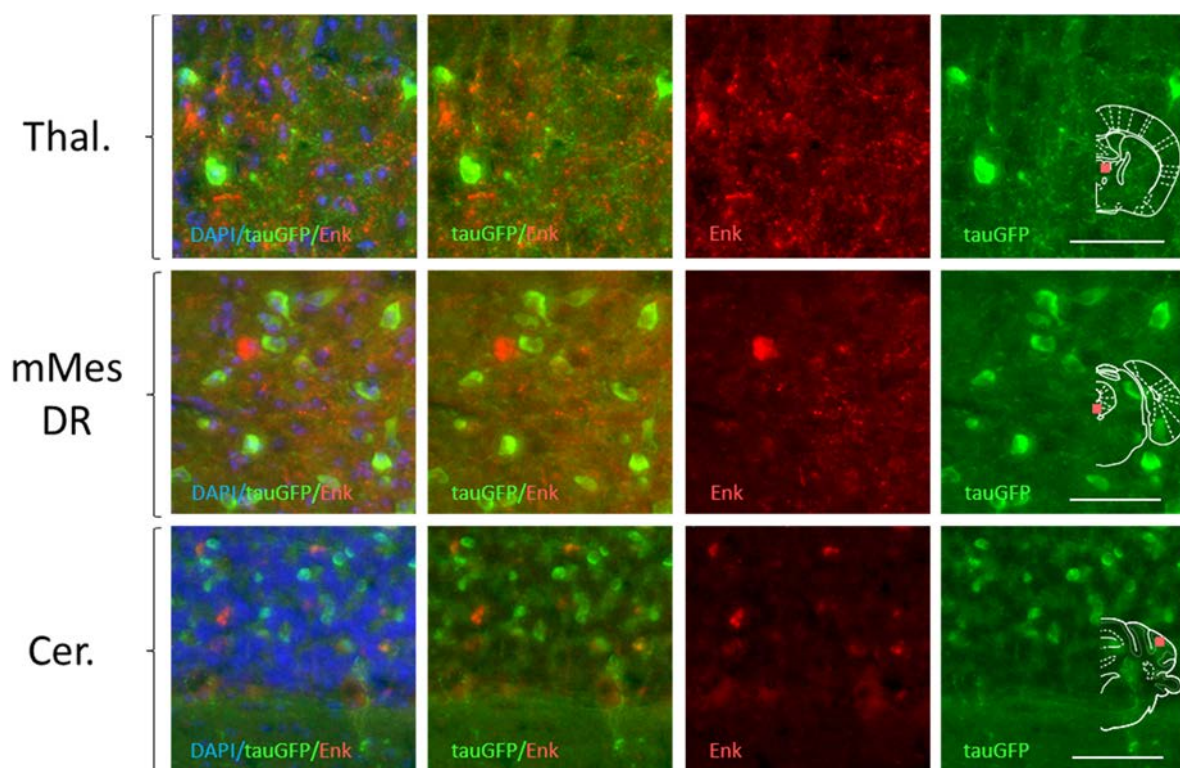


Abbildung 3.27 Visualisierung Tas2r131/tauGFP-exprimierender und Enkephalin-positiver Neuronen. Immunhistochemische Färbungen von Tas2r131/tauGFP-Neuronen mittels GFP-Antiserum und Enkephalin positiven Neuronen durch ein Antiserum gegen met-Enkephalin (Enk). Dargestellt sind Färbungen im Bereich der thalamischen Region (Thal., Bregma -1,46 mm), im *Nucleus raphe dorsalis* des medialen Mesencephalons (DR, Bregma -4,72 mm) sowie im Cerebellum (Cer., Bregma -6,00 mm). Zellkerne sind durch DAPI gefärbt. Die IHC-Färbungen zeigten, dass Enkephalin und Tas2r131/tauGFP in der thalamischen Region, im medialen Mesencephalon, im Cerebellum und auch in anderen Regionen nicht kolokalisiert sind. Untersucht wurden 24 Gehirnschnitte von drei Tieren. Maßstab 50 µm.

3.3.8 Visualisierung von Tas2r131/tauGFP-exprimierenden und serotonergen Neuronen

Der Neurotransmitter Serotonin beeinflusst verschiedene vegetative Prozesse des Körpers wie die Nahrungsaufnahme oder den Schlaf. Serotonerge Neurone liegen vorwiegend in den Raphe-Kernen im Mesencephalon, im Pons und der Medulla oblongata. Zur Validierung, ob Tas2r131/tauGFP-Neurone ebenfalls serotonerge Neurone darstellen, wurden immunhistochemische Färbungen mit einem Antiserum gegen die Tryptophanhydroxylase 2 verwendet. Diese katalysiert die Umwandlung von Tryptophan zu 5-Hydroxytryptophan, einem Zwischenprodukt für die Synthese von Serotonin. Es wurden insgesamt 128 Gehirnschnitte von fünf Tieren analysiert. Serotonerge Neurone konnten nur in den Raphe-Kernen im Pons und der Medulla oblongata detektiert werden. Eine Kolokalisation in Bereichen wie der thalamischen Regionen, im PAG sowie im Cerebellum lag nicht vor. Auch in den Bereichen, in denen Tryptophanhydroxylase 2 detektiert wurde, wie dem *Nucleus raphe magnus* im Pons, wurde in keinem Fall eine Kolokalisation mit Tas2r131/tauGFP nachgewiesen (siehe Abb.3.28).

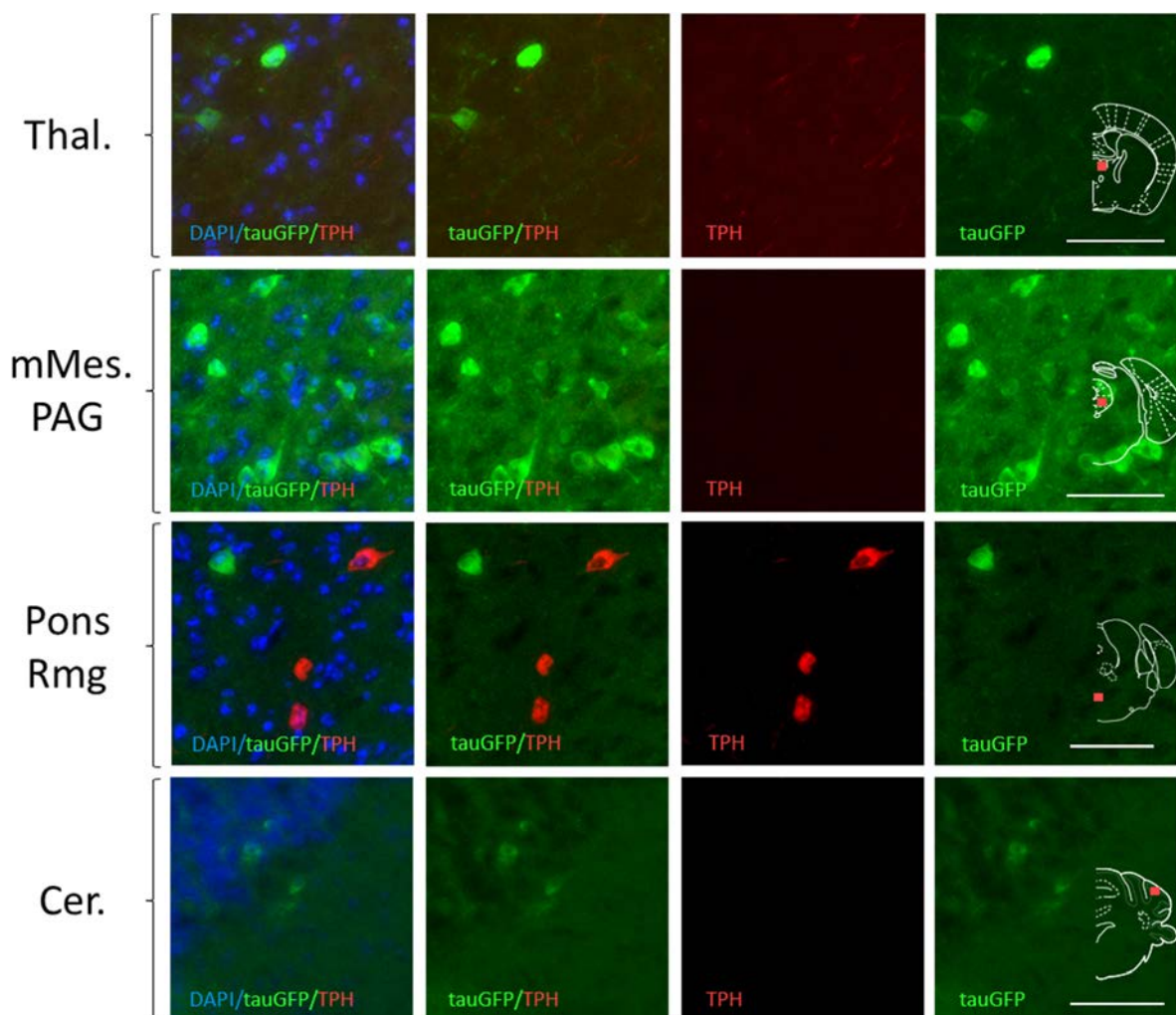


Abbildung 3.28 Visualisierung Tas2r131/tauGFP-exprimierender und serotonerger Neurone. Immunhistochemische Färbungen von Tas2r131/tauGFP-Neuronen mittels GFP-Antiserum und serotonergen Neuronen durch ein Antiserum gegen die Tryptophanhydroxylase 2 (TPH). Dargestellt sind Färbungen im Bereich der Thalamischen Region (Thal., Bregma -1,46 mm), im PAG des medialen Mesencephalons (PAG, Bregma -4,72 mm) im *Nucleus raphe magnus* des Pons (Rmg, Bregma -5,02 mm) sowie im Cerebellum (Cer., Bregma -6,00 mm). Zellkerne sind durch DAPI angefärbt. Die IHC-Färbungen zeigten in der thalamischen Region, dem PAG oder dem Cerebellum keine TPH-Expression und somit auch keine Kolokalisation mit dort befindlichen Tas2r131/tauGFP-Neuronen. Auch in Bereichen, in denen TPH detektiert wurde, wie im *Nucleus raphe magnus* des Pons und anderen Raphe-Kernen, wurde nie eine Kolokalisation mit Tas2r131/tauGFP detektiert. Untersucht wurden insgesamt 128 Gehirnschnitte von fünf Tieren. Maßstab 50 µm.

3.3.9 Visualisierung von Tas2r131/tauGFP-exprimierenden Neuronen und Interneuronen

Interneurone verfügen im Gegensatz zu den bisher dargestellten Projektionsneuronen über eine lokal begrenzte Reichweite ihrer Axone. Sie geben daher Informationen meist direkt an die benachbarten Nervenzellen weiter. Durch immunhistochemische Studien wurden Tas2r131/tauGFP-Neurone sowie Interneurone mithilfe eines Antikörpers gegen Calbindin visualisiert. Calbindin bindet Calciumionen und dient als deren Transportprotein.

Es wurden insgesamt 52 Gehirnschnitte von drei Tieren analysiert. Die Ergebnisse dieser Studien konnten im Bereich des *Nucleus raphe dorsalis* wenige Übereinstimmungen von Tas2r131/tauGFP und Calbindin zeigen (siehe Abb. 3.29, Pfeile). Dagegen war eine Kolokalisation von Tas2r131/tauGFP und Calbindin in anderen Regionen wie im Thalamus und dem Cerebellum nicht nachweisbar (siehe Abb. 3.29).

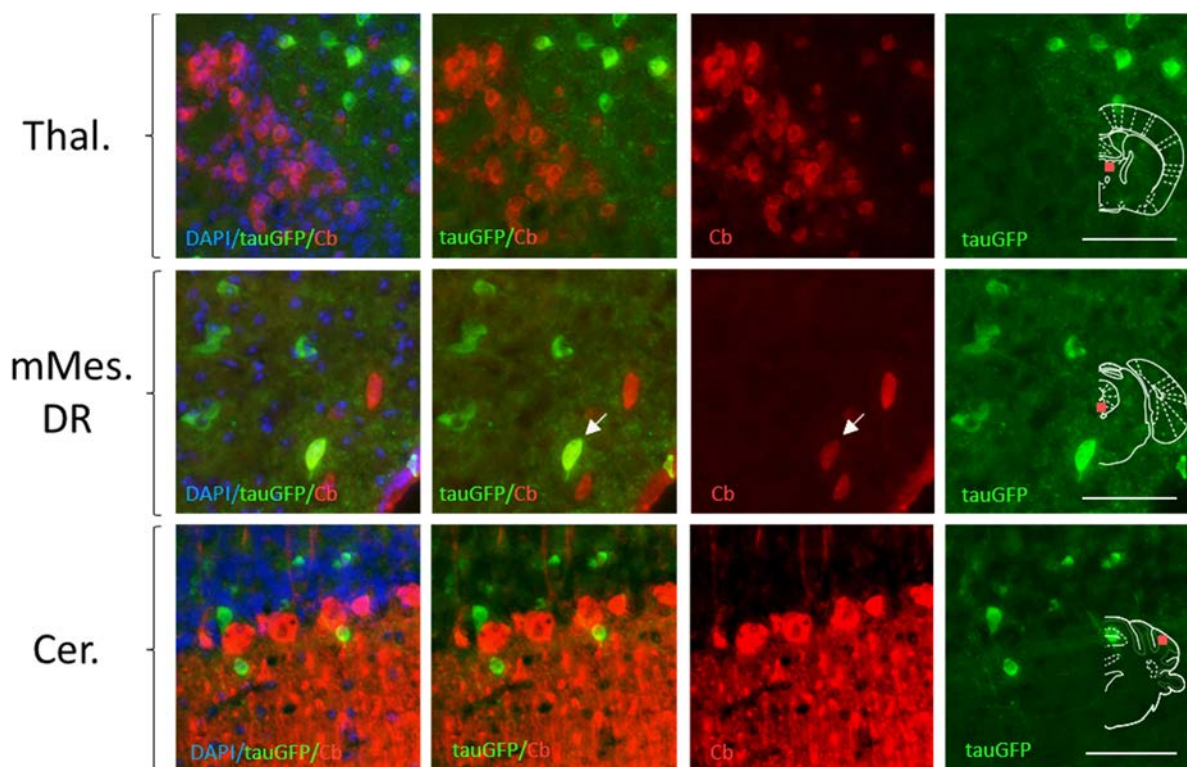


Abbildung 3.29 Visualisierung von Tas2r131/tauGFP-exprimierenden Neuronen und Interneuronen. Immunhistochemische Färbungen von Tas2r131/tauGFP-Neuronen mittels tauGFP-Antikörper und Interneuronen durch einen Calbindin (Cb) Antikörper. Dargestellt sind Färbungen im Thalamus (Thal., Bregma -1,46 mm), im *Nucleus raphe dorsalis* des medialen Mesencephalons (DR, Bregma -4,72 mm) sowie im Cerebellum (Cer., Bregma -6,00 mm). Zellkerne sind durch DAPI angefärbt. Die IHC-Färbungen zeigten in Bereich des *Nucleus raphe dorsalis* einen geringen Grad der Kolokalisation von Tas2r131/tauGFP und Interneuronen. In anderen Bereichen wie dem Thalamus und dem Cerebellum war trotz Vorkommen von Interneuronen und Tas2r131/tauGFP der Nachweis einer Kolokalisation nicht möglich. Untersucht wurden insgesamt 52 Gehirnschnitte von drei Tieren. Maßstab 50 µm.

3.3.10. Zusammenfassung der Kolokalisationsstudien

Die Ergebnisse aller immunhistochemischer Färbungen zeigten, dass verschiedene neuronale Populationen partiell mit der Tas2r131/tauGFP-Neuronenpopulation überlappen. Es konnte eine Kolokalisation mit cholinergen, dopaminergen, GABAergen, glycinerg-angesteuerten und noradrenergen Projektionsneuronen sowie mit Interneuronen gezeigt werden. Ein sehr hoher Grad

der Kolokalisation von Tas2r131/tauGFP konnte mit ChAT (cholinerge Neurone) im Thalamus und Mesencephalon und mit GAD67 (GABAerge Neurone) im Cerebellum detektiert werden. Darüber hinaus konnte ein geringer Grad der Kolokalisation von Tas2r131/tauGFP mit der Tyrosinhydroxylase (dopaminerg) im Mesencephalon, mit dem Glycinrezeptoruntereinheiten $\alpha 1+2$ (glycinerg-angesteuert) im Mesencephalon und im Pons und mit D β H (noradrenerg) in den Raphe-Kernen sowie mit Interneuronen im Mesencephalon nachgewiesen werden.

Mit Tryptophanhydroxylase 2 (serotonerg) und met-Enkephalin konnten dagegen keine Kolokalisationen gezeigt werden. Mögliche Kolokalisationen mit glutamatergen Neuronen konnte aufgrund der vesikulären Färbung durch VGLUT1 und VGLUT2 nicht eindeutig belegt werden.

3.3.11 Studien zur Koexpression von Tas2r-Neuronen mit Gustducin

Wie bereits unter 3.2.2 gezeigt wurde, war es möglich, verschiedene Bitterrezeptoren sowie Gustducin auf zellulärer Ebene im Gehirn nachzuweisen (siehe Abb. 3.17, 3.18, 3.19). Gustducin fungiert als Teil der intrazellulären Signalkaskade bei der Initialisierung der Geschmackswahrnehmung auf der Zunge. Bisher ungeklärt ist, ob, und wenn ja, wie Gustducin an der Geschmackswahrnehmung oder Geschmackssignalweiterleitung im Gehirn beteiligt ist. Für den Fall einer Beteiligung wäre eine Koexpression von Tas2rs und Gustducin in denselben Neuronen möglich. Daher wurde im Folgenden untersucht, ob solch eine Kolokalisation nachgewiesen werden kann.

3.3.11.1 Koexpression von Tas2r131/tauGFP mit Gustducin

Für die Validierung einer Koexpression von Tas2r131- und Gustducin-exprimierenden Neuronen wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Dazu wurden Gehirngefrierschnitte von Tas2r131^{+/*BLC*}/Rosa26^{+/*tauGFP*}-Mäusen verwendet. Mittels GFP-Antiserum war es möglich Tas2r131/tauGFP-Neurone zu visualisieren. Gustducin-positive Zellen wurden mithilfe eines α -Gustducin-Antiserums detektiert. Es wurden insgesamt 28 Gehirnschnitte von zwei Tieren untersucht. Die Ergebnisse dieser Analysen zeigten eine komplette Koexpression von Gustducin- und Tas2r131/tauGFP-exprimierenden Neuronen in mehreren Gehirnregionen, wie im Bereich des *Nucleus parabrachialis pigmentosus*, der *Area tegmentalis ventralis* und im *Nucleus reticularis lateralis* innerhalb der Medulla oblongata (siehe Abb. 3.30, Pfeile). Darüber hinaus konnten mehr Gustducin- als Tas2r131/tauGFP-exprimierende Neuronen detektiert werden (siehe Abb. 3.30). Das deutet darauf hin, dass die Tas2r131/tauGFP-Neurone eine Subpopulation der Gustducin-positiven Neuronenpopulation darstellen. Bei Verwendung eines Gustducin-Blockierungspeptides konnten keinerlei Gustducin-positive Zellen mehr visualisiert werden, was auf die Spezifität des Gustducin-Antiserums hinwies.

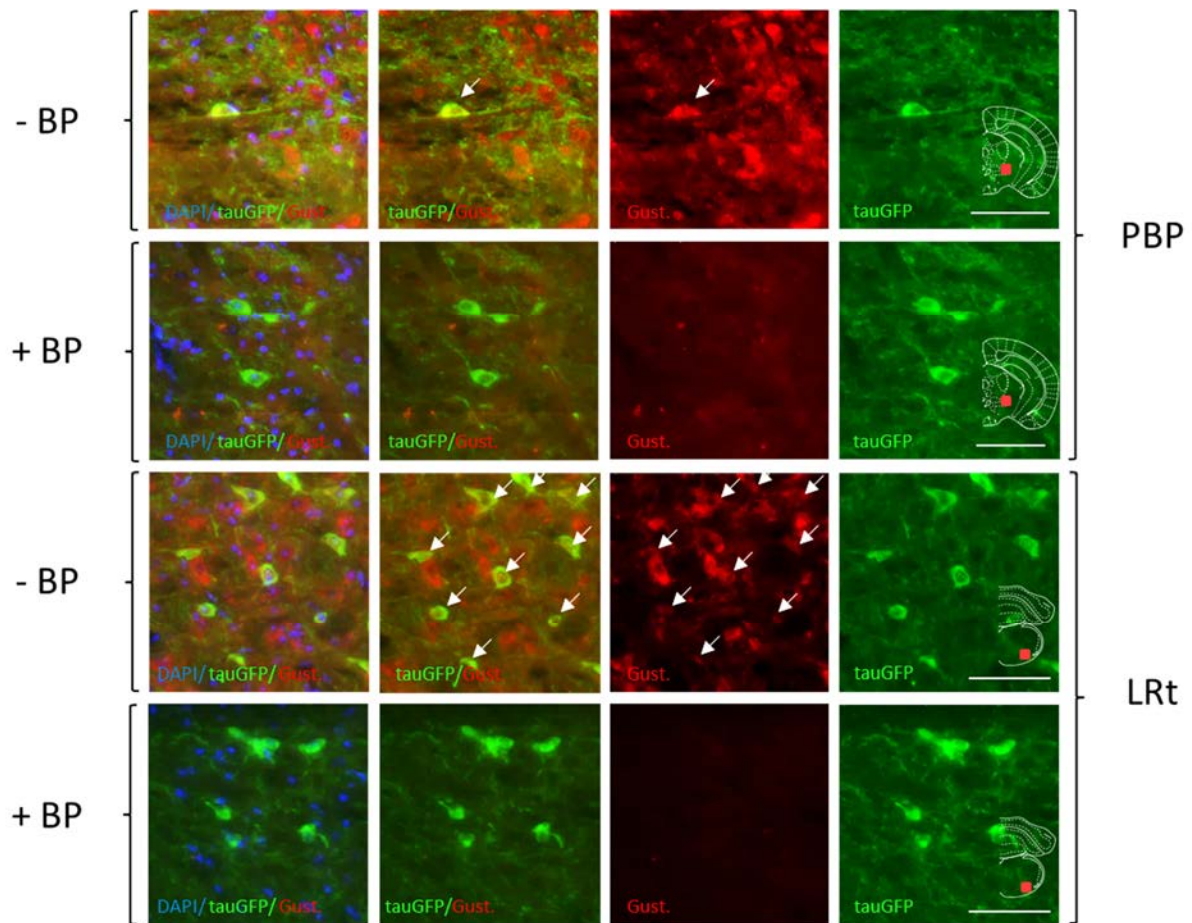


Abbildung 3.30 Visualisierung von Tas2r131/tauGFP- und Gustducin-exprimierender Zellen. Immunhistochemische Färbungen von Tas2r131/tauGFP-Neuronen mittels GFP-Antiserum und Gustducin-exprimierende Zellen mittels α -Gustducin-Antiserum. Oberer Bereich: Dargestellt sind Färbungen im Bereich des *Nucleus parabrachialis pigmentosus* (PBP) innerhalb der *Area tegmentalis ventralis* im Mesencephalon (Bregma -2,92 mm). Unterer Bereich: Dargestellt sind Färbungen im Bereich des *Nucleus reticularis lateralis* (LRt) innerhalb der *Medulla oblongata* (Bregma -7,64 mm). Es wurden jeweils Färbungen ohne (-BP) und mit (+BP) einem Blockierungspeptid durchgeführt. Die Ergebnisse dieser IHC-Färbungen zeigten sowohl im *Nucleus parabrachialis pigmentosus* als auch im *Nucleus reticularis lateralis* eine komplette Kolokalisation von Tas2r131/tauGFP und Gustducin. Auch in anderen Regionen konnte diese stete Kolokalisation beobachtet werden. Bei Verwendung eines spezifischen Gustducin-Blockierungspeptids konnten keine Gustducin-exprimierenden Zellen mehr visualisiert werden. Dies wies auf die Spezifität des Gustducin-Antiserums hin. Untersucht wurden insgesamt 28 Gehirnschnitte von zwei Tieren. Maßstab 50 μ m.

3.3.11.2 Koexpression von Tas2r135 mit Gustducin in Neuronen

Zur Analyse einer möglichen Koexpression von Tas2r135 und Gustducin in Neuronen wurden die Methoden der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) und der immunhistologischen Färbung kombiniert. Für diese Studien wurden Gehirngefrierschnitte von C57BL/6-Tieren verwendet.

Tas2r135-exprimierende Neurone wurden mithilfe einer Antisense-RNA-Sonde visualisiert. Als Kontrolle wurde die entsprechende Sense-RNA-Sonde während der FISH-Analysen mitgeführt, die die Spezifität der Antisense-Sonde belegte. Gustducin-exprimierende Zellen wurden im Anschluss an die FISH mittels immunhistologischer Färbung durch ein Gustducin-Antiserum visualisiert. Die Ergebnisse zeigten, dass alle Tas2r135-positiven ebenfalls Gustducin-exprimierende Neuronen darstellen. Diese

komplette Kolokalisation konnte in verschiedenen Gehirnregionen wie dem Hirnstamm nachgewiesen (siehe Abb. 3.31).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass deutlich mehr Gustducin- als Tas2r135-exprimierende Zellen nachweisbar waren (siehe Abb. 3.31). Wie bereits bei den Tas2r131/tauGFP-Neuronen stellen daher auch Tas2r135-positive Zellen eine Subpopulation der Gustducin-positiven Zellen dar.

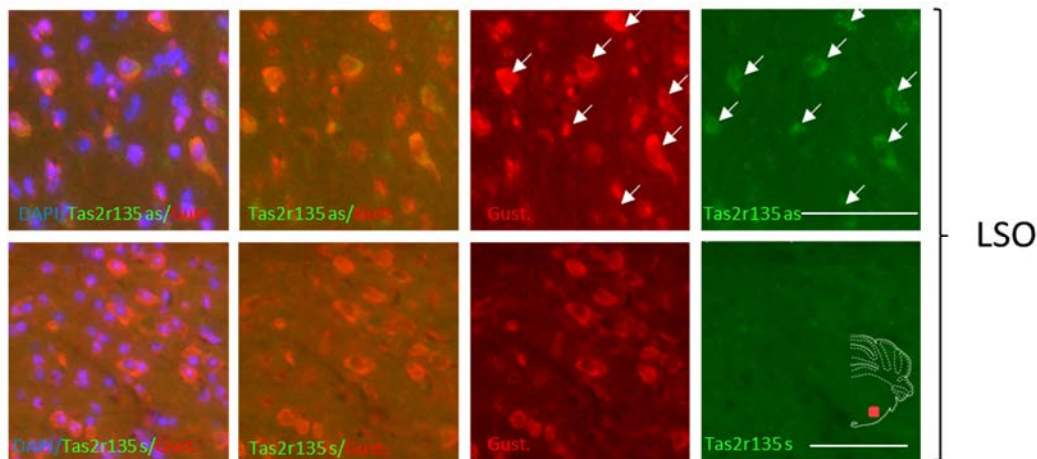


Abbildung 3.31 Visualisierung von Tas2r135- und Gustducin-exprimierender Zellen im Hirnstamm. Kombination aus Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) zur Detektion Tas2r135-exprimierender Neurone und Immunhistochemie zur Detektion Gustducin-exprimierender Zellen (Gust.). Als Kontrolle wurde eine Sense-Sonde mitgeführt (untere Reihe). Dargestellt sind Färbungen im Bereich der lateralen oberen Olive (LSO) innerhalb des Hirnstamms. Die Ergebnisse zeigten eine komplette Kolokalisation von Tas2r135 und Gustducin im Bereich der lateralen oberen Olive (obere Reihe, Pfeile). Auch in anderen Bereichen konnte diese Kolokalisation beobachtet werden. Untersucht wurden vier Gehirnschnitte eines Tieres. Maßstab 50 µm.

3.4 Neuronale Projektion von Tas2r131/tauGFP-exprimierenden Zellen

Neben den Kolokalisationsstudien zur Analyse des Zelltyps Tas2r-exprimierender Neurone lag ein weiterer Fokus in der Aufklärung der Verschaltung dieser Zellen. Erste Hinweise auf die Projektion der Zellen konnten bereits während der Kolokalisationsstudien (siehe 3.3) im Bereich des caudalen Pons beobachtet werden. Für eine detailliertere Analyse des Faserverlaufs wurden daher Gehirngefrierschnitte von Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/tauGFP}-Mäusen in coronaler Ausrichtung mit einer Dicke von 40 µm im Bereich des caudalen Pons (Bregma -5,34 mm) angefertigt, gefärbt und analysiert. Es wurden zwölf 40-µm-Gehirnschnitte eines Tieres untersucht.

Die Analysen zeigten, dass Fasern von Neuronen, die den Bitterrezeptor Tas2r131 exprimieren, vom *Nucleus raphe pallidus* über den *Tractus pyramidalis* bis ins Kerngebiet des Trapezkörpers ziehen. Im Kerngebiet des Trapezkörpers spaltet sich das Faserbündel auf und die Axone projizieren auf ihre Zielneurone (siehe Abb. 3.32, 3.33). Die Zellkörper dieser projizierenden Neurone konnten in den verwendeten Schnitten nicht detektiert werden. Vermutlich verlaufen die Fasern vor Eintritt in den *Nucleus raphe dorsalis* in caudal-distaler Richtung weiter. Zur weiteren Analyse und Detektion der Zellkörper dieser Tas2r131/tauGFP-projizierenden Neurone wurden daher 40-µm-Gehirnschnitte mit sagittaler Ausrichtung angefertigt.

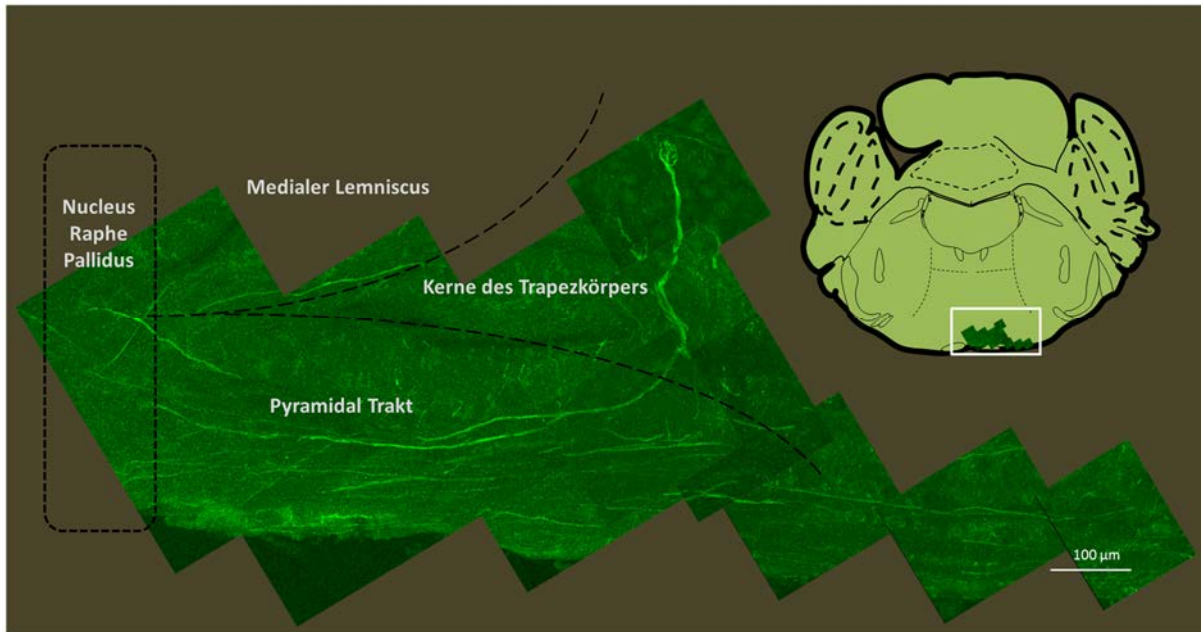


Abbildung 3.32 Darstellung der neuronalen Projektion Tas2r131-exprimierender Nervenfasern. Tas2r131/tauGFP-positive Zellausläufer ziehen vom *Nucleus raphe pallidus* über den *Tractus pyramidalis* bis in das Kerngebiet des Trapezkörpers. Dort projizieren sie auf Neurone im Kerngebiet des Trapezkörpers. Gehirnausschnitt im Bereich des caudalen Pons (Bregma -5,34 mm). Maßstab 100 µm.

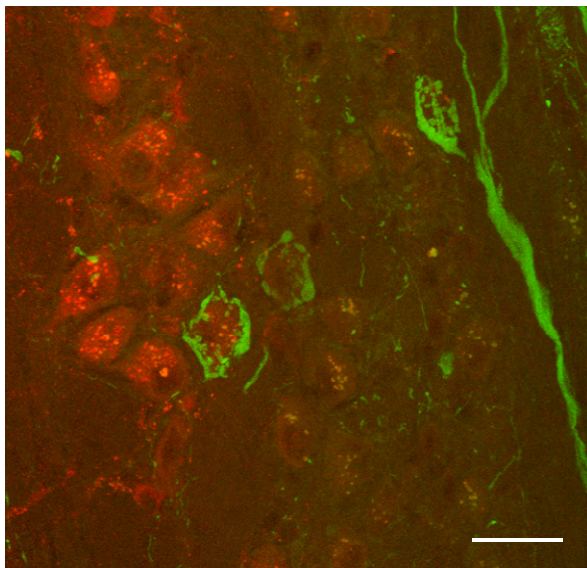


Abbildung 3.33 Darstellung der neuronalen Projektion von Tas2r131/tauGFP-Nervenfasern (grün) auf Neurone im Kerngebiet des Trapezkörpers. Gegenfärbung mittels Dopamin-β-Hydroxylase-Antikörper (rot). Gehirnausschnitt im Bereich des caudalen Pons (Bregma - 5,34 mm). Maßstab 20 µm.

Zur Lokalisation der Tas2r131/tauGFP-Neuronen, die ins Kerngebiet des Trapezkörpers projizieren, wurden IHC-Färbungen von 40-µm-Gehirnschnitten in sagittaler Schnittrichtung durchgeführt. Es wurden sechs Schnitte von einem Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+tauGFP}-Tier untersucht. Die Analysen der sagittalen Gehirnschnitte zeigten eine beträchtliche Anzahl von Zellausläufern der Tas2r131/tauGFP-Neurone, die vom Rückenmark bis in die *Nuclei olivaris inferior* und den *Tractus pyramidalis* ziehen (siehe Abb. 3.34 B). Innerhalb des *Tractus pyramidalis* konnte eine Richtungsänderung der Nervenfasern beobachtet werden. Während im hinteren Teil viele Nervenfasern bzw. Zellausläufer von Tas2r131/tauGFP-Neuronen vorwiegend entlang des *Tractus pyramidalis* verlaufen, überwiegt im vorderen Teil eine Faserrichtung in den lateralen Bereich des *Tractus pyramidalis* (siehe 3.34 A).

Dies könnte darauf hindeuten, dass Tas2r131/tauGFP-Zellen vom Rückenmark über den *Tractus pyramidalis* bis ins Kerngebiet des Trapezkörpers projizieren. Die Zellkörper dieser Tas2r131/tauGFP-Zellen konnten trotz sechs verschiedener 40- μ m-Schnitte bislang nicht im Bereich der Pyramidenbahn, der Medulla oblongata oder Medulla spinalis detektiert werden.

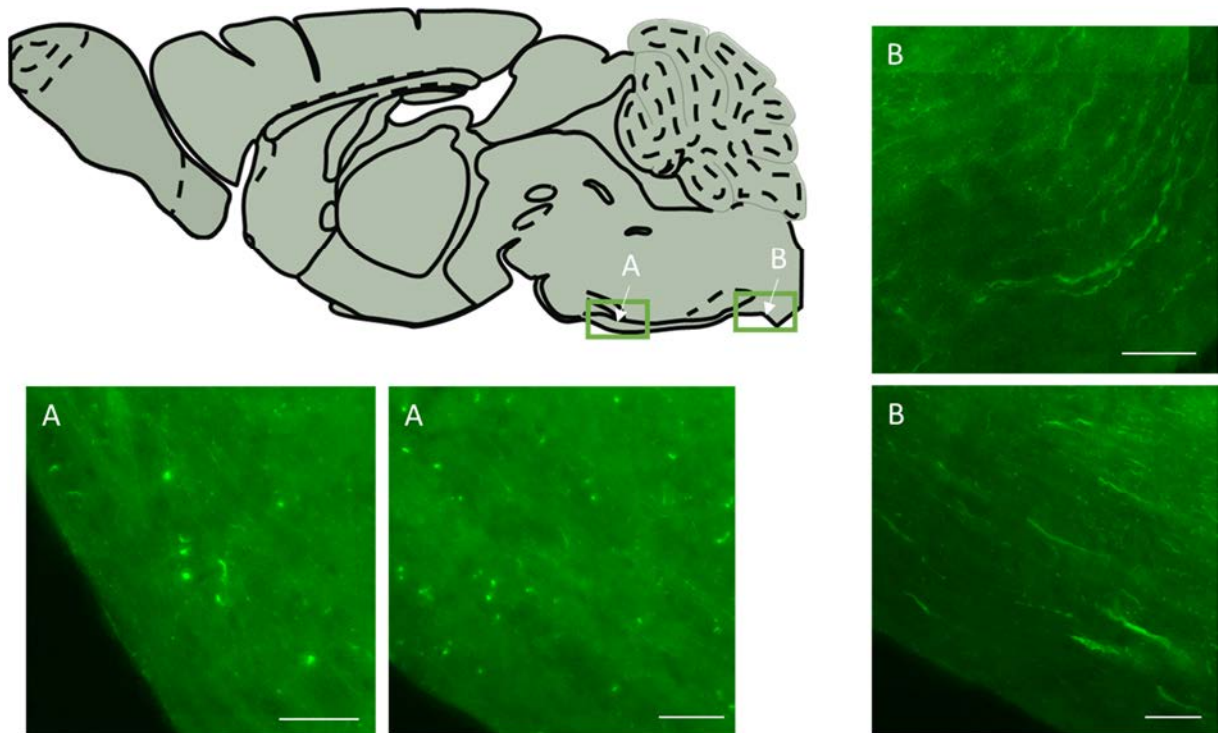


Abbildung 3.34 Darstellung der Projektion von Tas2r131/tauGFP-Zellen entlang des *Tractus pyramidalis*. Ausschnitte der neuronalen Projektion von Tas2r131/tauGFP-Zellen (tauGFP) vom Rückenmark (B) in den vorderen Teil des *Tractus pyramidalis* (A) in sagittaler Schnittebene. Gehirnausschnitt im Bereich des kaudalen Pons (lateral - 0,04 mm). Maßstab 50 μ m.

3.5 Arc-Expression im Ganglion

Das *Activity-regulated-cytoskeleton-associated-Protein* (Arc) ist das Produkt des gleichnamigen *Immediate-early-Gens* *Arc*. Studien unserer Abteilung haben gezeigt, dass nach Applikation von Bittersubstanzen in die Mundhöhle von Mäusen eine erhöhte Expression der *Arc*-RNA im NTS, der ersten zentralen Instanz der neuronalen Geschmacksverarbeitung, detektiert werden kann (Töle, 2013). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die *Arc*-Expression verwendet werden, um das Mausmodell Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT} (siehe 3.1.4) zu prüfen. In Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+TeNT}-Tieren (siehe 3.1.4) wird die ortsspezifische Cre-Rekombinase unter Kontrolle der bisher unbekanntenen Promotorregion des Tas2r131-Bitterrezeptors exprimiert. Diese entfernt eine Stoppsequenz, welche zwischen dem Rosa26-Lokus und der Sequenz für die leichte Kette des Tetanustoxins (TeNT) liegt. Das Entfernen der Stoppsequenz führt zur Expression der leichten Kette des Tetanustoxins unter Kontrolle des ubiquitär und konstitutiv aktiven Rosa26-Promotors. Das Tetanustoxin bewirkt die Proteolyse von Synaptobrevin, welches an der Vesikelausschüttung an der präsynaptischen Membran von Neuronen beteiligt ist (Zhang et al., 2009). Dies führt im ZNS von Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+TeNT}-Tieren zu einer unterbrochenen Erregungsweiterleitung in den betroffenen Tas2r131-Neuronen. Folglich können

Tas2r131-Zellen nach der ersten synaptischen Verschaltung keine Signale transmittieren. Tas2r131-Zellen außerhalb des ZNS wie beispielsweise Geschmackrezeptorzellen nutzen keine vesikuläre Transmission zur Signalweiterleitung und sollten daher nicht beeinträchtigt sein.

Mittels *Arc*-Expression sollte daher untersucht werden, ob im NPG von Tas2r131^{+*BLOC*}/Rosa26^{+*TeNT*}- und Kontrolltieren vergleichbare gustatorische Signale nach Bitterstimulation detektierbar sind. Im NTS, nach der ersten synaptischen Verschaltung, sollte indes eine Signalreduktion in Tas2r131^{+*BLOC*}/Rosa26^{+*TeNT*}-Tieren nachweisbar sein.

Voraussetzung dafür ist zu untersuchen, ob die *Arc*-RNA im NPG prinzipiell nachweisbar und nach Stimulation mit Bittersubstanzen eine erhöhte *Arc*-Expression detektierbar ist.

3.5.1 *Arc*-Expressionsanalysen in Ganglien von C57BL/6-Tieren

Zur Charakterisierung der *Arc*-Expression im NPG nach Stimulation wurden C57BL/6-Mäusen Bitterstimuli oral appliziert. Als Stimuli wurden Cucurbitacin I (1 mM), Cycloheximid (0,5 mM) oder Chinin (10 mM) sowie ein Bittermix aus acht verschiedenen Bittersubstanzlösungen (0,1 mM Cycloheximid, 3 mM Chinin, 0,1 mM Cucurbitacin I, 10 mM Denatoniumbenzoat, 3 mM 6n-Propylthiouracil, 10 mM Papaverin, 100 mM Natriumbenzoat, 100 mM Arbutin) verwendet. Als Lösungsmittel und Kontrollstimulus diente eine wässrige Lösung von 25 mM KCl und 0,25 mM NaHCO₃, die für den Menschen als geschmacksneutral beschrieben wurde. (De Araujo et al. 2003).

Die anschließende Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung zeigte nach Applikation des Kontrollstimulus nur wenige *Arc*-exprimierende Zellen im NPG (~45). Im Vergleich dazu konnte eine signifikant stärkere *Arc*-Expression detektiert werden, wenn Tiere mit den Bittersubstanzen Cucurbitacin I, Cycloheximid oder Chinin stimuliert wurden (siehe Abb. 3.36). Beispielhaft sind in der Abbildung 3.36 die Ergebnisse der FISH nach Stimulation mit Cycloheximid oder dem Kontrollstimulus dargestellt. Auch nach Stimulation mit der Bittermixlösung konnte eine signifikant erhöhte Zahl *Arc*-exprimierender Zellen detektiert werden. In Abhängigkeit der verwendeten Bitterstofflösung wurde eine 3 bis 6-fach erhöhte Zahl *Arc*-exprimierender Zellen detektiert im Vergleich zur Stimulation mit dem Kontrollstimulus (siehe Abb. 3.35, Tab A12). Ein Vergleich der Bittersubstanzen untereinander zeigte eine signifikant erhöhte Zahl *Arc*-exprimierender Zellen nach Applikation des Bittermixes im Vergleich zur Einzelapplikation von Cucurbitacin I (siehe Abb. 3.35, Tab A12).

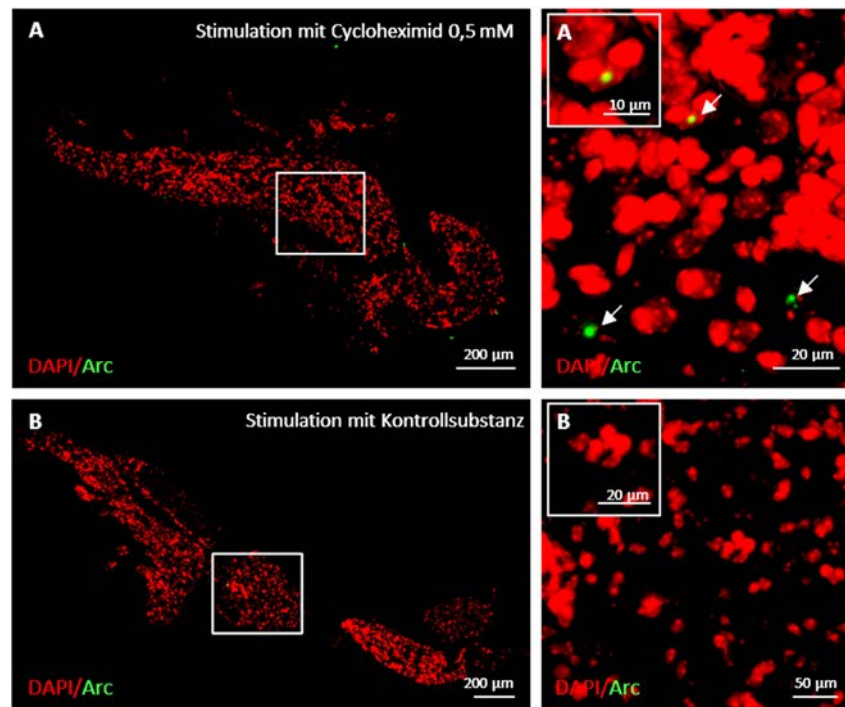


Abbildung 3.35 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung zur Visualisierung der Arc-RNA im Ganglion nodosum/petrosum (NPG) nach oraler Stimulation von Mäusen. Verwendet wurde die Bittersubstanz Cycloheximid 0,5 mM (A) sowie ein Kontrollstimulus (B). Darstellung der Zellkerne durch den Farbstoff DAPI in rot, Arc-RNA visualisiert durch eine grüne punktuelle Färbung. Die Ergebnisse der FISH zeigten wenige Arc-exprimierende Zellen nach Stimulation von Mäusen mit der Kontrolllösung (B). Dagegen konnten deutlich mehr Arc-exprimierende Zellen detektiert werden, wenn die Mäuse mit einer Cycloheximid-Lösung stimuliert wurden (A).

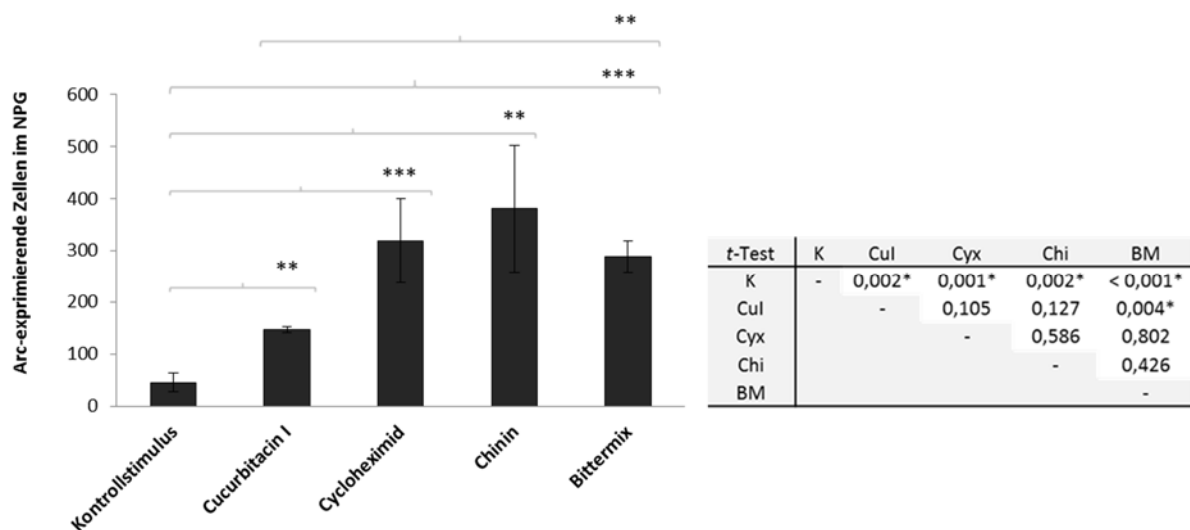


Abbildung 3.36 Daten der nukleären Arc-Expression im NPG. Anzahl Arc-exprimierender Zellen im NPG nach Stimulation mit dem Kontrollstimulus (K), einem der drei Bitterstimuli Cucurbitacin I (Cul: 1 mM), Cycloheximid (Cyx: 0,5 mM) und Chinin (Chi: 10 mM) oder Bittermix (BM: 0,1 mM Cycloheximid, 3 mM Chinin, 0,1 mM Cucurbitacin I, 10 mM Denatoniumbenzoat, 3 mM 6n-Propylthiouracil, 10 mM Papaverin, 100 mM Natriumbenzoat, 100 mM Arbutin). Die Arc-Expressionsanalysen zeigten eine signifikant erhöhte Zahl Arc-exprimierender Zellen nach Stimulation mit Cucurbitacin I, Cycloheximid, Chinin oder dem Bittermix im Vergleich zur Stimulation mit der Kontrolllösung. Darüber hinaus konnten signifikant mehr Arc-exprimierende Zellen detektiert werden, wenn die Mäuse mit dem Bittermix anstatt mit Cucurbitacin I stimuliert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. (n = 2-5) sowie der Test auf Signifikanz mittels zweiseitigem t-Test. ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001.

3.5.2 Arc-Expressionsanalysen in Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/TeNT} - im Vergleich zu Kontrolltieren

Zur Untersuchung der Informationstransmission von Tas2r131-positiven Geschmacksrezeptorzellen im Zungengewebe bis zur ersten neuronalen Verschaltung im NTS wurde die Expression des neuronalen Aktivitätsmarker *Arc* im NPG und im NTS analysiert. Verhält sich das Mausmodell wie vorhergesagt, sollte sich die Zahl *Arc*-exprimierender Zellen nach Bitterstimulation im NPG von Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/TeNT}-Tieren und Kontrolltieren nicht signifikant unterscheiden.

Im NTS, der ersten zentralen Instanz der neuralen Geschmacksverarbeitung, sollten dagegen weniger *Arc*-exprimierende Zellen in Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/TeNT}-Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren detektiert werden.

Für diese Analysen wurden NPG und NTS von neun Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/TeNT}- und elf Kontrolltieren nach Stimulation mit Papaverin (3 mM), Cycloheximid (0,5 mM) und Kontrollstimulus auf eine *Arc*-Expression untersucht. Papaverin wurde genutzt, da durch erste Kurzzeitpräferenztests mit Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/TeNT}- und Kontrolltieren bereits Unterschiede im Leckverhalten der Tiere erkennbar waren. Cycloheximid wurde gewählt, da sich im Gegensatz keine Unterschiede im Leckverhalten der Tiere zeigten (siehe 3.6).

Die Analyse der *Arc*-Expression im NPG ergab keinen Unterschied in der Anzahl *Arc*-exprimierender Zellen von Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/TeNT}-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren nach Stimulation mit der Kontroll- (93,3 vs. 74,7) sowie den Bittersubstanzen Papaverin (256,3 vs. 226,5) und Cycloheximid (242,3 vs. 197,3). Wie bereits bei den C57BL/6-Tieren konnten signifikant mehr *Arc*-exprimierende Zellen nach Bitterstimulation im Vergleich zum Kontrollstimulus beobachtet werden (siehe Abb. 3.37, Tab. A13). Das deutet darauf hin, dass die Geschmacksinformationen für Papaverin, Cycloheximid und Kontrollstimulus in Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/TeNT}- und Kontrolltieren bis zum NPG geleitet werden.

Im NTS zeigte sich nach Stimulation mit der Kontrollsubstanz (6,0 vs. 4,7) und mit Cycloheximid (13,1 vs. 13,8) ebenfalls kein Unterschied hinsichtlich *Arc*-exprimierender Zellen pro mm² im NTS in Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/TeNT} im Vergleich zu den Kontrolltieren (siehe Abb. 3.38, Tab. A14). Das lässt vermuten, dass die Geschmacksinformationen des Kontrollstimulus sowie von Cycloheximid zum NTS von Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/TeNT}- und Kontrolltieren weitergeleitet wurden.

Nach Stimulation mit Papaverinlösung zeigte sich dagegen, dass im NTS von Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/TeNT}-Tieren signifikant weniger *Arc*-exprimierende Zellen detektiert wurden als im NTS der Kontrolltiere (6,7 vs. 21,2) (siehe Abb. 3.38). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Weiterleitung der Geschmacksinformation einer Auswahl von Bittersubstanzen wie Papaverin bis zum NPG von Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/TeNT} Tieren wie in Kontrolltieren erfolgt. Nach der ersten synaptischen Verschaltung kommt es allerdings in Tas2r131-Neuronen zu einer Unterbrechung der gustatorischen Informationsweiterleitung, was zu einer reduzierten Zahl *Arc*-exprimierender Zellen führt. Diese Störung lässt sich durch die Expression des Tetanustoxins und der damit verbundenen Proteolyse des Synaptobrevins erklären (siehe 3.5.2).

Diese Ergebnisse zeigen somit einerseits einen ungehinderten Transport der Geschmacksinformation zum NPG und andererseits die Störung des Informationstransports vom peripheren Nerv zum NTS in Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/TeNT}-Tieren nach Stimulation mit Papaverin. Die anschließenden Kurzzeitpräferenztests mit Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/TeNT}- und Kontrolltieren sollten zeigen, ob die gestörte Weiterleitung von Signalen der Tas2r131-Neurone einen Einfluss auf die Wahrnehmung von verschiedenen Geschmacksstimuli ausübt.

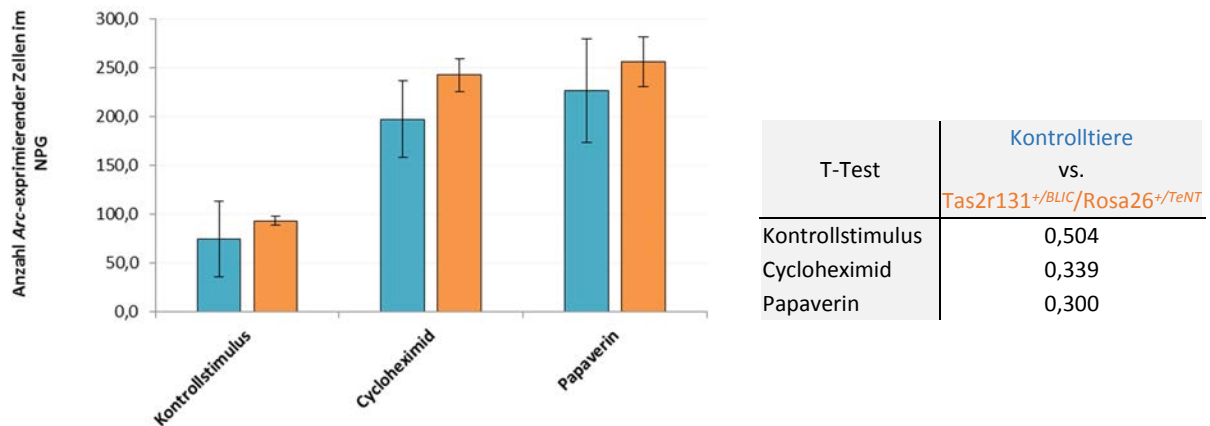


Abbildung 3.37 Daten der nukleären *Arc*-Expression im NPG in Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT} und Kontrolltieren nach Stimulation. Darstellung der Anzahl *Arc*-exprimierender Zellen nach einmaliger Stimulation mit einem Kontrollstimulus oder einer der Bittersubstanzlösungen Cycloheximid (0,5 mM) und Papaverin (3 mM). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen sowie der Signifikanztest mittels zweiseitigem *t*-Test. Gruppengröße n = 3-5

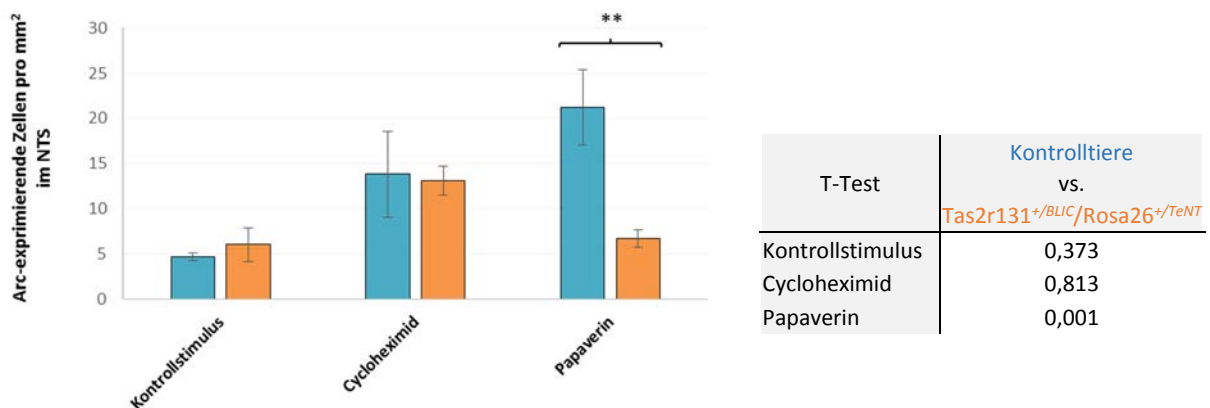


Abbildung 3.38 Daten der nukleären *Arc*-Expression im NTS in Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT} und Kontrolltieren nach Stimulation. Darstellung der Anzahl *Arc*-exprimierender Zellen pro mm² im NTS nach einmaliger Stimulation mit Kontrollstimulus oder einer der Bittersubstanzlösungen Cycloheximid (0,5 mM) und Papaverin (3 mM). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen sowie der Test auf Signifikanz mittels zweiseitigen *t*-Tests. Gruppengröße n = 3-4. Auszählung der Signale erfolgte durch Dr. Jonas Töle (DifE).

3.6 Kurzzeitpräferenztests

Zur Überprüfung der Hypothese, ob Tas2r131-Neurone an der Weiterleitung von gustatorischen Informationen beteiligt sind, wurden Kurzzeitpräferenztests mit verschiedenen Geschmacksstimuli durchgeführt. Für diese Experimente wurden Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/TeNT}-Tiere sowie als Kontrollen Tas2r131^{+/+}/Rosa26^{+/TeNT}- und Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/+}-Tiere verwendet. Die Tiere der zwei Kontrollgruppen wurden in den abschließenden Darstellungen vereinigt, da zwischen ihnen keine signifikanten Unterschiede bestanden. Nachfolgend werden die Ergebnisse der Kurzzeitpräferenztests bei Präsentation verschiedener Geschmackslösungen der Geschmacksqualitäten süß, umami, salzig, sauer und bitter anhand von Dosis-Wirkungskurven dargestellt.

Getestet wurden neun verschiedene Bitterstofflösungen sowie zwei Lösungen der Geschmacksqualität süß und jeweils eine Geschmackslösung der Qualitäten umami, sauer und salzig

(siehe Abb. 3.39, 3.40). Die Auswahl der Bittersubstanzen basierte auf früheren Kurzzeitpräferenztests sowie *In-vitro*-Studien von Liganden-Rezeptor-Beziehungen (Loßow, unpubliziert) (siehe Tab. 3.1). Für eine bessere Einschätzung des potentiellen Ausmaßes einer Signaltransmission durch neuronalen Tas2r131-Zellen wurden insbesondere Bitterstoffe analysiert, die möglichst nur einen einzigen Bitterrezeptor aktivieren. Eine detaillierte Liste der verwendeten Bittersubstanzen und der aktivierten Bitterrezeptoren ist in Tabelle 3.1 gezeigt. Während der 30-sekündigen Kurzzeitpräferenztests wurden den Mäusen jeweils Bitterstoffe verschiedener Konzentrationen bzw. Wasser angeboten. Wie oft die Maus die Bitterlösung geleckt hat, wird im Folgenden als Leckantwort bezeichnet. Das Verhältnis der Leckantwort der Geschmackstoffe einer Konzentration zur Leckantwort von Wasser wird nachfolgend als Leckrate bezeichnet. Die Leckraten der verschiedenen Geschmacksstimuli wurden im Anschluss als Dosis-Wirkungskurven dargestellt.

Die Kurzzeitpräferenztests mit den Geschmacksstimuli Saccharose, als natürlicher Süßstoff, und Sucralose, als Vertreter der künstlichen Süßstoffe, sowie Mononatriumglutamat (umami), Zitronensäure (sauer) und Natriumchlorid (salzig) zeigten keine Unterschiede der Leckraten von Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+TeNT}- und Kontrolltieren (siehe Abb. 3.39). Die Leckraten sowie die Dosis-Wirkungskurven der Bittergeschmackslösungen von Chinin, Denatoniumbenzoat, Cycloheximid, 6n-Propylthiouracil sowie für den in hohen Konzentrationen bitterrezeptor-aktivierenden künstlichen Süßstoff Acesulfam K wiesen ebenfalls keine Unterschiede zwischen Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+TeNT}- und Kontrolltieren auf (siehe Abb. 3.40).

Hingegen zeigten Kurzzeitpräferenztests mit den Bitterstoffen Papaverin, Chlorhexidin und Cucurbitacin I signifikante Unterschiede der Leckraten von Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+TeNT}- im Vergleich zu den Kontrolltieren. Dabei leckten Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+TeNT}-Tiere signifikant mehr der Bitterlösungen Papaverin (1 und 3 mM), Chlorhexidin (30, 100 und 300 µM) und Cucurbitacin I (30 µM) als die Kontrolltiere (siehe Abb. 3.40). Auch eine 1 mM Erythromycin-Bitterlösung wurden von Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+TeNT}-Tiere tendenziell mehr geleckt als von den Kontrolltieren. Der Unterschied ist hier nur knapp nicht signifikant ($p = 0,056$) (siehe Abb. 3.40).

Diese Ergebnisse zeigten, dass Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+TeNT}-Tiere eine Auswahl von Bitterstoffen (Papaverin, Chlorhexidin, Cucurbitacin I, Erythromycin) häufiger lecken als die Kontrolltiere. Eine andere Auswahl von Bittersubstanzen sowie Geschmackslösungen anderer Qualitäten wurden von Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+TeNT}- und Kontrolltieren vergleichbar häufig geleckt. Das deutet auf eine Beteiligung von Tas2r131-Neuronen an der Weiterleitung bzw. Verarbeitung der Geschmacksinformationen von den Bitterstoffen Papaverin, Chlorhexidin, Cucurbitacin I und Erythromycin hin. Bei der Weiterleitung bzw. Verarbeitung der Bittergeschmacksinformationen von Chinin, Denatoniumbenzoat, Cycloheximid, 6n-Propylthiouracil, Acesulfam K sowie der Geschmacksqualitäten süß, umami, sauer und salzig scheinen Tas2r131-Neurone nicht beteiligt zu sein.

Substanz	Aktivierte Rezeptoren
Acesulfam K	Tas2r135
Chinin	Tas2r105, Tas2r108, Tas2r115, Tas2r126, Tas2r137, Tas2r140, Tas2r144
Chlorhexidin	Tas2r144
Cucurbitacin I	Tas2r105, Tas2r114
Cycloheximid	Tas2r105
Denatoniumbenzoat	Tas2r105, Tas2r123, Tas2r135, Tas2r140, Tas2r144
Erythromycin	Tas2r123
Papaverin	Tas2r144
PROP	Tas2r105, Tas2r108, Tas2r120, Tas2r121, Tas2r135

Tabelle 3.1 Ligand-Rezeptor-Beziehungen von Bittersubstanzen im Kurzzeitpräferenztest. Darstellung der verwendeten Bittersubstanzen während der Kurzzeitpräferenztests und die Bittergeschmacksrezeptoren, die sie aktivieren. Die Liganden-Rezeptor-Beziehungen, welcher Bitterstoff welchen Bitterrezeptor aktiviert, wurden durch Dr. Kristina Loßow (DifE) untersucht.

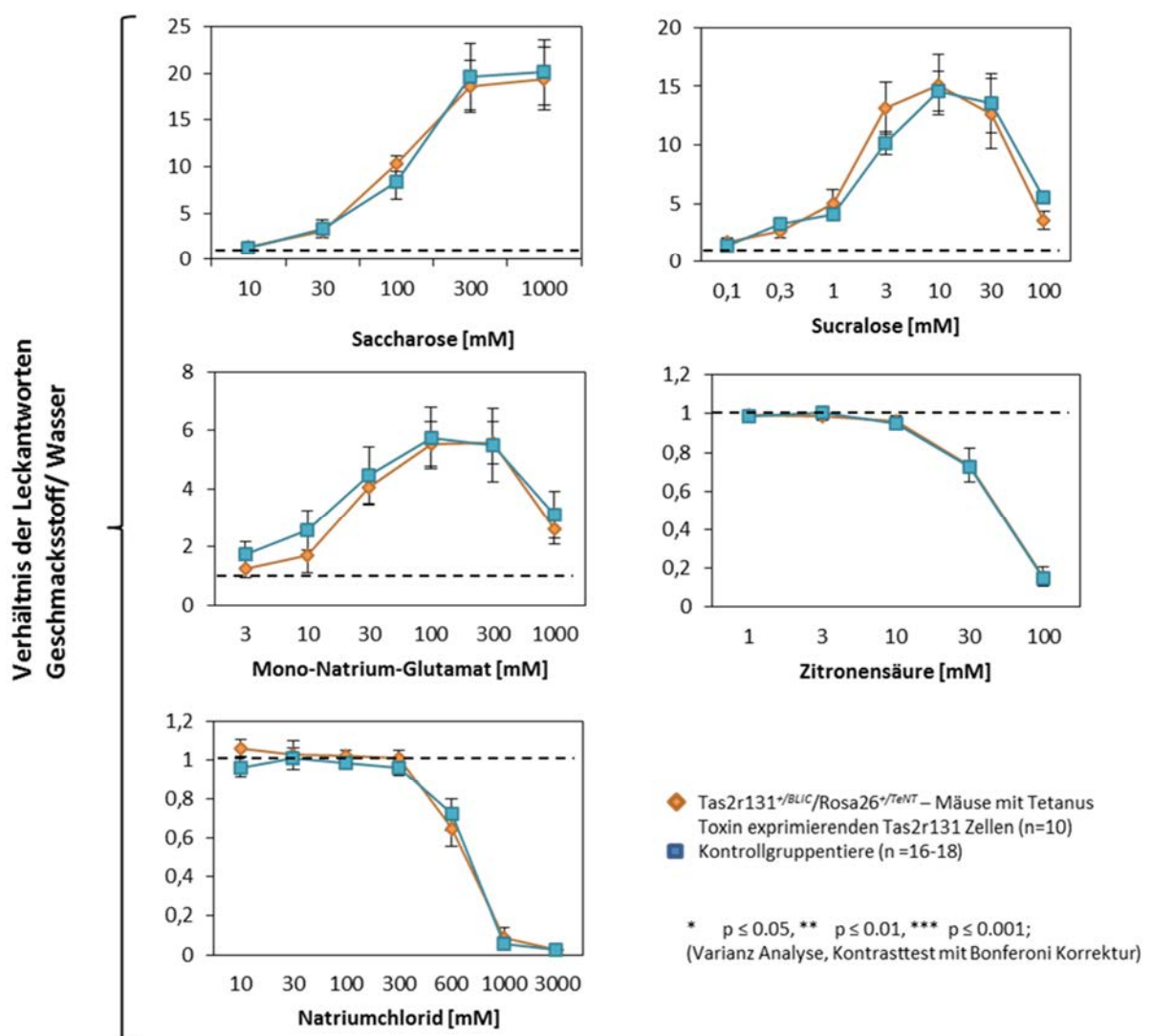


Abbildung 3.39 Dosis-Wirkungskurven nach Kurzzeitpräferenztests mit Kontrollstimuli. Untersucht wurde das Leckverhalten von Lösungen mit Saccharose und Sucralose (süß), Mononatriumglutamat (umami), Zitronensäure (sauer) und Natriumchlorid (salzig) in Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/TeNT}- und Kontrolltieren. Es zeigten sich keine Unterschiede im Leckverhalten zwischen Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/TeNT}- (gelb) und Kontrolltieren (blau).

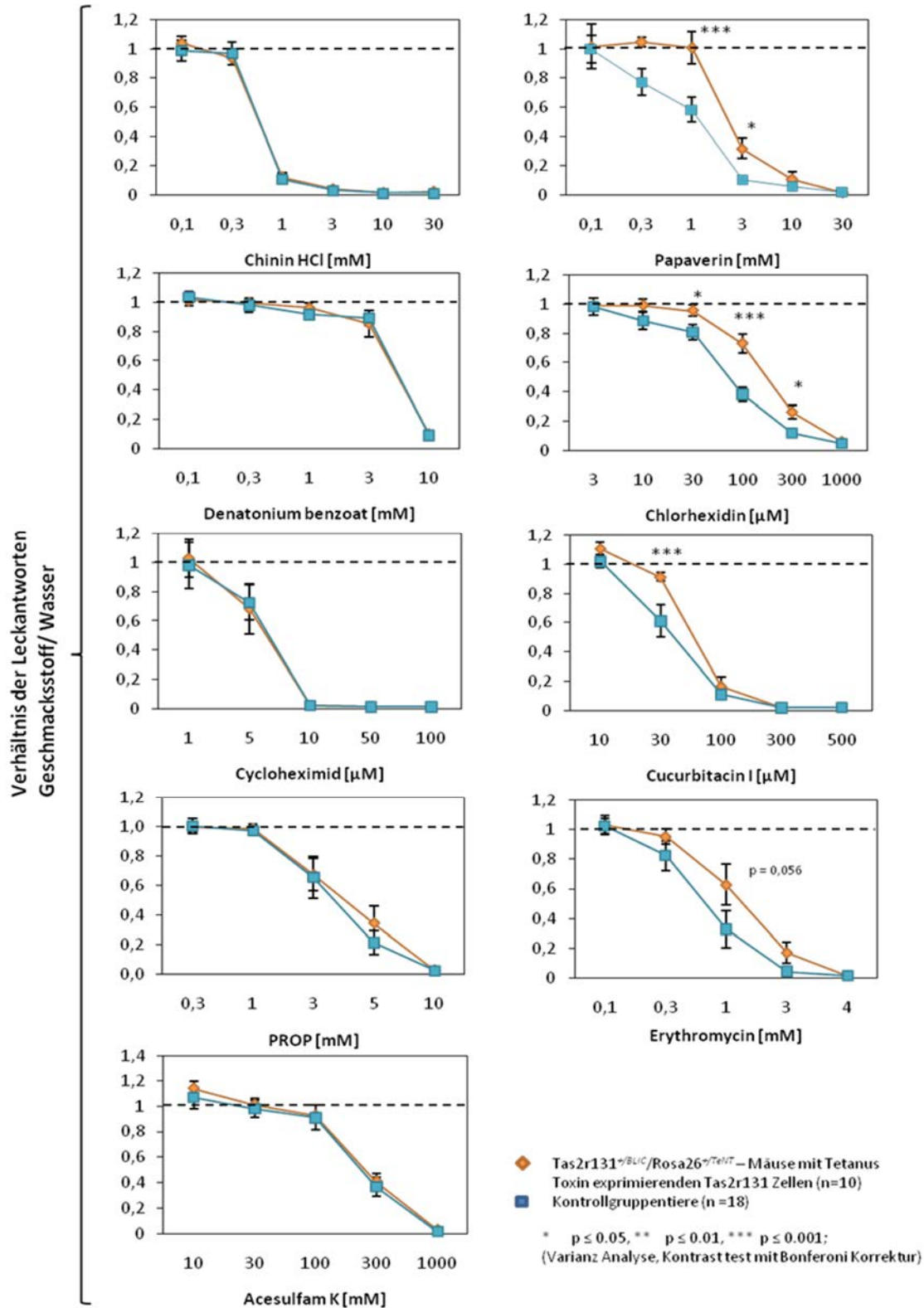


Abbildung 3.40 Dosis-Wirkungskurven nach Kurzzeitpräferenztests mit Bitterlösungen. Untersucht wurden die Leckantworten bei Präsentation der Bittersubstanzen Chinin, Denatoniumbenzoat, Cycloheximid, 6n-Propylthiouracil (PROP), Acesulfam K, Papaverin, Chlorhexidin, Cucurbitacin I und Erythromycin im Vergleich zu Wasser in Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/TeNT}- und Kontrolltieren. Die Ergebnisse zeigten keine Unterschiede im Leckverhalten von Chinin, Denatoniumbenzoat, Cycloheximid, PROP und Acesulfam K zu Wasser zwischen Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/TeNT}- (gelb) und Kontrolltieren (blau). Indes konnten bei Papaverin, Chlorhexidin, Cucurbitacin I und Erythromycin teils signifikante, teils tendenzielle Unterschiede zwischen den Leckraten (Substanz/Wasser) von Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/TeNT}- (gelb) und Kontrolltieren (blau) nachgewiesen werden. Dabei leckten Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/TeNT}-Tiere bei bestimmten Konzentrationen dieser Bittersubstanzen verhältnismäßig mehr als die Kontrolltiere.

3.7 Zwei-Flaschen-Präferenztests

Neben negativen und gesundheitsgefährdenden Eigenschaften können Bitterstoffe mitunter auch gesundheitsfördernde Wirkung besitzen. Solch positive Wirkungen könnten potenziell mit einem vermehrten Konsum der Bittersubstanz einhergehen.

Zur Überprüfung, ob Mäuse von sich aus Bittersubstanzen konsumieren, wurden verschiedene Zwei-Flaschen-Präferenztests mit C57BL/6-Mäusen durchgeführt. Dazu wurden Lösungen von sechs verschiedenen Bittersubstanzen in unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt. Anschließend wurde den Mäusen während des 48-h-Zwei-Flaschen-Präferenztests jeweils eine Bitterlösung einer Konzentration sowie Wasser *ad libitum* präsentiert (siehe 2.7). Um Positioneffekte auszuschließen, wurden nach 24 h die Positionen der Flaschen getauscht. Nachfolgend werden die Ergebnisse dieser Tests für jede Substanz in der jeweiligen Konzentration dargestellt. Gezeigt werden die konsumierten Mengen von Bitterlösungen und Wasser (siehe Abb. 3.41, Tab. A 15). Der Flüssigkeitsverlust durch Verdunstung wurde in einem separaten Test bestimmt und bei den nachfolgenden Ergebnissen berücksichtigt. Die Zwei-Flaschen-Präferenztests zeigten, dass Mäuse, wie zu erwarten, mehr Wasser tranken als die jeweilige Bitterlösung. Außerdem wurden die Bitterlösungen mit ansteigender Konzentration stärker vermieden (siehe Abb. 3.41). Dieser Effekt war bis auf Sucroseoctaacetat bei allen Bitterlösungen erkennbar. Alle Bitterlösungen wurden von den Mäusen zumindest am Anfang des Experiments konsumiert bzw. probiert. Für wenige Bitterlösungen wie Chinin (1 mM) konnte auch gegen Ende des 48-h-Experiments noch ein geringer Konsum der Lösung beobachtet werden. Generell wurden die hohen Konzentrationen der Bitterlösungen am Anfang konsumiert und zum Ende hin vermieden (siehe Abb. 3.42).

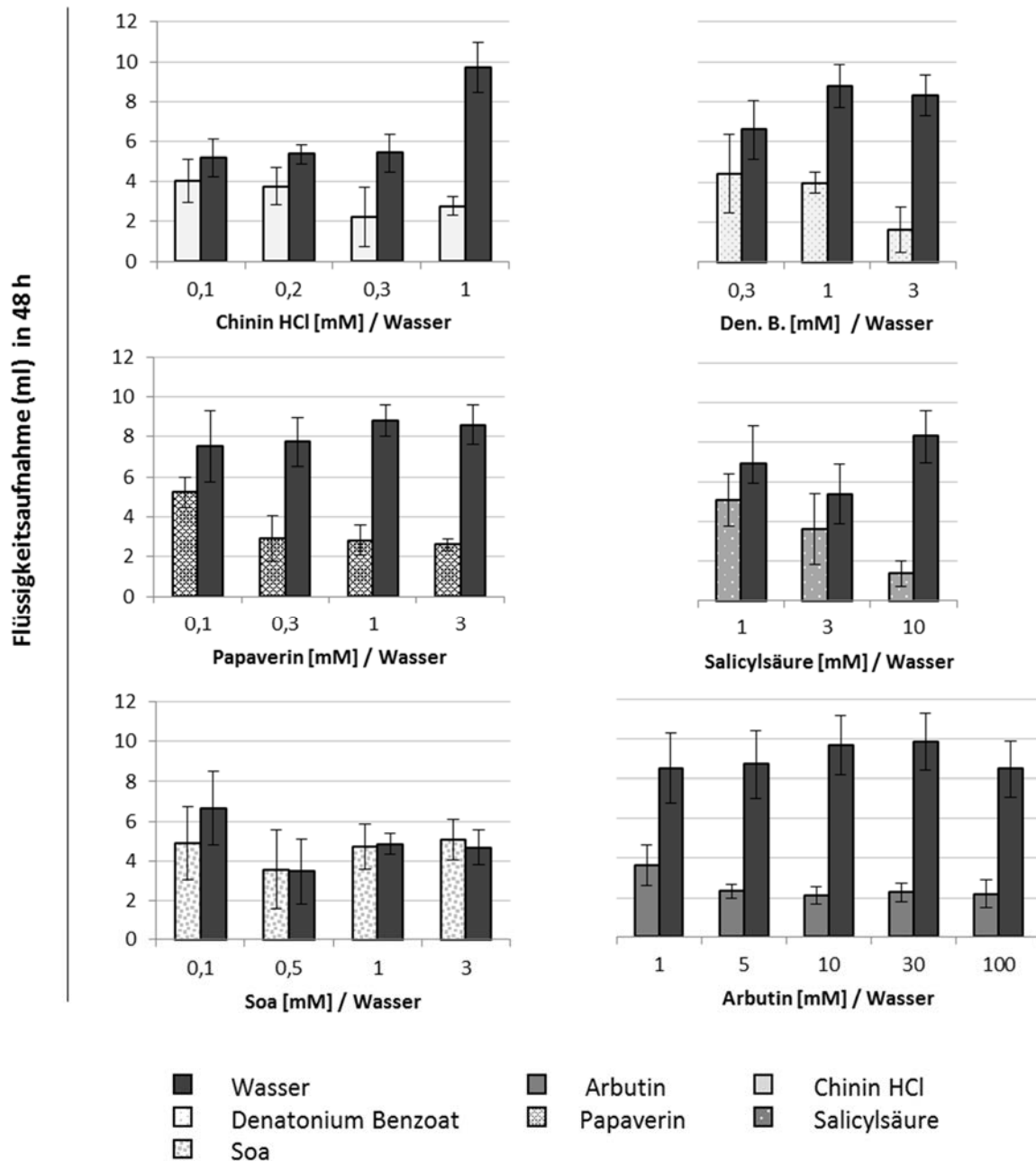


Abbildung 3.41 Zwei-Flaschen-Präferenztests über einen Zeitraum von 48 h. Getestet wurde die Flüssigkeitsaufnahme in ml der Bitterstofflösungen Chinin, Denatoniumbenzoat, Papaverin, Salicylsäure, Sucroseoctaacetat (Soa) und Arbutin in unterschiedlichen Konzentrationen (in mM) im Vergleich zu Wasser. Es erfolgte ein Positionswechsel der zwei Flaschen nach 24 h. Die Ergebnisse zeigten, dass C57BL/6-Tiere gering konzentrierte Bitterlösungen freiwillig konsumieren. Mit steigender Konzentration nimmt die Aufnahme der Bitterlösung ab. Generell wurde Wasser der präsentierten Bitterlösung bevorzugt. Eine Ausnahme zeigt sich beim Test von Lösungen mit Soa, welche ähnlich konsumiert wurden wie Wasser. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung von acht Tieren (n = 8).

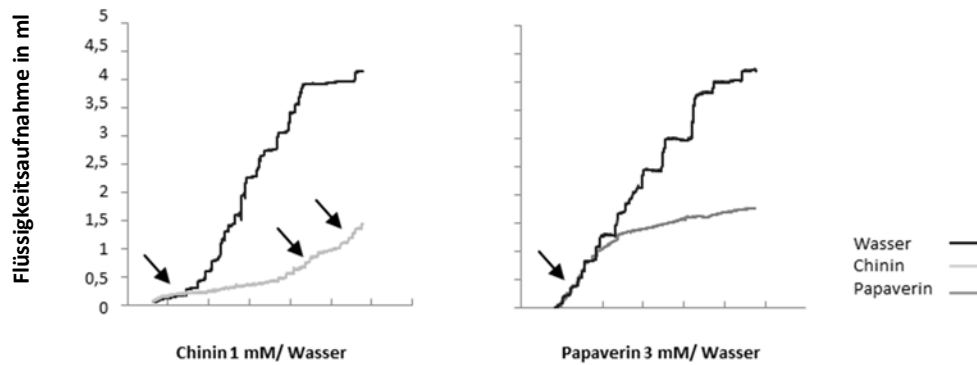


Abbildung 3.42 Einzeldarstellung der konsumierten Flüssigkeiten. Flüssigkeitsaufnahme von Wasser (schwarz) und Chininlösung (1 mM, hellgrau) oder Papaverin (3 mM, dunkelgrau) einer C57BL/6-Maus. Dargestellt sind die aufgenommenen Flüssigkeitsmengen nach dem Wechsel der Trinkflaschen im Zeitraum 24-48 h des Experiments. Die Chininlösung wurde am Anfang sowie am Ende der Aufzeichnung von der Maus konsumiert (Pfeile). Die Papaverinlösung wurde nur am Anfang von der C57BL/6-Maus aufgenommen (Pfeil).

Substanz	Aktivierte Rezeptoren
Arbutin	Tas2r126
Chinin	Tas2r105, Tas2r108, Tas2r115, Tas2r126, Tas2r137, Tas2r140, Tas2r144
Denatoniumbenzoat	Tas2r105, Tas2r123, Tas2r135, Tas2r140, Tas2r144
Papaverin	Tas2r144
Salicylsäure	Tas2r135
Soa	Tas2r117

Tabelle 3.2 Ligand-Rezeptor-Beziehung von Bittersubstanzen im Zwei-Flaschen-Präferenztest. Darstellung verwendeter Bittersubstanzen sowie die Bittergeschmacksrezeptoren, die sie aktivieren. Das Liganden-Rezeptor-Spektrum wurde durch Dr. Kristina Loßow (DIfE) erstellt.

Im Anschluss an die Untersuchungen des Flüssigkeitskonsums von Bitterlösungen und Wasser wurden im zweiten Teil der Zwei-Flaschen-Präferenztests zwei verschiedene Bitterlösungen gegeneinander getestet. Die Kombinationen, welcher Bitterstoff in welcher Konzentration gegen einen anderen getestet wurde, wurden auf Grundlage des ersten Teilversuches zusammengestellt. Hierzu wurde das Verhältnis aus durchschnittlichem Konsum der Bitterlösung einer bestimmten Konzentration gegenüber Wasser herangezogen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die gepaarten Bitterstofflösungen ähnliche Verhältnisse aufwiesen und so möglichst jede der sechs Bitterlösungen mit einer der anderen fünf getestet werden konnte (siehe Anhang Tab. A16). Da die ersten Zwei-Flaschen-Präferenztests mit Soa gegenüber Wasser keinen Vermeidungseffekt in höheren Konzentrationen zeigten, wurde im zweiten Teil nur ein Zwei-Flaschen-Präferenztests mit einer Soa-Lösung durchgeführt.

Die Studien zeigten, dass insgesamt weniger Flüssigkeit konsumiert wurde als bei einer Kombination aus Bitterlösung und Wasser. Ferner wurden einige Bitterlösungen stärker konsumiert als andere. So nahmen die Mäuse durchschnittlich 6,9 ml Arbutinlösung (10 mM) und nur 0,61 ml einer Lösung von 3 mM Denatoniumbenzoat auf, obwohl ein annähernd gleiches Leckverhältnis zu Wasser bestand (0,219 vs. 0,196) (siehe Abb. 3.43 und Anhang 17). Andererseits wurden einige Bitterlösungen wie Papaverin (3 mM) gegen Chinin (1 mM) sowie Denatoniumbenzoat (3 mM) gegen Salicylsäure (10 mM) annähernd gleich konsumiert.

Eine Arbutinlösung wurde im Vergleich zu anderen Bitterlösungen stets bevorzugt. Eine Lösung von Denatoniumbenzoat (1 bzw. 3 mM) wurde mehr konsumiert als eine Chinin- (0,2 mM) bzw. Papaverinlösung (3 mM). Eine Salicylsäurelösung (1 bzw. 3 mM) wurde gegenüber einer Papaverin-

(0,1 mM) bzw. Chininlösung (0,2 mM) präferiert. Eine grobe Einschätzung der Präferenz dieser fünf Bitterstoffe ist daher:

Arbutin > Denatoniumbenzoat und Salicylsäure > Chinin und Papaverin (siehe Abb. 3.43, Tab. A17).

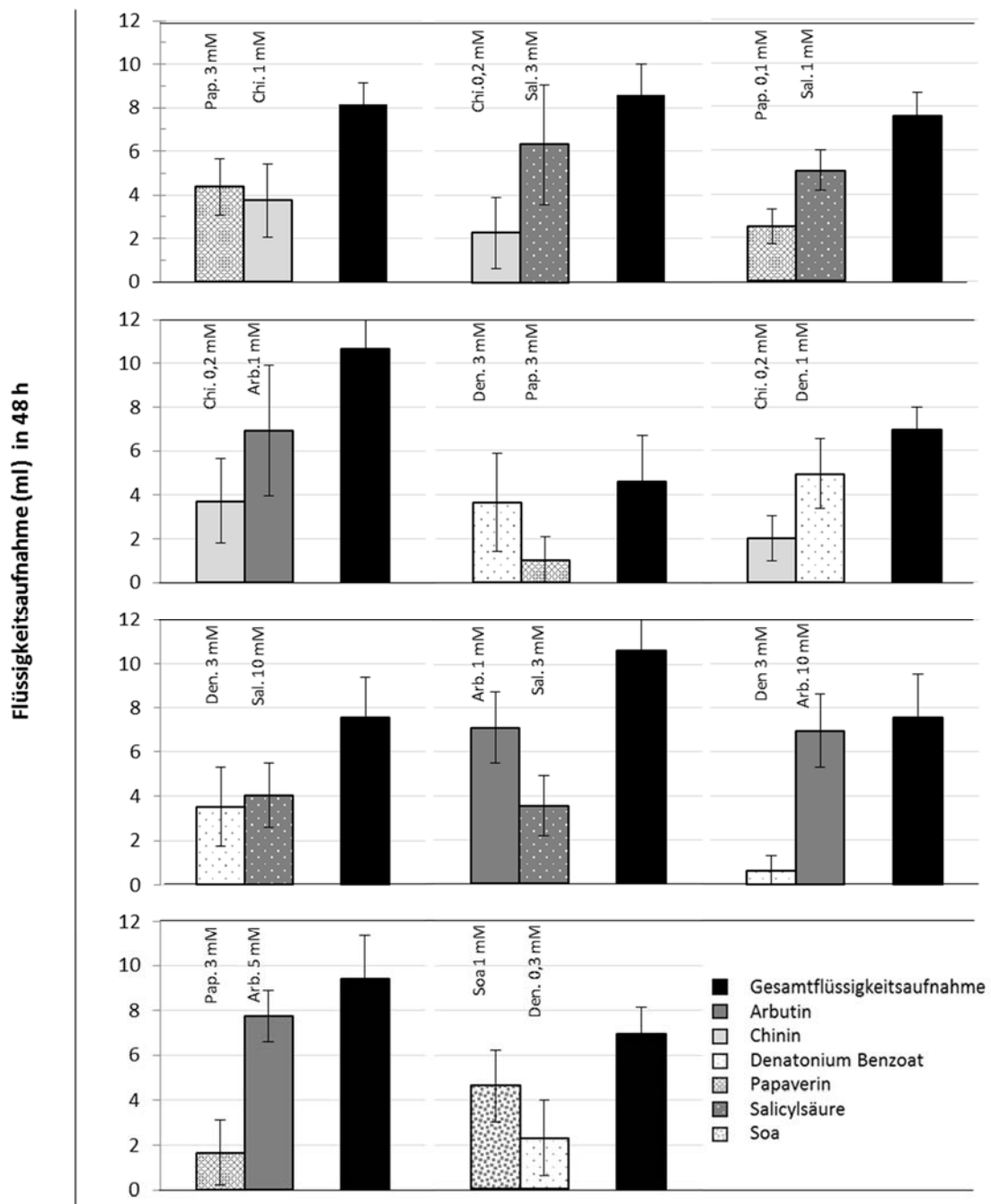


Abbildung 3.43 Zwei-Flaschen-Präferenztests Bittersubstanz gegen Bittersubstanz. Über einen Zeitraum von 48 h wurde die Flüssigkeitsaufnahme in ml von zwei verschiedenen Bitterlösungen getestet. Folgende Bittersubstanzen wurden verwendet: Chinin, Denatoniumbenzoat, Papaverin, Salicylsäure, Sucroseoctaacetat (Soa) und Arbutin. Die Konzentrationen (mM) der getesteten Substanzen wurden im Vorfeld basierend auf dem Leckverhältnis zu Wasser zusammengestellt. Es erfolgte ein Positionswechsel der zwei Flaschen nach 24 h. Die Ergebnisse dieser Zwei-Flaschen-Präferenztests zeigten, dass in den meisten Fällen eine Bittersubstanzlösung gegenüber der anderen präferiert wurde. In einigen Fällen wurden beide Bitterlösungen vergleichbar konsumiert. Im Vergleich zu Zwei-Flaschen-Präferenztests mit Bittersubstanzen gegen Wasser, konnte hier gezeigt werden, dass insgesamt weniger Flüssigkeit von den Mäusen konsumiert wurde. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung, Gruppengröße n = 10-12.

4. Diskussion

4.1 Tas2r-Expressionsanalysen im zentralen Nervensystem

4.1.1 Tas2r-Expression

Die Expressionsanalysen dieser Arbeit zeigten, dass in der thalamischen Region, im medialen Mesencephalon und im Cerebellum insgesamt 25 der 35 Bitterrezeptoren der Maus nachweisbar waren (siehe Abb. 3.4). Dies deckt sich mit den wenigen Angaben aus früheren Studien. So konnten Dehkordi und Kollegen sowie Singh und Kollegen in Rattenhirnen eine Expression der Rezeptoren T2R1, T2R10, T2R4 und T2R38 beobachten (Singh et al., 2011, Dehkordi et al., 2012). Die Expression der orthologen Mausrezeptoren Tas2r119, Tas2r110, Tas2r108 und Tas2r138 wurde in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen (siehe Abb. 3.4, 3.6, 3.7, 3.8). Dagegen konnten Dehkordi und Kollegen keine Expression der Rezeptoren T2R16 und T2R26 im Hirnstamm und Cerebellum von Ratten detektieren (Dehkordi et al., 2012). Andere Rezeptoren wurden von ihnen nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit gelang indes der Nachweis der Expression der orthologen Bitterrezeptoren der Maus Tas2r108 und Tas2r109 sowie vieler weiterer Tas2rs (siehe Abb. 3.2, 3.4, 3.7). Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression des Bitterrezeptors Tas2r131 im peripheren und zentralen Nervensystem der Maus (Voigt et al., 2015a) bestätigt (siehe Abb. 3.4, 3.14, 3.15). Studien mit Gehirngewebe von Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen wiesen ebenfalls im menschlichen Gehirn auf eine Bitterrezeptorexpression von T2R4, T2R5, T2R10, T2R13, T2R14 und T2R50 hin (Ansoleaga et al., 2013, Ansoleaga et al., 2015). Die Expression der vier orthologen murinen Bitterrezeptoren Tas2r109, Tas2r110, Tas2r113 und Tas2r129 dieser sechs humanen Bitterrezeptoren konnte in der vorliegenden Studie belegt werden (siehe Abb. 3.4). Die orthologen Mausrezeptoren Tas2r104 für T2R4 und Tas2r105 für T2R5 konnten dagegen nicht nachgewiesen werden. Andere Rezeptoren wurden in den Studien von Ansoleaga und Kollegen nicht untersucht (Ansoleaga et al., 2013, Ansoleaga et al., 2015). Mögliche Gründe für solche Unterschiede des Tas2r-Nachweises sind eine zu geringe Expression der Rezeptoren (Foster et al., 2014) oder die Verschiedenheit der Spezies (Malki et al., 2015). Generell konnten Expressionsanalysen aus früheren Studien in dieser Arbeit zum überwiegenden Teil bestätigt werden.

4.1.2 Tas2r-Expressionsmuster in Abhängigkeit der chromosomalen Lage

Für 20 der 25 exprimierten Tas2rs konnte eine ähnliche Expression sowie vergleichbare Expressionspegel in den verschiedenen Gehirnregionen detektiert werden. Für fünf Rezeptoren war eine Expression nur sporadisch je nach Region und Mauslinie, für zehn Rezeptoren war keine Expression nachweisbar.

Es stellt sich daher die Frage, warum einige Rezeptoren exprimiert werden, andere dagegen nicht. Tas2r-Gene scheinen, sofern benachbart auf dem Chromosom liegend und in derselben Leserichtung transkribiert, ähnlich exprimiert zu werden. Ein Beispiel hierfür wäre die Expression von Tas2r143, Tas2r135 und Tas2r126, deren Gene im Abstand von 5-30 kB auf Chromosom 6 im Bereich C1 liegen (siehe Abb. A1). Zudem können auch Tas2r-Gene, die im Gehirn nicht exprimiert werden, benachbart

auf dem Chromosom liegen. Als Beispiel sind die Rezeptoren Tas2r130, Tas2r107, Tas2r106, Tas2r104, Tas2r105 und Tas2r114 zu nennen, deren Gene in einem Abstand von 3-30 kB auf Chromosom 6 im Bereich F3 liegen und in derselben Leserichtung transkribiert werden (siehe Abb. A1).

Auch die Expressionspegel benachbarter Tas2r-Gene waren im Gehirn vergleichbar. Als Beispiel sei erneut auf die Rezeptoren Tas2r143, Tas2r135 und Tas2r126 verwiesen (siehe Abb. 3.3).

Das lässt auf eine Abhängigkeit der Expression sowie der Expressionspegel zur relativen Lage der Tas2r-Gene im Genom schließen (siehe Abb. 3.4, siehe Abb. A1). Folglich scheinen Bitterrezeptoren in bestimmten Mustern bzw. Clustern exprimiert zu werden. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits im Zungengewebe (Hübner, 2014), im Gastrointestinaltrakt (Prandi, 2015) und im Herzen von Mäusen (Foster et al., 2013) beschrieben. In der vorliegenden Arbeit deutet sich dies ebenfalls bei den Expressionsanalysen im Rückenmark und im PNS an. De Plaen und Kollegen konnten eine solche Expressions-Lage-Beziehung für die Genfamilie MAGE (*melanoma-associated antigen*) beobachten. Sie zeigten, dass sechs der zwölf benachbarten Gene eine ähnliche Expression in Tumorgeweben aufwiesen. Wie bei den Tas2rs lag eine hohe Ähnlichkeit der kodierenden Sequenz zwischen den Genen vor (De Plaen et al., 1994, Conte et al., 2003, Shi et al., 2003).

Expressionsmuster können auf gemeinsame Transkriptions-Regulationselemente hindeuten. Bis heute ist allerdings nur wenig über Transkriptionsfaktoren oder regulatorische Elemente der Tas2rs bekannt. Auch die Promotorregionen der Tas2rs sind bislang nicht aufgeklärt. Foster und Kollegen zeigten mittels *In-silico*-Analysen neue Bereiche auf, die ein regulatorisches Potential bei der Tas2r-Expression im Herz besitzen könnten (Foster et al., 2015). Auch die bioinformatischen Analysen von Prandi zeigten, dass verschiedene cis-regulatorische Elemente als Transkriptionsfaktoren dienen könnten. Untersucht wurden potentielle Promotorregionen bis 1 kB vor dem Startcodon der Tas2r-Gene. Die Analysen zeigen, dass Bindemotive für eine Reihe von gemeinsam genutzten cis-regulatorischen Elementen (cis-RE) wie YY1, C/EBP α , c-Fos, c-Jun und NF-k β für alle Tas2r existieren, die im Gastrointestinaltrakt exprimiert wurden. Darüber hinaus wurden auch cis-RE-Bindungsmotive entdeckt wie HNF (*hepatocyte nuclear factor*) oder Pax5 (*paired box protein 5*), die speziell nur bei einigen Tas2rs auftreten (Prandi, 2015). Prinzipiell würde das auf gemeinsame und separat genutzte Transkriptionsfaktoren für Tas2rs hindeuten und könnte folglich die Tas2r-Expressions-Lage-Beziehung erklären.

In-silico-Analysen können nur mögliche Zusammenhänge mathematisch prognostizieren und so einen Anstoß für neue Theorien bieten. Anschließend sind experimentelle Studien notwendig, um diese Theorien zu bestätigen oder zu widerlegen. Im Fall der Tas2r-Expressions-Lage-Beziehung wäre es daher interessant, alle 35 Rezeptoren auf gemeinsame Bindemotive von Transkriptionsfaktoren zu untersuchen und diese anschließend zu testen.

4.1.3 Ubiquitäre gegen selektive Tas2r-Expression

Für 15 der 35 Rezeptoren konnte eine Expression in den Bereichen thalamische Region, mediales Mesencephalon und Cerebellum detektiert werden. Einige dieser 15 Rezeptoren werden in allen Gehirnregionen exprimiert. Dazu zählen Rezeptoren wie Tas2r118, Tas2r134 und Tas2r137. Dagegen zeigte sich, dass einige andere Rezeptoren nur in bestimmten Regionen exprimiert werden. Eine Expression des Tas2r119 konnte in den *Bulbi olfactorii*, der thalamischen Region, im Hypothalamus, im Mesencephalon und in der Medulla oblongata detektiert werden. Im *Cortex cerebri* und im Cerebellum war er dagegen nicht exprimiert. Das deckt sich mit den Studien von Dehkordi und

Kollegen. Sie zeigten, dass in Ratten der T2R1 im Hirnstamm, aber nicht im Cerebellum exprimiert wird (Dehkordi et al., 2012). Der dazugehörige orthologe Rezeptor in Mäusen ist der Tas2r119.

Weitere Beispiele für eine selektive Tas2r-Expression im Gehirn von Mäusen sind die Rezeptoren Tas2r110 und Tas2r117. Diese wurden bis auf die *Bulbi olfactorii* in allen untersuchten Gehirnregionen exprimiert (siehe Abb. 3.2). Weiterhin scheint der Tas2r136 vorwiegend in der thalamischen Region exprimiert zu werden. In anderen Regionen konnte keine oder nur eine sporadische Expression des Rezeptors detektiert werden.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass einige Bitterrezeptoren wie der Tas2r108, Tas2r126, Tas2r135, Tas2r137 und Tas2r143 ubiquitär in allen Gehirnregionen exprimiert werden. Andere Bitterrezeptoren wie der Tas2r110, Tas2r117, Tas2r119 und Tas2r136 werden spezifisch nur in einigen Gehirnregionen exprimiert.

Eine selektive Expression einiger Tas2rs könnte auch in verschiedenen Geweben vorliegen. So wurden im Blut und im Muskelgewebe im Vergleich zum ZNS nur relativ wenige Tas2rs nachgewiesen (Hübner, 2014; siehe Abb. 3.4, siehe Abb. A2.). Einige Tas2rs scheinen daher nur in bestimmten Geweben exprimiert zu werden. Neben der Expression im Geschmacksgewebe wurde der Tas2r131 beispielsweise in Hoden, Ovarien, Atemwegen, Thymus sowie im peripheren und zentralen Nervensystem von Mäusen nachgewiesen (Voigt et al., 2015b). Prandi und Kollegen zeigten die Expression des Tas2r119 und Tas2r138 in verschiedenen Bereichen des Gastrointestinaltrakts (Prandi et al., 2013). Dagegen konnte keine RNA von Tas2r119, Tas2r131 und Tas2r138 im Blut und im nicht-gustatorischen Zungenepithel, das keine Geschmackssinneszellen aufweist, nachgewiesen werden (Hübner, 2014). Beide Beispiele könnten folglich auf eine generell gewebeabhängige Expression einiger Tas2rs hindeuten.

4.1.4 Tas2r-Expressionsstärke

Die Analysen der Tas2rs zeigten unterschiedliche Expressionsstärken im Gehirn. Die Rezeptoren Tas2r108, Tas2r126, Tas2r135, Tas2r137 und Tas2r143 wiesen neben der ubiquitären Expression auch stets die höchsten Expressionspegel auf. Im Vergleich dazu konnten für die ubiquitär vorkommenden Tas2r118 und Tas2r138 in allen Gehirnregionen wesentlich niedrigere Expressionspegel detektiert werden.

Geht man davon aus, dass in allen Regionen eine ähnliche Expression des Referenzgens β -Actin stattfindet, scheinen einige Tas2rs in bestimmten Gehirnarealen stärker exprimiert zu werden. Die Rezeptoren Tas2r108, Tas2r126, Tas2r137 und Tas2r143 zeigten jeweils die höchsten Expressionspegel im Cerebellum auf. Der Tas2r143 beispielsweise wies dort eine um den Faktor 10-100 stärkere Expression auf, als in den anderen Regionen (siehe Abb. 3.2). Für Tas2r134 wurde dagegen die höchste Expression im Hypothalamus und die niedrigste im Cerebellum detektiert. Das deutet auf eine selektiv verstärkte Expression der Tas2rs in der jeweiligen Gehirnregion hin.

Im Vergleich zur Wallpapille im Zungengewebe scheint die Tas2r-Expressionsstärke im Gehirn von Mäusen generell geringer zu sein. So lagen die Tas2r-Expressionspegel im Verhältnis zum Expressionsniveau von β -Actin im Gehirn mit einem Faktor von ca. 4-20.000 niedriger als in der Wallpapille. Auch Voigt und Kollegen zeigten für den Tas2r131 geringe Expressionspegel im Hypothalamus und im Hirnstamm (Voigt et al., 2015b). Einzig für das Cerebellum konnten in der vorliegenden Arbeit für Tas2r108, Tas2r126, Tas2r135, Tas2r137 und Tas2r143 ähnliche, zum Teil höhere, Expressionsniveaus als im Zungengewebe beobachtet werden (siehe Abb. 3.11, 3.12) (Hübner, 2014). Gegenüber dem Magen und Colon der Maus konnten im Gehirn für Tas2r108 und

Tas2r118 höhere Expressionspegel detektiert werden. Für Tas2r119 und Tas2r138 zeigten sich dagegen höhere Expressionspegel im Duodenum bzw. im Colon als im ZNS (siehe Abb. 3.2) (Prandi et al., 2013). Grundsätzlich könnten diese Unterschiede der Expressionsstärke auf gewebsspezifische Tas2r-Expressionsmuster hindeuten.

Ein Vergleich der Tas2r-Expressionsstärken in Organen und Geweben anderer Studien sind indes nur bedingt möglich. Oftmals werden andere Referenzgene wie GAPDH, RNA-Polymerase II A oder β 2-Mikroglobulin verwendet (Grassin-Delyle et al., 2013, Clark et al., 2015, Malki et al., 2015). Teils wird die Tas2r-Expressionstärke im Gewebe nur als Verhältnis zu einer Kontrollgruppe angegeben (Foster et al., 2013, Ansoleaga et al. 2013, Malki et al. 2015, Foster et al. 2015). Auch ein Vergleich zwischen verschiedenen Spezies ist kaum möglich. So zeigten Leukozyten von Menschen und Rindern teils erhebliche Unterschiede in der Tas2r-Expression bzw. -Expressionsstärke (Malki et al., 2015). Ähnliches konnte auch in der Studie von Foster und Kollegen gezeigt werden, in der die Tas2rs-Expression im Herz von Menschen und Nagetieren untersucht wurde (Foster et al., 2013).

Mitunter ist auch ein Vergleich verschiedener Gewebe einer Spezies nur bedingt möglich. Kouadjo und Kollegen zeigten teils signifikante Unterschiede in der Expression der Referenzgene GAPDH und β -Actin. Beide Gene werden demnach insbesondere im Hoden und der Prostata geringer exprimiert als in anderen Geweben (Kouadjo et al., 2007). Zwischen dem *Cortex cerebri* und dem Hypothalamus konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede von β -Actin detektiert werden, sodass hier der Vergleich möglich ist. Ein Vergleich der Tas2r-Expressionsniveaus zeigt, dass alle untersuchten und nachgewiesenen Bitterrezeptoren im Hypothalamus stärker exprimiert werden als im *Cortex cerebri* (siehe Abb. 3.4), was ebenfalls auf eine gewebespezifische Tas2r-Expression hindeutet.

4.1.5 Tas2r-Expressionsanalysen in Tas2r131^{BLIG}-, Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA}- und Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}-Mäusen

Die Expressionsanalysen der 35 Bitterrezeptoren in Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA}-Tieren zeigten, dass in der Wallpapille nach Elimination der Tas2r131-Zellpopulation auch andere Tas2r-Populationen beeinträchtigt waren. Die Reduktion der Expressionsniveaus von Bitterrezeptoren wies auf eine Koexpression des Tas2r131 mit anderen Tas2rs in der Zunge hin. Dabei zeigte sich, dass einerseits die Expressionspegel von 32 Rezeptoren stark bis mittelgradig reduziert waren. Für die zwei Rezeptoren Tas2r126 und Tas2r134 wurden andererseits vergleichbare, für Tas2r143 sogar erhöhte Expressionsniveaus in Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/DTA}-Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren detektiert. Diese Rezeptoren scheinen daher in der Zunge nicht mit dem Tas2r131-Rezeptor koexprimiert zu werden (Hübner, 2014).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der 35 Bitterrezeptoren in Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA}-Tieren in drei verschiedenen Gehirnregionen untersucht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Wallpapille konnte bis auf den Tas2r131 hier für keinen Bitterrezeptor eine signifikante Reduktion der Expressionsniveaus in Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/DTA}-Tieren nachgewiesen werden. Für 20 der 25 nachgewiesenen Rezeptoren konnten ähnliche Expressionspegel wie in den Kontrolltieren gezeigt werden. Bei einigen Rezeptoren trat indes ein erhöhtes Expressionsniveaus auf (siehe Abb. 3.6, 3.7, 3.8). Das deutet an, dass der Bitterrezeptor Tas2r131 im Gehirn nicht mit anderen Tas2rs koexprimiert wird. Ähnliches konnte auch im Rückenmark und im peripheren Nervensystem detektiert werden. Folglich scheint eine neuronale Zelle zu einem gegebenen Zeitpunkt entweder Tas2r131 oder einen bzw. mehrere andere Tas2rs zu exprimieren. Ob andere Tas2rs, ebenso wie der Tas2r131, allein oder mit anderen Tas2rs in derselben neuronalen Zelle

koexprimiert werden, kann derzeit nicht abschließend geklärt werden. Zur Untersuchung dieser Hypothese bräuchte man mindestens ein weiteres Tas2rX^{BLIC}-Mausmodell, welches derzeit allerdings nicht verfügbar ist. Wenn vorhanden, wäre ein solches Tas2rX^{BLIC}-Mausmodell mit einer Rosa26^{DTA}-Maus zu verpaaren. Anschließende qRT-PCR-Analysen der Tas2r-Expression im zentralen Nervensystem dieser Tas2rX^{BLIC}/Rosa26^{DTA} Mäuse könnten Rückschlüsse zulassen, ob eine bzw. keine Koexpression mit anderen Tas2r vorliegt.

Darüber hinaus zeigten die qRT-PCR-Analysen für die Rezeptoren Tas2r109, Tas2r103 und Tas2r140 eine stärkere Expression in Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+DTA}- und Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+TeNT}-Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren (siehe Abb. 3.10, 3.11). Weiterhin wurde auch in Tas2r131^{BLIG}-Tieren ein signifikant erhöhtes Expressionsniveau für den Tas2r109 im Vergleich zu C57BL/6-Tieren nachgewiesen. Die Eliminierung des Tas2r131-Rezeptors, der Tas2r131-Zellen sowie der Störung der synaptischen Weiterleitung in Tas2r131-Neuronen scheint dabei einen Einfluss auf die Expression von einigen wenigen Bitterrezeptoren zu besitzen. Das Besondere dieser Rezeptoren könnte die chromosomale Lage ihrer Gene sein. So befinden sich die Gene für Tas2r109, Tas2r103 und Tas2r140 vor dem Tas2r131-Gen und werden in derselben Transkriptionsrichtung abgelesen. Insbesondere der Tas2r109, zeigte in den Gehirnregionen die höchste Steigerung der Expressionspegel in Tas2r131^{BLIG}-, in Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+DTA}- und in Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+TeNT}-Tieren. Dabei liegt das Tas2r109-Gen mit nur 23 kB sehr nah vom Tas2r131-Gen entfernt. Die Gene für Tas2r103 und Tas2r140 sind bereits 79 kB und 98 kB vom Tas2r131-Gen entfernt (siehe Abb. A1). Im Gegensatz dazu liegt das Tas2r129-Gen mit 5 kB Abstand zum Tas2r131-Gen näher als die drei anderen Gene, allerdings befindet sich die kodierende Sequenz auf dem Gegenstrang (siehe Abb. A1). Für den Tas2r129 konnte nur im Cerebellum eine gesteigerte Expression detektiert werden. Im medialen Mesencephalon sowie in der thalamischen Region der Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+DTA}-Tiere konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden. Folglich scheint die Abhängigkeit der erhöhten Expression der Gene Tas2r109, Tas2r103, Tas2r140 sowie Tas2r129 sowohl mit der Nähe zum Tas2r131-Gen als auch mit deren Transkriptionsrichtung und sich daraus ergebenden gemeinsamen Nutzung von Transkriptions-Regulationselementen zu existieren. So scheint allein das Fehlen des Tas2r131-Rezeptors in Tas2r131^{BLIG}-Tieren zu einer verstärkten Expression des Tas2r109 zu führen. Dieser Effekt ist allerdings ca. 100-fach stärker, wenn die Tas2r131-Zellpopulation eliminiert oder die synaptische Weiterleitung der Tas2r131-Neuronen unterbrochen ist, wie dies in Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+DTA}- und in Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+TeNT}-Tieren der Fall ist. Möglicherweise ist dies ein additiver Effekt der einerseits durch das Fehlen des Rezeptors zustande kommt, andererseits scheint die fehlende neuronale Signaltransmission der Tas2r131-exprimierenden Zellen (Tas2r131-Zellen) zu diesem Effekt beizutragen.

Möglicherweise stehen Tas2r131-Zellen mit Tas2r109-, Tas2r103- und Tas2r140-Zellen im ZNS in Kontakt. Durch das Fehlen Tas2r131-Zellen bzw. durch die Unterbrechung der synaptischen Weiterleitung bekommen Tas2r109-, Tas2r103- und Tas2r140-Zellen im ZNS keine Informationen mehr von Tas2r131-Zellen. Dieses fehlende Signal könnte zu einer erhöhten Expression der drei Rezeptoren in ihren neuronalen Zellen führen. Die Frage wäre nun, ob diese Rezeptoren die bisher unbekannt Funktionen des Tas2r131-Rezeptors bzw. der Tas2r131-Zellen ersetzen bzw. kompensieren. Ähnliche Mechanismen wurden von Van Wart und Matthews beschrieben. Normalerweise besteht zwischen den spannungsabhängigen Natrium-Kanälen Typ I eine distinkte Trennung bezüglich ihrer regionalen und zellulären Expression im postnatalen ZNS (Trimmer und Rhodes, 2004). Van Wart und Matthews zeigten, dass in gentechnisch modifizierten Mäusen der Verlust des Natriumkanals Na_v1.6 (Typ I, α -Untereinheit 6) in Purkinje-Zellen des Cerebellum durch den verwandten Nav1.1-Kanal (Typ I, A-Untereinheit 1) teilweise kompensiert werden kann. Andere

neuronalen Zellen reagierten dagegen auf den Verlust von mit einer erhöhten Expression von Na_v1.2 (Typ I, α -Untereinheit 2), ebenfalls ein verwandter Kanal. Die Kompensationsmechanismen ermöglichten es den Mäusen trotz des gravierenden Verlusts von Na_v1.6-Kanälen mit Beeinträchtigungen wie der Lähmung der Hinterbeine bis zu drei Wochen zu überleben (Van Wart und Matthews, 2006).

Auch Marder und Goillard beschreiben ein übergeordnetes neuronales Netzwerk in der Entwicklung eines Embryos. So zeigten Gonzalez-Islas und Wenner, dass die Blockade von spontaner neuronaler Netzwerkaktivität im Rückenmark durch Lidocain in Hühnerembryonen zu Kompensationsmechanismen im gesamten ZNS führt. So konnten an GABAergen und glutamatergen Synapsen gesteigerte neuronale Aktivitäten detektiert werden (Marder und Goillard, 2006, Gonzalez-Islas und Wenner, 2006). Solche Kompensationsmechanismen könnten auch bei einem Ausfall bzw. Verlust eines Tas2rs bzw. der Tas2r-exprimierenden Zelle greifen.

Demgegenüber wäre auch eine Beteiligung des Tas2r131 bzw. der Tas2r131-Zellen an einem negativen Rückkopplungs-Mechanismus denkbar. In diesem Fall wären die Tas2r131-Zellen ein Hauptregulator für Tas2r109-, Tas2r103-, und Tas2r140-Zellen. Der Wegfall neuronaler Signale von Tas2r131-Zellen in Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+DTA}- und in Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+TeNT}-Tieren würde die suppressive Funktion auf Tas2r109-, Tas2r103-, und Tas2r140-Zellen aufheben. Dies könnte einerseits zu einer erhöhten Expression dieser Rezeptoren innerhalb der Zellen führen, andererseits könnten auch mehr Tas2r109, Tas2r103- und Tas2r140-Zellen im ZNS existieren. Ob und wenn ja, welche der beiden Optionen zu trifft, kann bislang nicht abschließend geklärt werden.

4.1.6 Tas2r-Expression im Nervensystem und in peripheren Geweben

In der vorliegenden Arbeit konnten im Gehirngewebe mit 25 von 35 Tas2rs ein Großteil der Bitterrezeptoren nachgewiesen werden. Expressionsstudien im Gastrointestinaltrakt konnten hingegen mit 15 von 35 weit weniger Tas2rs detektieren (Prandi, 2015). Auch im Herzen von Mäusen gelang lediglich der Nachweis von 7 (Foster et al., 2013), im Blut von 5 Tas2rs. Im Zungengewebe werden dagegen alle 35 Tas2rs exprimiert (Hübner, 2014).

Weiterhin zeigte sich in der Studie von Hübner eine Expression der fünf Rezeptoren Tas2r108, Tas2r126, Tas2r135, Tas2r137 und Tas2r143 auch in weiteren Organen. Der Tas2r108 wurde beispielweise im Immun-, Reproduktions-, Respirations-, Gastrointestinalgewebe sowie im peripheren und zentralen Nervensystem nachgewiesen (Hübner, 2014). Auch im Herz und im Blut konnte eine Expression des Tas2r108 sowie die Rezeptoren Tas2r126, Tas2r135, Tas2r137 und Tas2r143 detektiert werden (Foster et al., 2013, Hübner, 2014). Bestandteile des Blutes wie Leukozyten können durch Diapedese in das Gewebe eindringen, wo sie an der Abwehr von Erregern beteiligt sind (Janeway et al., 1999). Malki und Kollegen zeigten kürzlich eine Expression von Bitterrezeptoren in fünf leukozytären Zelltypen im Blut von Mensch und Rindern (Malki et al., 2015). Dies legt die Frage nahe, ob die hohen Expressionspegel der fünf oben benannten Tas2rs in peripheren Organen und im Gehirn auf eine Migration von Leukozyten in das Gewebe zurückzuführen sind. Diese Migration wird dabei durch Signale ausgelöst, die bei Entzündung oder Infektion freigesetzt werden. Leukozyten können so beispielsweise im Lymphknoten, Thymus, Milz und Knochenmark oder ins Muskel-, Fett-, und Bindegewebe vorkommen. In der vorliegenden Arbeit wurde anhand des *Musculus quadriceps femoris* die Expression des Tas2r126 und des Tas2r143 im Skelettmuskel nachgewiesen. Acht weitere Tas2rs wurden dort nicht exprimiert (siehe Abb. A2, Tab.

A11). Die Detektion der Tas2r126- und Tas2r143-RNA könnte daher durch die bereits erwähnte Einwanderung von Leukozyten zu erklären sein.

Im Gegensatz zur Peripherie gelangen unter normalen Bedingungen weder Pathogene, Antigene oder Leukozyten durch die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS (Janeway et al., 1999). Nur bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Multipler Sklerose, einem Hirninfarkt (ischämischer Schlaganfall) oder Diabetes mellitus kann die Barriere beschädigt und so ein Eindringen von Leukozyten ermöglicht werden (Horani und Mooradian, 2003, Yong, 2005, Huber et al., 2006, Correale und Villa, 2007). Folglich sollte die Expression der fünf Tas2rs im Gehirn nicht maßgeblich von einer Expression in Leukozyten beeinflusst sein. Zu Bedenken ist allerdings, dass im ZNS nicht Leukozyten, sondern Mikroglia-Zellen für die Antigenpräsentationen und Phagozytose sorgen (Gehrmann, 1996, Dissing-Olesen et al., 2007). Da bisher nur für den Tas2r131 eine Expression in Neuronen gezeigt wurde (Voigt, unpubliziert), könnten andere Bitterrezeptoren prinzipiell auch in Glia-Zellen exprimiert werden. Interessant wäre daher zu prüfen, ob die fünf Rezeptoren Tas2r108, Tas2r126, Tas2r135, Tas2r137 und Tas2r143 wie in der Peripherie (Malki et al., 2015) auch im ZNS in Zellen der Immunabwehr vorkommen. Dazu sollen Studien erfolgen, die die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit RNA-Sonden für Tas2r135 und Tas2r137 und immunhistochemischen Färbungen mit Antikörpern für Neurone wie NeuN sowie Marker für Glia-Zellen wie GFAP (Astrozyten), CNP (Oligendozyten) und CD11b (z.B. Mikroglia-Zellen) kombinieren.

4.2 Identifizierung Tas2r-exprimierender Zellen

4.2.1 Detektion von Tas2r-exprimierenden Zellen mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Ein Nachweis von Bitterrezeptoren im zentralen und peripheren Nervensystem erfolgte bisher vorwiegend durch qRT-PCR-Analysen. Die zelluläre Lokalisation im Gewebe der Tas2rs ist daher weitestgehend unbekannt. Allein für den T2R4 zeigten Singh und Kollegen mittels immunhistochemischer Färbungen erste zelluläre Signale im Hirnstamm von Ratten (Singh et al., 2011). Eine Lokalisation auf Zellebene in anderen Gehirnregionen bzw. anderer Bitterrezeptoren wurde bisher nicht gezeigt.

Auch in Wildtypmäusen konnten bislang Bitterrezeptoren im ZNS nicht direkt visualisiert werden. Nur mit Hilfe der Mausmodelle Tas2r131^{BLIG}, Tas2r131^{BLIC/Rosa26^{tdRFP}} und Tas2r131^{BLIC/Rosa26^{tauGFP}} konnte zumindest der Tas2r131 indirekt durch die Fluoreszenzreportergene im Gehirn nachgewiesen werden (Voigt et al., 2012, Prandi et al., 2013, Voigt et al., 2015b). Neben dem Fehlen spezifischer Tas2r-Antikörper ist aufgrund der teils sehr geringen Expressionspegel eine Visualisierung der Bitterrezeptoren im ZNS schwierig.

Die vorliegende Arbeit zeigte die Expression von 25 Bitterrezeptoren im Gehirn. Viele der Rezeptoren werden im Vergleich zur Zunge allerdings um einen Faktor mit bis zu 20.000 geringer exprimiert. Die geringe Expressionsstärke erschwert daher die Tas2r-Detektion im Gehirn. Auf Grundlage der zuvor präsentierten Tas2r-Expressionsanalysen (siehe Abb. 3.6, 3.7, 3.8) war es nun erstmals möglich, gezielt Rezeptoren aufgrund ihrer hohen Expressionsstärke auszuwählen und deren RNA-Expression im Gehirn zu visualisieren.

Für die Identifizierung und Charakterisierung der Tas2r-exprimierenden Zellen (Tas2r-Zellen) wurden zunächst spezifische Tas2r-Antisense- und -Sense-RNA-Sonden generiert und deren Funktionalität im Zungengewebe bestätigt (siehe Abb. 3.17). Die Auswahl der Tas2r-RNA-Sonden erfolgte anhand der zuvor durchgeführten Expressionsanalysen mittels qRT-PCR (siehe Abb. 3.7, 3.8). Es wurden die

Rezeptoren Tas2r123, Tas2r135 und Tas2r137 aufgrund ihrer hohen Expressionsniveaus und Tas2r105 aufgrund nicht nachweisbarer Expression in C57BL/6-Tieren ausgewählt. Zusätzlich wurde eine Sonde für Tas2r109 generiert und auf Gehirngewebe von Tas2r131^{B^LI^C}/Rosa26^{D^TA} getestet, da hier eine ca. 300-fache Erhöhung der Expressionspegel im Vergleich zu Kontrolltieren vorliegt. Das ist insbesondere interessant, da bislang nicht bekannt ist, ob wenige Zellen deutlich mehr Transkripte aufweisen, oder ob viele Zellen das Tas2r109-Gen marginal mehr transkribieren. Neben den RNA-Sonden für die fünf genannten Tas2rs wurden ebenfalls eine Antisense- und Sense-Sonde für Gustducin auf Gehirnschnitten von C57BL/6-Tieren getestet.

Die Ergebnisse der *In-situ*-Hybridisierungsexperimente zeigten, dass eine Detektion Tas2r-exprimierender Zellen möglich ist. Tas2r135- und Tas2r137-exprimierende Zellen konnten in weiten Teilen des Gehirns auf zellulärer Ebene detektiert werden. Die intensivsten Signale konnten dabei im Cerebellum beobachtet werden (siehe Abb. 3.20). Das ist im Einklang mit den qRT-PCR-Expressionsanalysen, in denen Tas2r135 und Tas2r137 zu den Rezeptoren mit den höchsten Expressionspegeln gehörten und diese im Cerebellum die höchsten Werte erreichten (siehe Abb.3.8). Für den Tas2r123 zeigten sich nur im medialen Mesencephalon schwache Signale in der *In-situ*-Hybridisierung. Auch dieses Resultat stimmt mit den qRT-PCR-Ergebnissen überein, da die höchsten Expressionspegel von Tas2r123 in derselben Region detektiert wurden (siehe Abb. 3.7). Im Vergleich zu Tas2r135 und Tas2r137 ist der mittels qRT-PCR ermittelte Expressionspegel von Tas2r123 um einen Faktor von bis zu 100 niedriger. Das könnte den Unterschied zwischen den Signalstärken erklären.

Die FISH mit Sonden für Tas2r105 zeigte, wie erwartet, kein zelluläres Signal, da dieser Rezeptor mittels RT- bzw. qRT-PCR nicht nachweisbar war.

Trotz des erhöhten Expressionsniveaus von Tas2r109 im Gehirn von Tas2r131^{+/^{B^LI^C}/Rosa26^{+/^{D^TA}}-Tieren (siehe Abb. 3.6, 3.7, 3.8), konnte dieser Rezeptor ebenfalls nicht auf zellulärer Ebene nachgewiesen werden. Das lässt vermuten, dass die Expressionspegel des Tas2r109 zu gering sind (Faktor 250 geringer als für Tas2r135), um mittels FISH zelluläre Signale zu detektieren.}

Die geringen Tas2r-Expressionspegel konnten mit Ausnahme des Zungengewebes auch im Zuge anderer Studien in anderen Geweben beobachtet werden (Singh et al., 2011, Grassin-Delyle et al., 2013, Prandi et al., 2013, Voigt et al., 2015a, Wolfle et al., 2015). Das zeigt, warum ein direkter zellulärer Nachweis mittels FISH nur bei einigen wenigen stark exprimierten Tas2rs möglich ist.

Anhand der Morphologie und Lage der Tas2r135- und Tas2r137-exprimierenden Zellen im Cerebellum können bereits erste Vermutungen bezüglich des Zelltyps getroffen werden. Sowohl Tas2r135- als auch Tas2r137-exprimierende Zellen finden sich vorwiegend im *Stratum purkinjense* und *Stratum granulosum*. Demnach wäre auch eine Koexpression beider Rezeptoren möglich. Ein Vorkommen beider Tas2rs im *Stratum purkinjense* würde auf eine Expression in GABAergen Purkinje-Zellen hindeuten (Rakic, 1971, Schiebler und Korf, 2007). Bei den Zellen im *Stratum granulosum* könnten es sich sowohl um neuronale Körner- oder Golgi-Zellen als auch um Glia-Zellen handeln. Aufgrund der großen dunklen Zellkerne, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um Golgi-Zellen handelt (siehe Abb. 3.20; 4.1). Auch diese Neurone verfügen vorwiegend über den inhibitorischen Transmitter GABA (Ottersen et al., 1988). Ob die Tas2rs grundsätzlich in GABAergen oder auch in anderen Neuronenpopulationen exprimiert werden, wurde im Folgenden am Beispiel des Bitterrezeptors Tas2r131 analysiert.

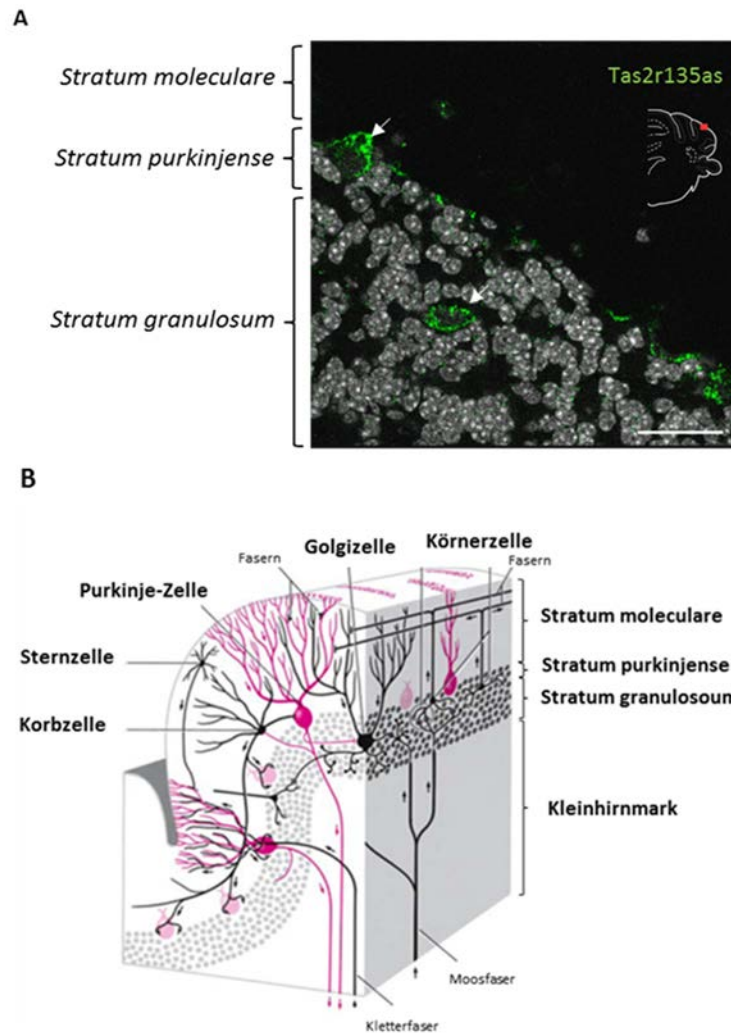


Abbildung 4.1 Lage von Tas2r135-exprimierenden Zellen im Cerebellum. (A) FISH –Tas2r135-exprimierende Zellen (Pfeil) (grün) wurden vorwiegend im *Stratum purkinjense* und *Stratum granulosum*, wenige im *Stratum moleculare* des Cerebellums detektiert. Zellkerne sind durch TOPRO-3-Iodid in grau dargestellt. Maßstab: 40 μ m. Bildausschnitt aus Abb. 3.20. (B) Schematische Darstellung der Zellschichten im Kleinhirn, modifiziert nach Schiebler und Korf, 2005, Genehmigung liegt vor.

4.2.2 Identifizierung des Zelltyps Tas2r131/tauGFP-exprimierender Zellen

4.2.2.1 Tas2r131/tauGFP-exprimierende Zellen sind mit verschiedenen Neuronenpopulationen kolokalisiert

Die Generierung des Mausmodells Tas2r131^{BLOC}/Rosa26^{tauGFP} durch Dr. Anja Voigt (DIfE) ermöglichte die Visualisierung Tas2r131-exprimierender Zellen durch den Fluoreszenzreporter tauGFP (Voigt et al., 2015b). Immunhistochemische Färbungen mit verschiedenen neuronalen Markern auf Gehirnschnitten dieser Mäuse zeigten die Kolokalisation von Tas2r131/tauGFP-exprimierenden Zellen (Tas2r131/tauGFP-Zellen) mit mehreren Neuronentypen. So konnten sowohl in cholinergen, dopaminergen, noradrenergen, glycinerg-angesteuerten und GABAergen Projektionsneuronen als auch in Interneuronen eine Expression von Tas2r131/tauGFP gezeigt werden. In glutamatergen Neuronen kann aufgrund der vesikulären Färbung der Antikörper bislang keine eindeutige Aussage über eine Expression von Tas2r131/tauGFP getroffen werden (siehe Abb. 3.24, 3.25).

Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Tas2r135-exprimierende und Tas2r131/tauGFP-Zellen stets α -Gustducin-exprimierende Zellen darstellen (siehe Abb. 3.31, 3.32). Diese Kollokationen konnten in weiten Teilen des Gehirns beobachtet werden. Die Kontrollfärbungen mittels Blockierungspeptid, spezifische Peptide, die an einen Antikörper binden und so deren Bindung an das Zielprotein verhindern, zeigten in beiden Fällen keine Signale. Das lässt vermuten, dass wie in der Zunge (McLaughlin et al., 1992) alle neuronalen Tas2r-Zellen α -Gustducin exprimieren.

Einzig für serotonerge und Enkephalin-positive Neurone konnte keine Überlappung mit Tas2r131/tauGFP-Zellen gezeigt werden. Da in dieser Studie allerdings nur die Tas2r131/tauGFP-Neuronenpopulation untersucht wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Tas2rs auch in serotonergen und Enkephalin-positiven Neuronen exprimiert werden. Dehkordi und Kollegen konnten beispielsweise zelluläre Signale für α -Gustducin und PLC- β 2 in serotonergen Neuronen der Raphe-Kerne und in nicht-serotonergen Neuronen detektieren (Dehkordi et al., 2012). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, wird α -Gustducin in verschiedenen Tas2r-Populationen exprimiert (siehe Abb. 3.31, 3.32), sodass ein Vorkommen in verschiedenen neuronalen Zelltypen möglich ist.

Ansoleaga und Kollegen zeigten kürzlich eine Dysregulation der Bitterrezeptorexpression in der Großhirnrinde von Patienten mit Schizophrenie. Sie vermuten einen möglichen Zusammenhang mit der Einnahme von Neuroleptika (Ansoleaga et al., 2015), die an Dopaminrezeptoren (vorwiegend postsynaptische D₂-Rezeptoren) binden und so eine Signalweiterleitung durch Dopamin hemmen (Karow und Lang-Roth, 2011). Dopaminrezeptoren werden dabei sowohl in exzitatorischen als auch in inhibitorischen Neuronen exprimiert (Sesack und Bunney, 1989, Vincent et al., 1993, Megias et al., 2001). Folglich könnten auch Tas2r131/tauGFP-Neurone exzitatorisch oder inhibitorisch sein.

Zukünftige Studien, wie beispielsweise die kombinierte Visualisierung von Tas2r135-RNA mittels FISH und Tas2r131/tauGFP-Neuronen mittels IHC, könnten die Ergebnisse der Expressionsanalysen bezüglich getrennter neuronaler Tas2r-Populationen verifizieren. Allerdings ist zu bedenken, dass, sobald die Cre-Rekombinase einmal die Stoppsequenz zwischen dem ubiquitär exprimierten Rosa26-Promoter und dem tauGFP entfernt, Tas2r131/tauGFP-Zellen den Fluoreszenzreporter GFP stetig exprimieren (Voigt et al., 2015b). Das bedeutet auch, dass eine bereits vergangene Aktivität des Tas2r131-Promotors noch zu einer fluoreszierenden Zelle führt. Für die Analyse einer aktuellen Aktivität des Promotors könnten z.B. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen für zwei unterschiedlich markierte Tas2r-Sonden wie Tas2r135 und Tas2r137 genutzt werden, die die aktuelle Expression angeben. So könnte eine potentielle Kollokation der Tas2rs bestätigt bzw. ausgeschlossen werden.

4.2.2.2 Beispiel einer Projektion Tas2r131/tauGFP-exprimierender Neurone in das Kerngebiet des Trapezkörpers

Die immunhistochemischen Studien zeigten, dass Nervenfasern von Tas2r131/tauGFP-Neuronen vom Rückenmark rostral entlang des *Tractus pyramidalis* (TP) bis auf Höhe des Trapezkörpers verlaufen (Abb. 3.35). Von dort ziehen die Fasern in den lateralen Teil des TP und schließlich ins Kerngebiet des Trapezkörpers (siehe Abb. 3.35, 3.33), wo eine Projektion auf dort befindliche Neurone stattfindet (siehe Abb. 3.34). Das Kerngebiet des Trapezkörpers (NCT) gilt, wie der benachbarte Kernkomplex *Nucleus olivaris superior* (NOS), zum auditiven System (siehe Abb. 4.2) (Hofmann, 1908, Ollo und Schwartz, 1979). Es scheint an einer Verarbeitung des räumlichen Hörens beteiligt zu sein (Brugge und Geisler, 1978, Masterton und Imig, 1984). Die Informationen werden dabei von den *Nuclei cochleares*, Kerngebieten im Hirnstamm, die als erste Umschaltstation der Hörbahn gelten, zum *Lemniscus lateralis* transportiert. Auf diesem Weg wird der Trapezkörper gekreuzt. Das Kerngebiet

des Trapezkörpers stellt dabei den Ursprung des *Lemniscus lateralis* dar (Graumann und Sasse, 2005). Darüber hinaus wird dem Kerngebiet des Trapezkörpers eine Reflexfunktion in der Augenbewegung, speziell die Blickrichtungsänderung zum akustischen Signal hin, zugeschrieben. Auch eine Beteiligung an der Frequenzdiskriminierung wird benannt (Frick et al., 1992).

Der benachbarte Nervenstrang, *Lemniscus medialis* (LM), dagegen übermittelt als Teil des Lemniskalen Systems Informationen der sensiblen Mechanosensorik wie Vibrationen und Druck zu lateralen Kernen des Thalamus (Trepel, 2003, Kamali et al., 2009). Der TP ist an der Weiterleitung von Informationen der Feinmotorik und der willkürlichen Motorik beteiligt (Lindblom und Ottosson, 1957, Lundberg und Voorhoeve, 1962, Valverde, 1966).

Die Lokalisation von Tas2r131/tauGFP-Fasern im Kerngebiet des Trapezkörpers könnte einerseits auf Funktionen dieser Zellen im auditiven System hindeuten. Andererseits lässt die Nähe zu motosensorischen Bereichen, wie dem *Lemniscus medialis*, Spekulationen nach weiteren Funktionen der Tas2r131/tauGFP-Neurone zu (siehe Abb. 4.2). Interessant wäre daher zu prüfen, ob die Mausmodelle, in denen Tas2r131-Zellen eliminiert (*Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA}*) bzw. Tas2r131-Neurone in ihrer Weiterleitung gestört werden (*Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}*), einen besonderen Phänotyp bezüglich des Hörsinns aufweisen.

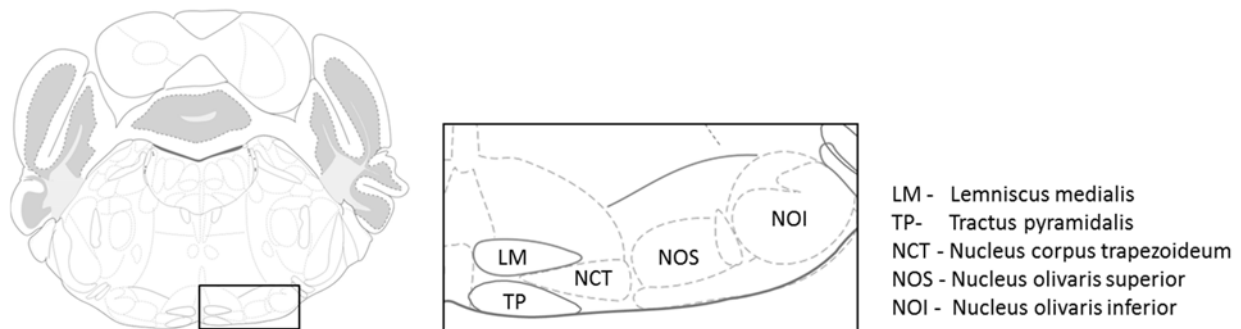


Abbildung 4.2 Schematische Darstellung des Kerngebiets des Trapezkörpers. Darstellung des *Nucleus corpus trapezoideum* (NCT) und benachbarter Regionen im Bereich des caudalen Pons. Bregma -5,34 mm.

4.3 Tas2r131-exprimierende Neurone

4.3.1 Arc-Expression im NPG

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass nach Bitterstimulation von Mäusen eine erhöhte Zahl *Arc*-exprimierender Zellen im NTS und im PBN detektierbar ist (Töle, 2013, Tyree, unpubliziert). Beide Regionen sind an der Weiterleitung und Verarbeitung der Geschmacksinformation im Gehirn beteiligt (Galindo et al. 2012).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ferner eine *Arc*-Expression im NPG von C57BL/6-Mäusen nachgewiesen werden. Die Analysen zeigen, dass nach oraler Stimulation mittels Bittersubstanzen eine signifikant erhöhte Zahl *Arc*-exprimierender Zellen im Vergleich zum Kontrollstimulus im NPG detektiert werden kann. Dies trifft sowohl auf Stimulation mit Cucurbitacin, Cycloheximid oder Chinin als auch auf eine Kombination mehrerer Bittersubstanzen zu (siehe Abb. 3.36, 3.37). Das deckt sich mit den Ergebnissen aus dem NTS und PBN (Töle, 2013, Tyree, unpubliziert).

Im Vergleich zu den ca. 7000 Zellen im NPG (Liebl et al., 1997, Dewilde et al., 2007) stellen die *Arc*-exprimierenden Zellen allerdings nur einen geringen Anteil von ca. 1-3 % je nach Bitterstimulus und

0,3 % nach Applikation einer Kontrollsubstanz dar (Abb. 3.37, Tab. A12). Auch die *Tas2r131*-exprimierenden Neurone im NPG stellen mit ca. 0,2 % nur einen geringen Anteil dar (Voigt, unpubliziert).

Der überwiegende Teil der *Arc*-Expression findet in einer speziellen Gruppe von Ganglienzellen statt. Diese sind durch einen größeren Durchmesser und einen dunkel gefärbten Kern gekennzeichnet (siehe Abb. 4.3, Kreis mit Pfeil). Unterschiedliche Arten von Zellen im NPG konnten bereits durch frühere Studien gezeigt werden. So unterscheiden sie sich bezüglich der Expression verschiedener Rezeptoren oder dem Vorhandensein und Größe der Myelinscheide (Gallego und Eyzaguirre, 1978, Streit et al., 1985, Zhou et al., 1996, Ueno et al., 1999, Ruan und Burnstock, 2003).

Scherrer und Kollegen zeigten, dass im Spinalganglion von Mäusen stark myelinisierte δ -Opioid-Rezeptor-Neurone deutlich größer sind und einen größeren Zellkern besitzen als TRPV1-Neurone (transient receptor potential vanilloid 1/Capsaicin-Rezeptor) (Scherrer et al., 2009, Le Pichon und Chesler, 2014). Darüber hinaus zeigte Radtke im NPG der Ratte, dass neuronale NO-Synthase- (NOS) und Substanz P (SP)-exprimierende Neurone zu Zellen mit kleinem Zellkern gehören (siehe Abb. 4.3 B) (Radtke, 2007).

In Anlehnung an die Studien von Radtke sowie Scherrer und Kollegen könnten *Arc*-exprimierende Zellen mit ihrem großen Zellkern zu den stärker myelierten Neuronen wie δ -Opioid-Rezeptor-Neurone zählen. Im Gegensatz dazu würden TRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1/Capsaicin-Rezeptor) oder nNOS (neuronale NO-Synthase) in einer anderen nicht-*Arc*-exprimierenden Neuronenpopulation mit kleineren Zellen und Zellkernen exprimiert (Le Pichon und Chesler, 2014). Zur näheren Charakterisierung der *Arc*-exprimierenden Zellen könnten Kollaborationsstudien mit spezifischen neuronalen Markern für Opioid-Rezeptoren oder TRPV1 und nNOS untersuchen, ob diese gemeinsam oder in unterschiedlichen Zellen im NPG exprimiert werden. Ganglienzellen im NPG könnten die elektrischen Signale bzw. Informationen über mehrere Neurotransmitter ins Gehirn weiterleiten (Zhou et al., 1996). Daher wären auch Kombinationen mehrerer neuronaler Zelltypen möglich.

Darüber hinaus wäre auch vorstellbar, dass *Arc*-exprimierende Neuronen, die durch orale Bitterstimulation angesprochen werden, ebenfalls Bitterrezeptoren exprimieren. Eine Beteiligung von *Tas2r131*-Neuronen könnte zukünftig durch eine Kombination aus *Arc*-FISH-Analysen und Visualisierung des *Tas2r131*-Rezeptors in *Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{tauGFP}*-Mäusen bestätigt oder widerlegt werden.

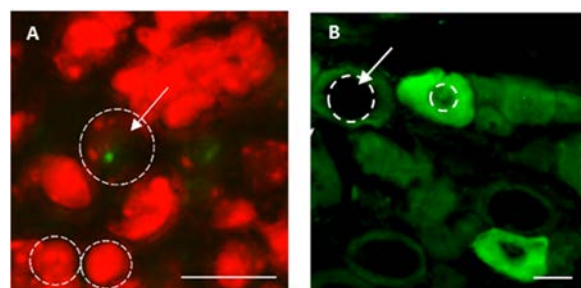


Abbildung 4.3 Darstellung verschiedener neuronaler Zelltypen im NPG. (A) *Arc*-exprimierende Zellen (grüner Punkt) besitzen einen großen und wenig gefärbten Zellkern (Kreis mit Pfeil). Zellen mit kleineren und stark angefärbten Zellkernen exprimieren meist kein *Arc* (gestrichelte Kreise), Zellkernfärbung durch DAPI in rot. (B) Darstellung verschiedener neuronaler Zelltypen im NPG von Ratten durch Färbung von nNOS (neuronale NO-Synthase, grün). nNOS befindet sich vorwiegend in neuronalen Zellen mit kleinem Zellkern. Eine Zelle mit großem Zellkern ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Modifiziert mit Genehmigung nach Anne Radtke, 2007. Maßstab: 20 μ m

4.3.2 Arc-Expressionsanalysen in Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}-Tieren stützen die Funktionalität des Tier-Modells

Im Mausmodell Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT} wird in Tas2r131-exprimierenden Zellen (Tas2r131-Zellen) die leichte Kette des Tetanustoxins exprimiert. Diese spaltet Synaptobrevin, das an der Vesikelausschüttung an der präsynaptischen Membran beteiligt ist, proteolytisch (Baumert et al., 1989, Bock und Scheller, 1999, Yamamoto et al., 2003, Zhang et al., 2008). Infolgedessen wird die Informationsweiterleitung betroffener Tas2r131-Neurone unterbrochen. Die schwere Kette des Toxins vermittelt die Bindung an Ganglioside und enthält zudem eine Translokationsdomäne, welche die Aufnahme in die Zellen ermöglicht. Die schwere Kette ist in diesem Modell nicht vorhanden, sodass eine neuronale Verbreitung des Toxins auf andere Neuronen ausgeschlossen werden kann (Montecucco und Schiavo, 1995, Pellizzari et al., 1999). Zur Prüfung, ob die Expression des Tetanustoxins in Tas2r131-Neuronen einen Einfluss auf die Signalübertragung im PNS oder erst im ZNS nach der ersten synaptischen Verschaltung besitzt, wurden im peripheren Nervensystem im NPG sowie im zentralen Nervensystem im NTS quantitative Analysen mittels *Arc-in-situ*-Hybridisierung durchgeführt. Die Auswahl der beiden Substanzen Papaverin und Cycloheximid erfolgte dabei basierend auf den ersten Kurzzeitpräferenztests, die im nächsten Abschnitt diskutiert werden, sowie *In-vitro*-Experimenten zum Liganden-Rezeptor-Spektrum. Papaverin, welches allein den Tas2r144-Rezeptor aktiviert, wurde getestet, da erste Kurzzeitpräferenztests einen Unterschied im Leckverhalten zwischen Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}-Mäusen zeigten. Im Gegensatz dazu war bei Cycloheximid kein Unterschied im Leckverhalten zwischen Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}-Mäusen festzustellen (siehe 3.6). Cycloheximid wird allein durch den Tas2r105-Rezeptor detektiert (*In-vitro*-Daten, Loßow, unpubliziert).

Die Ergebnisse stützen das hier vorgestellte Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}-Mausmodell. Wie erwartet kam es nach oraler Stimulation mit zwei Bittersubstanzen im NPG zu keiner Veränderung der Zahl Arc-exprimierender Zellen in Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+TeNT}- und Kontrolltieren (siehe Abb. 3.38). Folglich hat die Expression des Tetanustoxins keinen Einfluss auf die Signalübertragung der Geschmacksinformationen zum NPG.

Im NTS, nach der ersten synaptischen Verschaltung, konnte dagegen nach Stimulation mit Papaverin eine signifikant reduzierte Zahl von Arc-Signalen in Tas2r131^{+BLIC}/Rosa26^{+TeNT}- im Vergleich zu den Kontrolltieren nachgewiesen werden. Nach Stimulation mit Cycloheximid wurde erwartungsgemäß (siehe Kurzzeitpräferenztests 4.3.3) eine ähnliche Anzahl Arc-exprimierender Zellen detektiert (siehe Abb. 3.39).

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse daher das Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}-Mausmodell. Darüber hinaus deuten die Unterschiede im NTS nach Stimulation mit zwei Bitterstimuli bereits auf eine unterschiedliche Verarbeitung der Geschmacksinformationen hin. So scheint die Unterbrechung der Signalweiterleitung in Tas2r131-Neuronen nur einen Einfluss auf die Verarbeitung der Geschmacksinformation von Papaverin zu haben, nicht aber auf die von Cycloheximid. Inwieweit diese Unterschiede auch im Leckverhalten der Mäuse sichtbar werden, wurde in mehreren Kurzzeitpräferenztests überprüft.

4.3.3 Kurzzeitpräferenztests mit Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}-Mäusen

Die Kurzzeitpräferenztests zeigten, dass in Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}-Mäusen mit gestörter synaptischer Signalweiterleitung in Tas2r131-exprimierenden Neuronen (Tas2r131-Neurone) für die

Geschmacksqualitäten süß, umami, salzig und sauer keine Unterschiede im Leckverhalten zu den Kontrolltieren nachweisbar waren (siehe Abb. 3.41). Die Informationsweiterleitung bzw. -verarbeitung dieser Geschmacksqualitäten scheint demnach nicht mittels Tas2r131-Neuronen zu erfolgen.

Im Gegensatz dazu konnten für die Geschmacksqualität bitter Unterschiede im Trinkverhalten der Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden (siehe Abb. 3.40).

Kurzzeitpräferenztests mit Bittersubstanzen wie Chinin, Cycloheximid und Acesulfam K zeigten wie bei den anderen Geschmacksqualitäten ein gleiches Leckverhalten zwischen Tas2r131^{+/*BLIC*}/*Rosa26*^{+/*TeNT*}- und Kontrolltieren (siehe Abb. 3.40). Folglich scheinen Tas2r131-Neuronen auch für diese Substanzen keinen Einfluss auf die Informationsweiterleitung bzw. -verarbeitung zu haben.

Demgegenüber zeigten Kurzzeitpräferenztests mit den Substanzen Papaverin, Chlorhexidin, Cucurbitacin I und Erythromycin Unterschiede im Leckverhalten von Tas2r131^{+/*BLIC*}/*Rosa26*^{+/*TeNT*}- und Kontrolltieren. So werden diese Substanzen von Tas2r131^{+/*BLIC*}/*Rosa26*^{+/*TeNT*}-Mäusen vermehrt geleckt und daher vermutlich vermindert wahrgenommen (siehe Abb. 3.40). Tas2r131-Neurone scheinen demnach eine Rolle bei der Informationsweiterleitung bzw. -verarbeitung dieser Bittersubstanzen zu spielen. Insbesondere für Papaverin und Chlorhexidin zeigte sich ein signifikanter Unterschied des Leckverhaltens über mehrere Konzentrationsstufen hinweg. Auf Grundlage von *In-vitro*-Studien werden beide Substanzen allein durch den Bitterrezeptor Tas2r144 detektiert (Loßow, unpubliziert). Folglich scheint die Übertragung bzw. Verarbeitung der Geschmacksinformation über den Rezeptor Tas2r144 eng mit den Tas2r131-Neuronen gekoppelt zu sein.

Für Erythromycin, welches laut *In-vitro*-Studien ausschließlich den Rezeptor Tas2r123 aktiviert, zeigte sich ebenfalls eine Tendenz erhöhter Leckraten in Tas2r131^{+/*BLIC*}/*Rosa26*^{+/*TeNT*}-Mäusen (siehe Abb. 3.40). Im Vergleich zu Papaverin und Chlorhexidin war dieser Effekt jedoch geringer ausgeprägt. Die Detektion von Cucurbitacin I wird durch die zwei Bitterrezeptoren Tas2r105 und Tas2r114 vermittelt (*In-vitro*-Daten, Loßow, unpubliziert). Wie die Kurzzeitpräferenztests zeigten, scheinen auch hier Tas2r131-Neurone zum Teil an der Weiterleitung und Integration dieser Geschmacksinformation beteiligt zu sein.

Wie in Abschnitt 1.5.4 erwähnt, wurden Tas2r131-Zellen entlang der Geschmacksbahn von der Geschmacksknospe in der Zunge über periphere Nervenfasern und Ganglionzellen bis ins zentrale Nervensystem nachgewiesen. Die Vermutung liegt daher nahe, dass Tas2r131-Neurone eine spezielle Geschmacksbahn für die Wahrnehmung einiger spezieller Bitterstoffen darstellen. Im Folgenden wird diese hypothetische Bahn als Tas2r131-Bitterbahn bezeichnet.

Die Tas2r131-Bitterbahn wäre auf Grundlage der Kurzzeitpräferenztest-Daten unabhängig von Geschmacksbahnen, die die Informationen anderer Qualitäten wie süß, umami, salzig oder sauer übertragen (siehe Abb. 4.4 A-D). Verfolgt man die Hypothese der unterschiedlichen Bittergeschmacksbahnen weiter, könnten je nach aktiviertem Rezeptor unterschiedliche „Bitterbahnen“ existieren. Eine Tas2r131-Bitterbahn würde demnach an der Verarbeitung der Geschmacksinformation von Papaverin und Chlorhexidin (Tas2r144) beteiligt sein. Bei höheren Konzentrationen von Papaverin und Chlorhexidin zeigten sich dagegen keine Unterschiede mehr im Leckverhalten der Tiere (siehe Abb. 3.40). Allerdings sei zu beachten, dass Bitterstoffe in hohen Konzentrationen auch andere Sinnesqualitäten wie den Geruchssinn oder das Trigeminale System ansprechen und so wahrnehmbar sind. Darüber hinaus könnten bei sehr hohen Konzentrationen auch andere Bitterrezeptoren aktiviert werden, deren Aktivierung im *In-vitro*-Experiment bislang nicht nachweisbar war. Folglich könnte eine „Tas2r144-Bitterbahn“ stark mit der Tas2r131-Bitterbahn überlappen; sie wird bzw. muss allerdings nicht identisch sein (siehe Abb. 4.4 G).

Eine „Tas2r123-Bitterbahn“, die die Geschmacksinformation von Erythromycin weiterleitet und verarbeitet, würde folglich auch mit der Tas2r131-Bitterbahn überlappen, allerdings zu einem geringeren Ausmaß (siehe Abb. 4.4 F).

Dagegen würden nach den Ergebnissen der Kurzzeitpräferenztests eine „Tas2r105-Bitterbahn“ bzw. eine „Tas2r135-Bitterbahn“, die die Geschmacksinformation von Cycloheximid bzw. Acesulfam K übermitteln, nicht mit einer Tas2r131-Bitterbahn zusammenverlaufen (siehe Abb. 4.4 E).

Die Wahrnehmung von Chinin, Denatoniumbenzoat und PROP wird dagegen über mindestens fünf Rezeptoren vermittelt (Loßow, unpubliziert). Eine Kombination mehrerer Rezeptoren sowie die Affinität am Rezeptor erschwert daher Aussagen bezüglich möglicher Überlappungen mit der Tas2r131-Bahn.

Die Geschmacksinformation von Cucurbitacin I wird durch die zwei Bitterrezeptoren Tas2r105 und Tas2r114 vermittelt (*In-vitro*-Daten, Loßow, unpubliziert). Da für die „Tas2r105-Bahn“, wie bereits dargestellt, vermutlich keine Überlappung mit einer Tas2r131-Bahn existiert, scheinen die Unterschiede im Kurzzeitpräferenztest durch die Informationsverarbeitung über die „Tas2r114-Bahn“ vermittelt zu werden. Wie groß der Grad der Überlappung allerdings ist, lässt sich anhand der Ergebnisse bislang nicht ermessen. Auch Interaktionen mit anderen „Bitterbahnen“ könnten möglich sein. Wie oben gezeigt, war die Expression nicht aller Rezeptoren im Gehirn nachweisbar (siehe Abb. 3.6, 3.7, 3.8), Es erfolgt dennoch eine Verarbeitung der Geschmacksinformationen von allen Substanzen, auch wenn deren Rezeptoren nicht im ZNS exprimiert werden. Daher könnten Bitterrezeptoren, die keine eigene „Bitterbahn“ besitzen, andere „Bitterbahnen“ zur Weiterleitung und Verarbeitung mitnutzen.

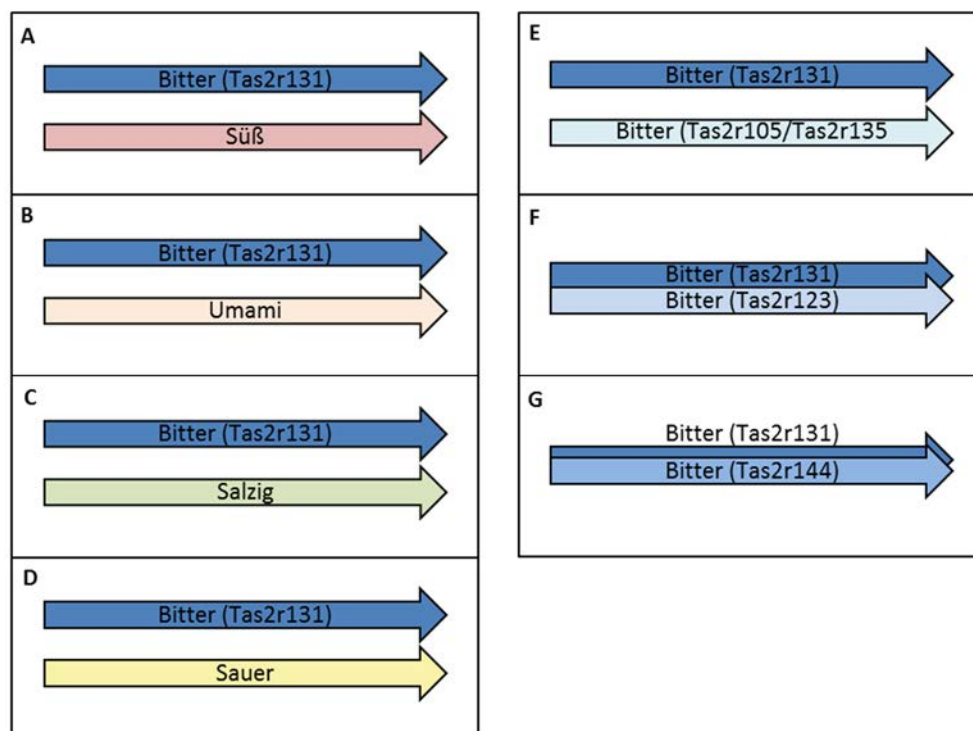


Abbildung 4.3 Schematische Darstellung der unterschiedlichen Geschmacksbahnen. (A-D) Die hypothetischen Geschmacksbahnen zur Informationsübertragung der Geschmacksqualitäten süß, umami, salzig und sauer sind von der postulierten Geschmacksbahn der Tas2r131-Neurone separiert. (E-G) Unterschiedliche Bahnen der Geschmackswahrnehmung für den Bittergeschmack. Bitterstoffe, die die Rezeptoren Tas2r105 oder Tas2r135 aktivieren, scheinen unabhängig der Tas2r131-Bittergeschmacksbahn verarbeitet zu werden (E). Für Stoffe, die den Rezeptor Tas2r123 aktivieren, scheinen geringe Überlappungen (F), für Tas2r144 große Überlappungen mit der Tas2r131-Bittergeschmacksbahn zu existieren (G).

Kurzzeitpräferenztests mit Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA}-Mäusen, deren gesamte Tas2r131-Zellpopulation eliminiert ist, zeigten einen größeren phänotypischen Effekt, des längeren Leckens einiger Bittersubstanzen als Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}-Mäuse mit gestörter synaptischer Weiterleitung in Tas2r131-Neuronen sowie Kontrolltieren (siehe Abb. 4.5). Wie oben beschrieben wird der Tas2r131-Rezeptor in der Zunge mit anderen Tas2rs koexprimiert. Eine Elimination der Tas2r131-Zellen führt daher auch zu einem Verlust anderer Bitterrezeptoren im Zungenepithel, sodass ein stärker ausgeprägter Phänotyp auftreten kann. In Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}-Mäusen ist dagegen die Tas2r131-Zellpopulation vorhanden, lediglich die neuronale Informationsweiterleitung ist in Tas2r131-Neuronen eingeschränkt. Die Expression anderer Tas2rs auf der Zunge ist nicht verändert (siehe Abb. 3.12). Als ein Beispiel für die unterschiedlichen Leckantworten von Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA}- und Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}-Mäusen sind in Abbildung 4.5 die Dosis-Wirkungskurven für Papaverin dargestellt. Im Verhältnis zu Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA}- und Kontrolltieren zeigen Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}-Mäuse eine nur teilweise verminderte Aversion gegenüber Papaverin. Dies konnte ebenfalls bei Kurzzeitpräferenztests mit Chlorhexidin, Erythromycin und Cucurbitacin I beobachtet werden (siehe Abb. A3). Darüber hinaus konnten in Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA}-Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren auch für weitere Substanzen wie Chinin und Cycloheximid Unterschiede im Leckverhalten nachgewiesen werden. In allen Fällen leckten die Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA}-Tiere häufiger die jeweilige Substanz als die Kontrolltiere.

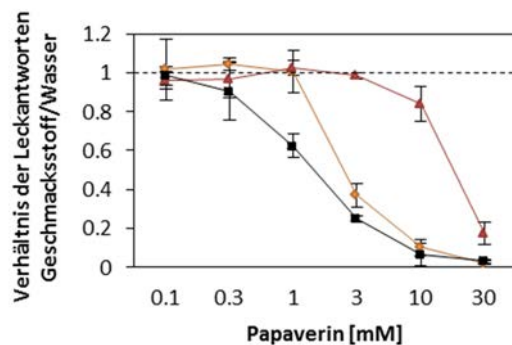


Abbildung 4.4 Dosis-Wirkungskurven von Kurzzeitpräferenztests mit Papaverin und Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA}- und Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}-Mäusen. Daten der Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA}-Mäuse, in denen die gesamte Tas2r131-Zellpopulation eliminiert ist, sind in Rot dargestellt, deren Kontrolltiere in schwarz. Die Daten der Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}-Mäuse mit unterbrochener synaptischer Weiterleitung in Tas2r131-Neuronen sind in Gelb dargestellt. Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}-Tiere zeigen für Papaverin eine Dosis-Wirkungskurve auf, die zwischen der von Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA}- und Kontrolltieren liegt. Die Abbildung wurde erstellt in Kooperation mit Dr. Sabine Frenzel.

Kurzzeitpräferenztests mit einer Bittersubstanz, die den Tas2r131-Rezeptor aktiviert, wären zu Prüfung der Tas2r131-Bitterbahn von entscheidender Bedeutung. Leider gehört der Tas2r131 zu den 14 von 35 Bitterrezeptoren, die bislang noch nicht deorphanisiert wurden (*In-vitro*-Daten, Loßow, unpubliziert). Andere Tas2rX^{BLIC}-Mausmodelle, bei denen potente Liganden vorhanden sind, sind derzeit ebenfalls nicht verfügbar.

Für das vorhandene Tas2r131^{BLIC}-Mausmodell wäre es darüber hinaus von großem Interesse, weitere Substanzen zu testen, die beispielsweise den Tas2r109, Tas2r103 oder Tas2r140 Rezeptor aktivieren, da diese in Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}-Mäusen stärker exprimiert werden als in Kontrollmäusen (siehe Abb. 3.10). Sollten diese Tas2r-exprimierenden Neurone ebenfalls wie Tas2r131-Neurone an der Geschmacksweiterleitung bzw. -verarbeitung beteiligt sein, so könnte man annehmen, dass betroffene Mäuse die jeweilige Substanz bereits in niedrigeren Konzentrationen wahrnehmen und sie dadurch deutlich weniger konsumieren, als die Kontrollgruppe. Zur Klärung dieser Frage sind bereits Kurzzeitpräferenz-Analysen geplant.

4.3.4 Potentielle Funktionen Tas2r-exprimierender Neurone als Chemosensoren

Eine weite Verteilung innerhalb des ZNS sowie die Expression in verschiedenen neuronalen Zelltypen könnten auf multiple Funktionen Tas2r-exprimierender Zellen hindeuten. Wie in dieser vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, scheint eine Funktion der Tas2r131-Neuronen die Beteiligung an der Übertragung und Verarbeitung von Geschmacksinformationen einiger ausgewählter Bittersubstanzen zu sein. Es stellt sich daher die Frage, ob Substanzen wie Papaverin und Chlorhexidin, an deren Geschmacksinformationsverarbeitung Tas2r131-Neurone beteiligt sind, sich funktionell von Substanzen unterscheiden, bei denen eine Beteiligung von Tas2r131-Neuronen nicht nachweisbar war. Dazu zählen Cycloheximid und Chinin. Die Analyse der Toxizität der Substanzen sowie die Einteilung in natürliche und künstliche Bitterstoffe zeigten allerdings keine Hinweise für eine solche Unterscheidung (siehe Anhang). Darüber hinaus stellen alle vier ionische Substanzen dar.

In Anlehnung an die Ergebnisse von Ren und Kollegen, die eine Expression der Tas1r-Familie in Abhängigkeit des Glukosespiegels zeigten (Ren et al., 2009), könnten auch Tas2rs im ZNS beispielsweise chemosensorische Funktionen wahrnehmen (Dehkordi et al., 2012). Singh und Kollegen zeigten in primären neuronalen Zellen von Ratten nach Applikation von Denatoniumbenzoat einen Anstieg des intrazellulären Calciums. Folglich scheinen Tas2r-exprimierende Neurone durch zugeführte Liganden aktivierbar (Singh et al., 2011). Die Tas2r-Expression sowie die Aktivierung durch Bitterstoffe könnten demnach auf eine Funktion zur Detektion und Schutz vor schädlichen Substanzen hindeuten, die durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) gelangen und dort potentiell Schaden verursachen. Dafür würde die Expression einiger Tas2rs sprechen, deren Liganden die BHS passieren können und dort toxisch wirken und beispielsweise oxidativen Stress induzieren, wie Haloperidol (Tas2r110) (Schinkel et al., 1996, Polydoro et al., 2004). Interessanterweise zeigten Patienten mit Schizophrenie unter Einnahme von Neuroleptika, wie beispielsweise Haloperidol, geringere Expressionspiegel von Bitterrezeptoren im präfrontalen Cortex als Kontrollpersonen (Ansoleaga et al., 2015). Die chronische Einnahme dieser Medikamente kann allerdings zu Toleranzeffekten führen, die sich beispielsweise bei β -Sympathomimetika in einer Herunterregulierung von G-Protein-gekoppelten β -Adrenorezeptoren äußern kann (Karow und Lang-Roth, 2011). Auch in anderen neurologischen Krankheitsbildern wie der Alzheimerschen oder der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit scheint eine Dysregulation von Bitterrezeptoren vorzukommen (Ansoleaga et al., 2013). Allerdings kommt es bei diesen neurodegenerativen Erkrankungen zu einem erheblichen Verlust von Nervenzellen, sodass die Expression vieler Gene beeinträchtigt sein wird.

Für eine Funktion der Tas2rs- als Chemosensor spricht weiterhin, dass viele ZNS-gängige Substanzen, wie α -Thujon, Strychnin, Brucin, Campher und Haloperidol, durch mindestens einen Bitterrezeptor erkannt werden, deren Expression im Gehirn nachweisbar war. Beispielsweise wird α -Thujon, welches im Wermut vorkommt (Chialva et al., 1983), über die Rezeptoren Tas2r105 und Tas2r119 erkannt (*In-vitro-Daten*, Loßow, unpubliziert). Eine Expression von Tas2r105 konnte nicht im Gehirn nachgewiesen werden, für Tas2r119 dagegen schon (siehe Abb. 3.4, 3.6-8). Strychnin wirkt als kompetitiver Antagonist am Glycin-Rezeptor, einem inhibitorischen Chloridkanal. Die Unterdrückung der Aktivität von inhibitorischen glycinergen Neuronen im Rückenmark durch Strychnin führt zu einer tonischen Kontraktion sowie Spasmen der Skelettmuskulatur (Karow und Lang-Roth, 2011). Der Bittergeschmack von Strychnin wird über die Rezeptoren Tas2r117 und Tas2r140 vermittelt (*In-vitro-Daten*, Loßow, unpubliziert). Beide Rezeptoren werden im ZNS exprimiert (siehe Abb. 3.2). Folglich könnten Bitterrezeptoren auch im Gehirn an der Detektion von Bittersubstanzen beteiligt sein.

Bittersubstanzen, die vorwiegend über Rezeptoren erkannt werden, deren Expression im Gehirn nicht nachgewiesen wurde, agieren dagegen meist in der Peripherie wie Cycloheximid, welches als

Translationshemmer bei Eukaryoten wirkt (Ennis und Lubin, 1964). Ein weiteres Beispiel sind die von *Pseudomonas*-Bakterien produzierten Homoserinlactone, die als „Quorum sensing“-Moleküle zur chemischen Kommunikation von Einzellern dienen. Einige Homoserinlactone wie *N*-(3-Oxohexanoyl)-L-Homolactoserin und *N*-Butyryl-L-Homolactoserin aktivieren den Bitterrezeptor Tas2r105 (*In-vitro*-Daten, Loßow, unpubliziert). Eine Expression des Tas2r105 konnte nicht im ZNS nachgewiesen werden. Da Bakterien normalerweise nicht durch die Blut-Hirn-Schranke gelangen, wäre folglich eine Tas2r105-Expression zur Detektion dieser Moleküle dort auch nicht notwendig.

Für jede Regel gibt es auch Ausnahmen. Für einige Bittersubstanzen wie das Lokalanästhetikum Lidocain konnten im Menschen neurotoxische Wirkungen belegt werden (Karow und Lang-Roth, 2011). Im Menschen aktiviert Lidocain den Bitterrezeptor TAS2R14 (Behrens, unpubliziert), dessen Expression im Gehirn nachgewiesen wurde (Ansoleaga et al., 2013). Der orthologe Mausezeptor ist der Tas2r113, der ebenfalls im Gehirn nachweisbar ist, aber nicht von Lidocain aktiviert wird. In der Maus übernimmt der Tas2r105-Bitterrezeptor diese Funktion (*In-vitro*-Daten, Loßow, unpubliziert). Der Tas2r105 wird indes nicht im ZNS exprimiert (siehe Abb. 3.2). Die Verwendung von natürlichen und synthetisierten Bittersubstanzen sowie spezie-abhängige Ligand-Rezeptor-Beziehungen erschweren es abzuwägen, ob ZNS-gängigen Substanzen durch Tas2r-exprimierende Neurone erkannt werden können.

Tas2rs- bzw. Tas2r-exprimierende Zellen könnten allerdings auch als Chemosensoren an Prozessen zur Detoxifizierung von Schadstoffen und Xenobiotika im ZNS beteiligt sein. Studien zeigten, dass sowohl ABC-Transportproteine als auch Phase I und Phase II Enzyme in allen Gehirnregionen in verschiedenen Zelltypen wie Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia-Zellen exprimiert werden (Nishimura et al., 2003, Stakhiv et al., 2006, Dutheil et al., 2009, Agúndez et al., 2014, Gambaro et al., 2014). So konnten beispielsweise in Purkinje- und Körner-Zellen des Cerebellums verschiedene Cytochrom P450 (CYP) Monooxygenasen wie CYP2D6, CYP2J2 und CYP2U1 nachgewiesen werden. Dutheil und Kollegen zeigen darüber hinaus, dass je nach Gehirnregion eine andere Verteilung dieser Phase I Enzyme vorliegt (Dutheil et al., 2009). Bekannte Substrate dieser Monooxygenase sind oftmals Psychopharmaka wie Haloperidol, welches durch CYP2D6 und CYP3A4 (oxidative N-Dealkylierung) umgewandelt wird. CYP3A4, welches in der Medulla oblongata exprimiert wird, setzt darüber hinaus auch Chinin um (Dutheil et al., 2009, Zanger und Schwab, 2013). Chinin und Haloperidol aktivieren ihrerseits Bitterrezeptoren wie Tas2r108 und Tas2r110, die im Gehirn exprimiert werden. Möglicherweise könnten Bitterrezeptoren und Bitterrezeptor-exprimierende Zellen an der Detoxifizierung von ZNS-gängigen Bittersubstanzen beteiligt sein, indem sie die Substanz detektieren und die Information an andere Zellen weiterleiten oder zelleigene Regulationskaskaden initiieren.

Eine weitere Funktion Tas2r-exprimierender Neurone wäre potentiell auch eine Beteiligung an der Regulation des Hormonhaushaltes. So konnte beispielsweise für Progesteron und Testosteron eine Aktivierung von murinen Bitterrezeptoren gezeigt werden (Loßow, unpubliziert). Beide Hormone können darüber hinaus Effekte im zentralen Nervensystem verursachen (Whalen und Luttge, 1971, Smith et al., 1987, Perrin et al., 2008). Allerdings sind die physiologischen Konzentrationen von Progesteron im Gehirn mit maximal 6,8 ng/ml (Hirabayashi et al., 1995) um einen Faktor von mehr als 100 niedriger, als die in den *In-vitro*-Studien eingesetzten 930 ng/ml (Loßow, unpubliziert).

Bislang ist nur wenig über die Funktionen von Bitterrezeptoren im Gehirn bekannt. Nachfolgende Studien sollten daher gezielt ZNS-gängige und nicht-ZNS-gängige Bitterstoffe auf deren Rezeptoraktivierung untersuchen. In Kombination mit den Tas2r-Expressionsanalysen in der vorliegenden Arbeit könnten diese Studien aufklären, ob die Hypothese der Bitterrezeptoren als Chemosensoren für ZNS-gängige Bittersubstanzen zu trifft.

4.3.5 Mögliche Diskriminierung von Bittersubstanzen

Die Ergebnisse der Kurzzeitpräferenztests deuten auf eine getrennte Weiterleitung und Verarbeitung einiger verschiedener Bittersubstanzen hin. Es stellt sich daher die Frage, ob eine Unterscheidung von manchen Bitterstoffen möglich ist. Voraussetzung dafür wäre eine divergente Informationstransmission und -integration, wie dies bei der olfaktorischen Wahrnehmung der Fall ist. Der Geruchssinn ist wie der Geschmacksinn ein chemischer Sinn. Geruchsstoffe binden an olfaktorische Rezeptoren der Riechsinneszellen. Dies löst eine interne Signalkaskade aus, an deren Ende das chemische in ein elektrisches Signal umgewandelt wird. Dieses Signal wird über die Axone der Riechsinneszellen, welche als Axonbündel (*Fila olfactoria*) zum *Bulbus olfactorius* verlaufen, weitergeleitet und in den *Glomeruli olfactorii*, wo die Axone enden, auf ein zweites Neuron (Mitralzelle) übertragen. Bereits hier beginnt die zentralnervöse Verarbeitung der Geruchsinformationen. Die Mitralzellenaxone bilden den *Tractus olfactorius*, über den die Informationen weiter zum Riechhirn, Limbischen System und andere Bereiche des ZNS transmittiert werden (Ressler et al., 1994, Sherperd, 1994, Breer et al., 2006). Jede Geruchssinneszelle exprimiert dabei nur einen einzigen der zahlreichen olfaktorischen Rezeptoren (OR). Ein solches OR-Gen wird allerdings von einigen tausend Riechsinneszellen im Riechepithel exprimiert (Fleischer et al., 2009). Wie bei den Geschmacksrezeptoren werden verschiedene ORs zum Teil durch denselben Geruchsstoff, aber mit teils unterschiedlichen Affinitäten, aktiviert (Kajiya et al., 2001). Die Geruchsinformation von etwa 1000 Riechsinneszellen mit demselben OR wird anschließend auf eine einzige Mitralzelle übertragen (Konvergenz). Bei jedem Geruchsstoff wird so ein spezielles Set an ORs auf verschiedenen Riechsinneszellen sowie nachgeschalteten Mitralzellen angesprochen. Die Geruchsinformation kann so über bestimmte Mitralzellen als ein spezifisches Erregungsmuster ins ZNS geleitet werden. Dort erfolgt die Dekodierung des Signals und damit die bewusste Wahrnehmung und Diskriminierung der zahlreichen Duftstoffe (Malnic et al., 1999, Firestein, 2001, Mombaerts, 2004, Breer et al., 2006, Fleischer et al. 2009).

Für eine Unterscheidung verschiedener Bittergeschmacksstoffe dürfte in Anlehnung zum olfaktorischen System keine vollständige neuronale Konvergenz vorliegen. Das bedeutet, die Bittergeschmacksinformationen von einigen Substanzen sollten grundsätzlich separat bzw. zumindest teilweise getrennt übertragen und verarbeitet werden. Eine basale Voraussetzung einer solchen Diskriminierung ist eine unterschiedliche Detektion auf der Zunge. Die Ergebnisse von Behrens und Kollegen deuten stark auf eine heterogene Expression von Bitterrezeptoren in den Geschmackssinneszellen hin. Die Studien zeigten, dass in der menschlichen Zunge nur 4-11 Tas2rs pro Sinneszelle exprimiert werden (Behrens et al., 2007). Auch die Arbeiten von Hübner zeigten eine heterogene Tas2r-Expression im Zungenepithel von Mäusen (Hübner, 2014). Unterschiedliche Populationen von Tas2-exprimierenden Rezeptorzellen stellen die Grundlage dar, Bitterstoffe getrennt voneinander zu detektieren.

Darüber hinaus zeigten Tomchik und Kollegen, dass Rezeptorzellen vorwiegend auf nur eine Geschmacksqualität ansprechen (Tomchik et al., 2007). Bei sehr hohen Konzentrationen der Geschmacksstoffe scheint die eindeutige Zuordnung von Rezeptorzellen und Geschmackqualität allerdings nicht mehr gegeben zu sein (Wu et al., 2015). Studien von Danilova und Hellekant zeigten zudem, dass die *Chorda tympani* und der *Nervus glossopharyngeus* von Mäusen bei oraler Stimulation mit verschiedenen Bitterstimuli unterschiedlich stark aktiviert wurden (Danilova und Hellekant, 2003). Caicedo und Roper zeigten ferner, dass Bittergeschmackszellen nur auf einige der fünf applizierten Bittersubstanzen ansprechen. So reagierten einige Zellen auf Chinin und Cycloheximid, andere nur auf einen der beiden Stimuli (Caicedo und Roper, 2001).

Ebenfalls die *Arc*-Expressions-Analysen von Töle und Tyree im NTS und PBN weisen auf heterogene Neuronenpopulationen hin, die nach oraler Bitterstimulation aktiviert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass einige Neurone auf die Applikation verschiedener, einige nur nach Applikation einzelner Bittersubstanzen reagieren (Töle, 2013, Tyree unpubliziert). In höheren Ebenen der Geschmacksbahn wie im PBN scheinen allerdings mehr Neurone zu existieren, die auf die Applikation verschiedener Bitterstimuli ansprechen (Tyree, unpubliziert). Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit anhand von *Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}*-Tieren gezeigt werden, dass die Weiterleitung und Verarbeitung der Geschmacksinformationen von Papaverin und Cycloheximid vermutlich auf verschiedenen neuronalen Transmissionswegen verläuft (siehe 4.3.3, Abb. 3.39, Abb. 4.4).

Diese Studien lassen vermuten, dass eine teilweise getrennte neuronale Weiterleitung und Verarbeitung der Geschmacksinformation existiert. Prinzipiell scheint eine Diskriminierung verschiedener Bitterstoffe daher möglich.

Einen Selektionsvorteil hätten beispielsweise Tiere, die toxische Bittersubstanzen von denen mit gesundheitsfördernden Wirkungen unterscheiden könnten. Verbunden mit einer Diskriminierung ist der eigentliche Konsum dieser Bittersubstanzen. Sollten Mäuse positive Wirkungen aufgrund des Konsums ausgewählter Bitterlösung erfahren, würden sie vermutlich mehr von dieser Lösung aufnehmen, als von Lösungen, die zu negativen oder gar toxischen Effekten führten. Zur Überprüfung, ob Mäuse von sich aus gering konzentrierte Bitterlösungen zu sich nehmen, wurden Langzeittrinkexperimente im Rahmen eines 48-stündigen Zwei-Flaschen-Präferenz-Tests durchgeführt. Im Gegensatz zu den Kurzzeitpräferenztests werden hier auch post-ingestive Effekte bedacht (Kratz et al., 1978), die langfristige Wirkungen nach Substanzaufnahme wie berauschende Effekte oder Unwohlsein der Mäuse berücksichtigen.

Das Testen von Bittersubstanzen gegen Wasser zeigte einerseits, wie erwartet, einen Rückgang des Konsums bei Konzentrationserhöhung der Bitterlösung. Andererseits konnte gezeigt werden, dass alle Substanzen zu einem bestimmten Anteil konsumiert wurden. Interessanterweise wurden die Substanzen anfangs meist konsumiert, gegen Ende des Versuchs jedoch meist vermieden (siehe Abb. 3.38). Allein die Bittersubstanz Chinin wurde selbst in hohen Konzentrationen auch am Ende des Experiments noch von den Mäusen getrunken (siehe Abb. 3.39). Im Vergleich von Bittersubstanz und Wasser wurde bis auf Soa erwartungsgemäß stets Wasser präferiert. Die Ergebnisse der Tests mit Soa zeigten, dass Soa ähnlich wie Wasser getrunken wurde. Dies liegt vermutlich an dem verwendeten C57BL/6-Stamm, der zur Gruppe der Nicht-Schmecker von Soa gehört und die Mäuse die Substanz daher als nicht bitter empfinden (Harder et al., 1992, Whitney und Harder, 1994).

Basierend auf diesen ersten Ergebnissen wurden Kombinationen der sechs Bittersubstanzen untereinander getestet. Dabei wurden die Konzentrationen der Bittersubstanzen so gewählt, dass untereinander ein ähnliches Konsumverhältnis von Substanz zu Wasser („Bitter-Aversions-Verhältnis“) bestand (siehe Anhang Tab. A15). Diese Ergebnisse des Bitter-gegen-Bitter-Versuchs zeigten, dass die Mäuse erwartungsgemäß insgesamt weniger Flüssigkeit aufnahmen als beim Test Bittersubstanz gegen Wasser. Interessanterweise wurden trotz ähnlichem „Bitter-Aversions-Verhältnis“ einige Bittersubstanzen gegenüber anderen präferiert und somit mehr konsumiert, wohingegen wenige Konstellationen, wie die Paarungen Papaverin (3 mM) gegen Chinin (1 mM) und Denatoniumbenzoat (3 mM) gegen Salicylsäure (10 mM), von den Mäusen ähnlich konsumiert und vermutlich als gleich aversiv wahrgenommen wurden (siehe Abb. 3.44).

Diese Unterschiede könnten durch das Nicht-Erreichen des „Bitter-Aversions-Verhältnis“ erklärt werden. Wäre eine Bittersubstanz stärker aversiv als die andere, führte es dazu, dass die eine oder andere Substanz präferiert oder vermieden wird. Für die beiden Telexperimente wurden zwei Gruppen von Mäusen verwendet. Da es sich jedoch um Mäuse des Inzucht-Stamms C57BL/6 handelt,

die den gleichen genetischen Hintergrund haben, kann ein ähnliches „Bitter-Aversions-Verhältnis“ angenommen werden.

Betrachtet man die bisherigen *In-vitro*-Daten der Ligand-Rezeptor-Assoziation, so stellt man fest, dass Papaverin über den Bitterrezeptor Tas2r144 detektiert wird. Auch Chinin aktiviert diesen Rezeptor und für beide Substanzen konnte im direkten Vergleich ein ähnlicher Konsum ermittelt werden. Ebenso verhält es sich bei der Paarung Salicylsäure und Denatoniumbenzoat. Beide aktivieren den Rezeptor Tas2r135 und auch hier konnte für beide ein ähnlicher Konsum während des Zwei-Flaschen-Präferenztests beobachtet werden (siehe Abb. 3.44). So könnten zwei verschiedene Substanzen, die dieselben Rezeptoren aktivieren und ähnliche post-ingestive Effekte haben, als gleich wahrgenommen werden.

Der direkte Vergleich von Papaverin und Salicylsäure zeigt dagegen, dass letztere präferiert wird. Bereits im Kurzzeitpräferenztest zeigten sich erste Hinweise, dass eine potentielle Geschmacksbahn („Tas2r144-Bitterbahn“) über die die Papaverin-Geschmacksinformation weitergeleitet wird, mit der möglichen Tas2r131-Bahn stark überlappt (siehe Abb. 4.4). Die Tas2r131-Bahn scheint allerdings verschieden von der „Tas2r135-Bitterbahn“, die den Geschmack von Acesulfam K und Salicylsäure übermittelt. Dies würde im Umkehrschluss bedeuten, dass die Informationsweiterleitung und -verarbeitung von Papaverin und Salicylsäure vorwiegend auf verschiedenen Wegen erfolgt würde. Ein signifikanter Unterschied zwischen dem Konsum der beiden Bittersubstanzen, wie er sich in diesem Trinkexperiment zeigte, ist daher möglicherweise auf eine Diskriminierung der beiden Substanzen zurückzuführen.

Verfolgt man diese Hypothese weiter, ergibt sich, dass die Geschmacksverarbeitung von Arbutin gegenüber Salicylsäure, Arbutin gegen Papaverin sowie Arbutin gegen Denatoniumbenzoat ebenfalls getrennt verlaufen würde. Dafür sprechen die signifikanten Unterschiede des Konsums der jeweiligen Bitterlösung während des Versuchs (siehe Abb. 3.44). Chinin und Arbutin dagegen wurden von den C57BL/6-Mäusen während dieser Studie ähnlich konsumiert. In Anbetracht der Tatsache, dass beide den Bitterrezeptor Tas2r126 aktivieren, wäre es denkbar, dass auch die Geschmacksinformationen ähnlich verarbeitet werden.

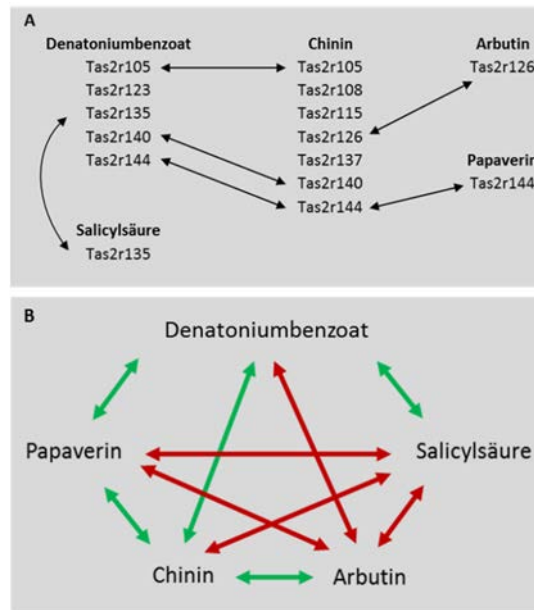


Abbildung 4.5 Schematische Darstellung der potentiellen Zusammenhänge bzw. Differenzen der Informationsweiterleitung bzw. -verarbeitung basierend auf dem Liganden-Rezeptor-Spektrum. (A) Dargestellt sind die fünf Bittersubstanzen mit den dazugehörigen Rezeptoren, die sie aktivieren. Gleiche Rezeptoren sind durch einen schwarzen Pfeil verbunden. (B) Assoziationen einer gemeinsamen Informationsverarbeitung der verschiedenen Substanzen basierend auf Kurzzeitpräferenztest und Langzeittrinkexperiment sind durch einen grünen Pfeil dargestellt. Eine potentiell unterschiedliche Informationsverarbeitung der verschiedenen Substanzen ist durch einen roten Pfeil dargestellt.

Je mehr Rezeptoren allerdings eine Substanz aktiviert, desto schwieriger wird es, mögliche Beziehungen herauszustellen. Spector und Kopka zeigten beispielsweise, dass Ratten Chinin und Denatoniumbenzoat nicht voneinander unterscheiden können (Spector und Kopka, 2002).

Die Tatsache, dass in Mäusen Chinin und Denatoniumbenzoat drei gleiche Bitterrezeptoren, aber auch zwei bzw. vier andere Tas2rs aktivieren, erschwert eine eindeutige Aussage. Berücksichtigt man die *In-vitro*-Daten des Liganden-Rezeptor-Spektrums, zeigt sich, dass bei Stimulation mit Denatoniumbenzoat die Rezeptoren Tas2r105 und Tas2r135 mit Abstand am stärksten aktivierbar sind. Bei Stimulation mit Chinin sind es Tas2r115 und Tas2r126. Die anderen drei bzw. fünf Rezeptoren sind aktivierbar, führen aber zu einem wesentlich geringeren Calciumsignal in den Zellkultur-Experimenten (*In-vitro*-Daten, Loßow, unpubliziert). Trotz Aktivierung drei gleicher Rezeptoren (siehe Abb. 4.6A, Pfeile) wäre daher eine Unterscheidung beider Substanzen in Mäusen potentiell möglich. Die Komplexität der teils überlappenden Rezeptorspektren erschwert allerdings mögliche Voraussagen bezüglich einer Informationsverarbeitung. Die Kombination von Denatoniumbenzoat und Chinin für ein Diskriminierungsexperiment scheint folglich nicht optimal, eine bessere Kombination von Bittersubstanzen wäre beispielsweise Arbutin gegen Papaverin oder Arbutin gegen Salicylsäure (siehe Abb. 4.6).

Zur Überprüfung, ob Mäuse spezifische Bittersubstanzen diskriminieren können, sind daher weitere Experimente geplant. Dabei sollen Mäuse trainiert werden, je nach dargebotener Bitterlösung an verschiedenen Stellen des Testkäfigs eine Belohnung zu empfangen. Gelingt es den Mäusen zu erkennen, wo sie belohnt werden, ist dies ein Indikator, dass sie in der Lage sind, die Bitterstoffe zu unterscheiden. Die Auswahl von Bitterstoffen auf Grundlage des Rezeptor-Ligandenspektrums und distinkt verlaufender Bittergeschmacksbahnen wird so Aussagen über eine potentielle Diskriminierung verschiedener Bittersubstanzen in Mäusen ermöglichen

Zusammenfassung

Der Bittergeschmack warnt den Organismus vor potentiell verdorbener oder giftiger Nahrung und ist somit ein wichtiger Kontrollmechanismus. Die initiale Detektion der zahlreich vorkommenden Bitterstoffe erfolgt bei der Maus durch 35 Bitterrezeptoren (Tas2rs), die sich im Zungengewebe befinden. Die Geschmacksinformation wird anschließend von der Zunge über das periphere (PNS) ins zentrale Nervensystem (ZNS) geleitet, wo deren Verarbeitung stattfindet. Die Verarbeitung der Geschmacksinformation konnte bislang nicht gänzlich aufgeklärt werden. Neue Studien deuten auf eine Expression von Tas2rs auch im PNS und ZNS entlang der Geschmacksbahn hin. Über Vorkommen und Aufgaben dieser Rezeptoren bzw. Rezeptorzellen im Nervensystem ist bislang wenig bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Tas2r-Expression in verschiedenen Mausmodellen untersucht, Tas2r-exprimierende Zellen identifiziert und deren Funktionen bei der Übertragung der Geschmacksinformationen analysiert.

Im Zuge der Expressionsanalysen mittels qRT-PCR konnte die Expression von 25 der 35 bekannten Bittergeschmacksrezeptoren im zentralen Nervensystem der Maus nachgewiesen werden. Die Expressionsmuster im PNS sowie im ZNS lassen darüber hinaus Vermutungen zu Funktionen in verschiedenen Bereichen des Nervensystems zu. Basierend auf den Ergebnissen der Expressionsanalysen war es möglich, stark exprimierte Tas2rs mittels *In-situ*-Hybridisierung in verschiedenen Zelltypen zu visualisieren. Des Weiteren konnten immunhistochemische Färbungen unter Verwendung eines genetisch modifizierten Mausmodells die Ergebnisse der Expressionsanalysen bestätigen. Sie zeigten eine Expression von Tas2rs, am Beispiel des Tas2r131-Rezeptors, in cholinergen, dopaminergen, GABAergen, noradrenergen und glycinerg-angesteuerte Projektionsneuronen sowie in Interneuronen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen daher erstmals das Vorkommen von Tas2rs in verschiedenen neuronalen Zelltypen in weiten Teilen des ZNS. Dies lässt den Schluss zu, dass Tas2r-exprimierende Zellen potentiell multiple Funktionen innehaben.

Anhand von Verhaltensexperimenten in genetisch modifizierten Mäusen wurde die mögliche Funktion von Tas2r131-exprimierenden Neuronen (Tas2r131-Neurone) bei der Geschmackswahrnehmung untersucht. Die Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung von Tas2r131-Neuronen an der Signalweiterleitung bzw. -verarbeitung der Geschmacksinformation für eine Auswahl von Bittersubstanzen hin.

Die Analysen zeigen darüber hinaus, dass Tas2r131-Neuronen nicht an der Geschmackswahrnehmung anderer Bitterstoffe sowie Geschmacksstimuli anderer Qualitäten (süß, umami, sauer, salzig), beteiligt sind. Eine spezifische „Tas2r131-Bittergeschmacksbahn“, die mit anderen potentiellen „Bitterbahnen“ teils unabhängige, teils überlappende Signalwege bzw. Verarbeitungsbereiche besitzt, bildet eine mögliche zelluläre Grundlage zur Unterscheidung von Bitterstoffen.

Die im Rahmen dieser Arbeit entstandene Hypothese einer potentiellen Diskriminierung von Bitterstoffen soll daher in weiterführenden Studien durch die Etablierung eines Verhaltenstest mit Mäusen geprüft werden.

Literatur

- Adler E, Hoon MA, Mueller KL, Chandrashekar J, Ryba NJ, Zuker CS (2000) A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* 100:693-702.
- Agúndez, J. A., Jiménez-Jiménez, F. J., Alonso-Navarro, H., & García-Martín, E. (2014). Drug and xenobiotic biotransformation in the blood–brain barrier: a neglected issue. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8.
- Akiba Y, Watanabe C, Mizumori M, Kaunitz JD (2009) Luminal L-glutamate enhances duodenal mucosal defense mechanisms via multiple glutamate receptors in rats. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 297:G781-791.
- Ansoleaga B, Garcia-Esparcia P, Llorens F, Moreno J, Aso E, Ferrer I (2013) Dysregulation of brain olfactory and taste receptors in AD, PSP and CJD, and AD-related model. *Neuroscience* 248:369-382.
- Ansoleaga B, Garcia-Esparcia P, Pinacho R, Haro JM, Ramos B, Ferrer I (2015) Decrease in olfactory and taste receptor expression in the dorsolateral prefrontal cortex in chronic schizophrenia. *Journal of psychiatric research* 60:109-116.
- Bartel DL, Sullivan SL, Lavoie EG, Sevigny J, Finger TE (2006) Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is the ecto-ATPase of type I cells in taste buds. *The Journal of comparative neurology* 497:1-12.
- Baumert M, Maycox PR, Navone F, De Camilli P, Jahn R (1989) Synaptobrevin: an integral membrane protein of 18,000 daltons present in small synaptic vesicles of rat brain. *The EMBO journal* 8:379-384.
- Beckstead RM, Morse JR, Norgren R (1980) The nucleus of the solitary tract in the monkey: projections to the thalamus and brain stem nuclei. *The Journal of comparative neurology* 190:259-282.
- Behrens M, Born S, Redel U, Voigt N, Schuh V, Raguse JD, Meyerhof W (2012) Immunohistochemical detection of TAS2R38 protein in human taste cells. *PloS one* 7:e40304.
- Behrens M, Foerster S, Staehler F, Raguse JD, Meyerhof W (2007) Gustatory expression pattern of the human TAS2R bitter receptor gene family reveals a heterogenous population of bitter responsive taste receptor cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:12630-12640.
- Behrens M, Meyerhof W (2006) Bitter taste receptors and human bitter taste perception. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 63:1501-1509.
- Behrens M, Meyerhof W (2009) Mammalian bitter taste perception. *Results and problems in cell differentiation* 47:203-220.
- Belvisi MG, Dale N, Birrell MA, Canning BJ (2011) Bronchodilator activity of bitter tastants in human tissue. *Nature medicine* 17:776.
- Bezencon C, le Coutre J, Damak S (2007) Taste-signaling proteins are coexpressed in solitary intestinal epithelial cells. *Chemical senses* 32:41-49.
- Bock JB, Scheller RH (1999) SNARE proteins mediate lipid bilayer fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:12227-12229.
- Böhni, U., von Heymann, W., & Locher, H. (2015). *Manuelle Medizin an der Halswirbelsäule. Aktuelle Rheumatologie*, 40(05), 368-376.
- Bradley RM (2007) rNST Circuits. In: *The Role of the Nucleus of the Solitary Tract in Gustatory Processing* (Bradley, R. M., ed) Boca Raton (FL).
- Breer, H., Fleischer, J., & Strotmann, J. (2006). The sense of smell: multiple olfactory subsystems. *Cell Mol Life Sci*, 63(13), 1465-1475.
- Brugge JF, Geisler CD (1978) Auditory mechanisms of the lower brainstem. *Annual review of neuroscience* 1:363-394.

- Bult JH, de Wijk RA, Hummel T (2007) Investigations on multimodal sensory integration: texture, taste, and ortho- and retronasal olfactory stimuli in concert. *Neuroscience letters* 411:6-10.
- Caicedo A, Kim KN, Roper SD (2002) Individual mouse taste cells respond to multiple chemical stimuli. *The Journal of physiology* 544:501-509.
- Caicedo A, Roper SD (2001) Taste receptor cells that discriminate between bitter stimuli. *Science* 291:1557-1560.
- Cartoni C, Yasumatsu K, Ohkuri T, Shigemura N, Yoshida R, Godinot N, le Coutre J, Ninomiya Y, Damak S (2010) Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:8376-8382.
- Chandrashekar J, Hoon MA, Ryba NJ, Zuker CS (2006) The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* 444:288-294.
- Chandrashekar J, Kuhn C, Oka Y, Yarmolinsky DA, Hummler E, Ryba NJ, Zuker CS (2010) The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature* 464:297-301.
- Chandrashekar J, Mueller KL, Hoon MA, Adler E, Feng L, Guo W, Zuker CS, Ryba NJ (2000) T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* 100:703-711.
- Chandrashekar J, Yarmolinsky D, von Buchholtz L, Oka Y, Sly W, Ryba NJ, Zuker CS (2009) The taste of carbonation. *Science* 326:443-445.
- Chaudhari, N., & Roper, S. D. (2010). The cell biology of taste. *The Journal of cell biology*, 190(3), 285-296.
- Chen MC, Wu SV, Reeve JR, Jr., Rozengurt E (2006) Bitter stimuli induce Ca²⁺ signaling and CCK release in enteroendocrine STC-1 cells: role of L-type voltage-sensitive Ca²⁺ channels. *American journal of physiology Cell physiology* 291:C726-739.
- Chialva F, Liddle PA, Doglia G (1983) Chemotaxonomy of wormwood (*Artemisia absinthum* L.). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 176:363-366.
- Clark AA, Dotson CD, Elson AE, Voigt A, Boehm U, Meyerhof W, Steinle NI, Munger SD (2015) TAS2R bitter taste receptors regulate thyroid function. *Faseb J* 29:164-172.
- Conte C, Ebeling M, Marcuz A, Nef P, Andres-Barquin PJ (2003) Evolutionary relationships of the Tas2r receptor gene families in mouse and human. *Physiological genomics* 14:73-82.
- Correale J, Villa A (2007) The blood-brain-barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting. *Autoimmunity* 40:148-160.
- Danilova V, Hellekant G (2003) Comparison of the responses of the chorda tympani and glossopharyngeal nerves to taste stimuli in C57BL/6J mice. *BMC neuroscience* 4:5.
- De Araujo, I. E., Kringelbach, M. L., Rolls, E. T., & McGlone, F. (2003). Human cortical responses to water in the mouth, and the effects of thirst. *Journal of neurophysiology*, 90(3), 1865-1876.
- De Plaen E, Arden K, Traversari C, Gaforio JJ, Szikora JP, De Smet C, Brasseur F, van der Bruggen P, Lethe B, Lurquin C, et al. (1994) Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 40:360-369.
- DeFazio RA, Dvoryanchikov G, Maruyama Y, Kim JW, Pereira E, Roper SD, Chaudhari N (2006) Separate populations of receptor cells and presynaptic cells in mouse taste buds. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:3971-3980.
- Dehkordi O, Rose JE, Fatemi M, Allard JS, Balan KV, Young JK, Fatima S, Millis RM, Jayam-Trouth A (2012) Neuronal expression of bitter taste receptors and downstream signaling molecules in the rat brainstem. *Brain research* 1475:1-10.
- Deshpande DA, Wang WC, McIlmoyle EL, Robinett KS, Schillinger RM, An SS, Sham JS, Liggett SB (2010) Bitter taste receptors on airway smooth muscle bronchodilate by localized calcium signaling and reverse obstruction. *Nature medicine* 16:1299-1304.
- DeSimone JA, Heck GL, DeSimone SK (1981) Active ion transport in dog tongue: a possible role in taste. *Science* 214:1039-1041.
- Dewilde S, Vercelli A, Chiarle R, Poli V (2007) Of alphas and betas: distinct and overlapping functions of STAT3 isoforms. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* 13:6501-6514.
- Dhouailly D, Xu C, Manabe M, Schermer A, Sun TT (1989) Expression of hair-related keratins in a soft epithelium: subpopulations of human and mouse dorsal tongue keratinocytes express

- keratin markers for hair-, skin- and esophageal-types of differentiation. *Experimental cell research* 181:141-158.
- Dissing-Olesen L, Ladeby R, Nielsen HH, Toft-Hansen H, Dalmau I, Finsen B (2007) Axonal lesion-induced microglial proliferation and microglial cluster formation in the mouse. *Neuroscience* 149:112-122.
- Dutheil, F., Dauchy, S., Diry, M., Sazdovitch, V., Cloarec, O., Mellottée, L., ... & Beaune, P. (2009). Xenobiotic-metabolizing enzymes and transporters in the normal human brain: regional and cellular mapping as a basis for putative roles in cerebral function. *Drug Metabolism and Disposition*, 37(7), 1528-1538.
- Dvoryanchikov G, Sinclair MS, Perea-Martinez I, Wang T, Chaudhari N (2009) Inward rectifier channel, ROMK, is localized to the apical tips of glial-like cells in mouse taste buds. *The Journal of comparative neurology* 517:1-14.
- Dvoryanchikov G, Tomchik SM, Chaudhari N (2007) Biogenic amine synthesis and uptake in rodent taste buds. *The Journal of comparative neurology* 505:302-313.
- Dyer J, Salmon KS, Zibrik L, Shirazi-Beechey SP (2005) Expression of sweet taste receptors of the T1R family in the intestinal tract and enteroendocrine cells. *Biochemical Society transactions* 33:302-305.
- Ennis H, Lubin M (1964) Cycloheximide: aspects of inhibition of protein synthesis in mammalian cells. *Science* 146:1474-1476.
- Erickson (1963) Sensory neural patterns and gustation. *Olfaction and Taste: Proceedings of the First International Symposium Held at the Wenner-Gren Center, Stockholm, September 1962* Herausgeber Y. Zottermann:205-213.
- Erickson RP (1968) Stimulus coding in topographic and nontopographic afferent modalities: on the significance of the activity of individual sensory neurons. *Psychological review* 75:447-465.
- Farbman AI (1965) Fine Structure of the Taste Bud. *Journal of ultrastructure research* 12:328-350.
- Finger TE, Bottger B, Hansen A, Anderson KT, Alimohammadi H, Silver WL (2003) Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:8981-8986.
- Finger TE, Danilova V, Barrows J, Bartel DL, Vigers AJ, Stone L, Hellekant G, Kinnamon SC (2005) ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science* 310:1495-1499.
- Firestein, S. (2001). How the olfactory system makes sense of scents. *Nature*, 413(6852), 211-218.
- Fleischer, J., Breer, H., & Strotmann, J. (2013). Mammalian olfactory receptors. *Design principles of sensory receptors*, 45.
- Formaker BK, Hill DL (1991) Lack of amiloride sensitivity in SHR and WKY glossopharyngeal taste responses to NaCl. *Physiology & behavior* 50:765-769.
- Foster SR, Porrello ER, Purdue B, Chan HW, Voigt A, Frenzel S, Hannan RD, Moritz KM, Simmons DG, Molenaar P, Roura E, Boehm U, Meyerhof W, Thomas WG (2013) Expression, regulation and putative nutrient-sensing function of taste GPCRs in the heart. *PloS one* 8:e64579.
- Foster SR, Porrello ER, Stefani M, Smith NJ, Molenaar P, Dos Remedios CG, Thomas WG, Ramalison M (2015) Cardiac gene expression data and in silico analysis provide novel insights into human and mouse taste receptor gene regulation. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 388:1009-1027.
- Foster SR, Roura E, Thomas WG (2014) Extrasensory perception: odorant and taste receptors beyond the nose and mouth. *Pharmacology & therapeutics* 142:41-61.
- Franklin KBJ, Paxinos G (2007) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Amsterdam: Elsevier 3.Aufl.
- Frick H, Leonhardt H, Starck D (1992) *Spezielle anatomie*: Georg Thieme Verlag.
- Fulwiler CE, Saper CB (1984) Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain research* 319:229-259.

- Gaillard D, Laugerette F, Darcel N, El-Yassimi A, Passilly-Degrace P, Hichami A, Khan NA, Montmayeur J-P, Besnard P (2008) The gustatory pathway is involved in CD36-mediated orosensory perception of long-chain fatty acids in the mouse. *The FASEB Journal* 22:1458-1468.
- Galindo MM, Voigt N, Stein J, van Lengerich J, Raguse JD, Hofmann T, Meyerhof W, Behrens M (2012) G protein-coupled receptors in human fat taste perception. *Chemical senses* 37:123-139.
- Gallego R, Eyzaguirre C (1978) Membrane and action potential characteristics of A and C nodose ganglion cells studied in whole ganglia and in tissue slices. *Journal of neurophysiology* 41:1217-1232.
- Gambaro, S. E., Robert, M. C., Tiribelli, C., & Gazzin, S. (2014). Role of brain cytochrome P450 monooxygenases in bilirubin oxidation-specific induction and activity. *Archives of toxicology*, 1-12.
- Gehrmann J (1996) Microglia: a sensor to threats in the nervous system? *Research in virology* 147:79-88.
- Gonzalez-Islas, C., & Wenner, P. (2006). Spontaneous network activity in the embryonic spinal cord regulates AMPAergic and GABAergic synaptic strength. *Neuron*, 49(4), 563-575.
- Grassin-Delyle S, Abrial C, Fayad-Kobeissi S, Brollo M, Faisy C, Alvarez JC, Naline E, Devillier P (2013) The expression and relaxant effect of bitter taste receptors in human bronchi. *Resp Res* 14.
- Graumann W, Sasse D (2005) CompactLehrbuch Band 4–Sinnessysteme. Haut, ZNS, Periphere Leitungsbahnen, Schattauer 429-432.
- Guzowski JF, Timlin JA, Roysam B, McNaughton BL, Worley PF, Barnes CA (2005) Mapping behaviorally relevant neural circuits with immediate-early gene expression. *Current opinion in neurobiology* 15:599-606.
- Halpern BP (1998) Amiloride and vertebrate gustatory responses to NaCl. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 23:5-47.
- Halsell CB, Travers SP, Travers JB (1996) Ascending and descending projections from the rostral nucleus of the solitary tract originate from separate neuronal populations. *Neuroscience* 72:185-197.
- Harder DB, Capeless CG, Maggio JC, Boughter JD, Gannon KS, Whitney G, Azen EA (1992) Intermediate sucrose octa-acetate sensitivity suggests a third allele at mouse bitter taste locus *Soa* and *Soa-Rua* identity. *Chemical senses* 17:391-401.
- Harrer MI, Travers SP (1996) Topographic organization of Fos-like immunoreactivity in the rostral nucleus of the solitary tract evoked by gustatory stimulation with sucrose and quinine. *Brain research* 711:125-137.
- Hellekant G, Ninomiya Y, Danilova V (1998) Taste in chimpanzees. III: Labeled-line coding in sweet taste. *Physiology & behavior* 65:191-200.
- Herbert H, Moga MM, Saper CB (1990) Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *The Journal of comparative neurology* 293:540-580.
- Herness S (2000) Coding in taste receptor cells. The early years of intracellular recordings. *Physiology & behavior* 69:17-27.
- Hirabayashi Y, Shimizu R, Saitoh K, Fukuda H (1995) Cerebrospinal fluid progesterone in pregnant women. *British journal of anaesthesia* 75:683-687.
- Hofmann F (1908) Die obere Olive der Säugetiere nebst Bemerkungen über die Lage der cochlearis Endkerne. *Arb Neur Instit Wien (Oberstiener)* 14:76-328.
- Hoon MA, Adler E, Lindemeier J, Battey JF, Ryba NJ, Zuker CS (1999) Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell* 96:541-551.
- Horani MH, Mooradian AD (2003) Effect of diabetes on the blood brain barrier. *Current pharmaceutical design* 9:833-840.
- Horio N, Yoshida R, Yasumatsu K, Yanagawa Y, Ishimaru Y, Matsunami H, Ninomiya Y (2011) Sour taste responses in mice lacking PKD channels. *PloS one* 6:e20007.
- Huang AL, Chen X, Hoon MA, Chandrashekar J, Guo W, Trankner D, Ryba NJ, Zuker CS (2006) The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* 442:934-938.

- Huang YA, Dando R, Roper SD (2009) Autocrine and paracrine roles for ATP and serotonin in mouse taste buds. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:13909-13918.
- Huang YA, Maruyama Y, Roper SD (2008a) Norepinephrine is coreleased with serotonin in mouse taste buds. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:13088-13093.
- Huang YA, Maruyama Y, Stimac R, Roper SD (2008b) Presynaptic (Type III) cells in mouse taste buds sense sour (acid) taste. *The Journal of physiology* 586:2903-2912.
- Huang YA, Roper SD (2010) Intracellular Ca²⁺ and TRPM5-mediated membrane depolarization produce ATP secretion from taste receptor cells. *The Journal of physiology* 588:2343-2350.
- Huang YJ, Maruyama Y, Dvoryanchikov G, Pereira E, Chaudhari N, Roper SD (2007) The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:6436-6441.
- Huber JD, VanGilder RL, Houser KA (2006) Streptozotocin-induced diabetes progressively increases blood-brain barrier permeability in specific brain regions in rats. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 291:H2660-2668.
- Hübner S, (2014) Molekulare Grundlagen der Bittergeschmackswahrnehmung in der Maus, Dissertation, Deutsches Institut für Ernährungsforschung (DIfE).
- Ichimori, Y., Ueda, K., Okada, H., Honma, S., & Wakisaka, S. (2009). Histochemical changes and apoptosis in degenerating taste buds of the rat circumvallate papilla. *Archives of histology and cytology*, 72(2), 91-100.
- Ishimaru Y, Inada H, Kubota M, Zhuang H, Tominaga M, Matsunami H (2006) Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:12569-12574.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD (1999) *Immunobiology: the immune system in health and disease*: Current Biology Publications New York, NY;.
- Jang HJ, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ, Carlson OD, Kim BJ, Zhou J, Kim HH, Xu X, Chan SL, Juhaszova M, Bernier M, Mosinger B, Margolskee RF, Egan JM (2007) Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:15069-15074.
- Jung HS, Akita K, Kim JY (2004) Spacing patterns on tongue surface-gustatory papilla. *The International journal of developmental biology* 48:157-161.
- Kajiya, K., Inaki, K., Tanaka, M., Haga, T., Kataoka, H., & Touhara, K. (2001). Molecular bases of odor discrimination: reconstitution of olfactory receptors that recognize overlapping sets of odorants. *The Journal of Neuroscience*, 21(16), 6018-6025.
- Kamali A, Kramer LA, Butler IJ, Hasan KM (2009) Diffusion tensor tractography of the somatosensory system in the human brainstem: initial findings using high isotropic spatial resolution at 3.0 T. *European radiology* 19:1480-1488.
- Kaplick M (1953) [The occurrence, distribution and histological relations of taste buds in the roof of the mouth of several mammals, especially rodents]. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 38:571-590.
- Karow T, Lang-Roth R (2011) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie 2011*: S.
- Kataoka S, Yang R, Ishimaru Y, Matsunami H, Sevigny J, Kinnamon JC, Finger TE (2008) The candidate sour taste receptor, PKD2L1, is expressed by type III taste cells in the mouse. *Chemical senses* 33:243-254.
- Kinnamon, S. C., & Finger, T. E. (2013). A taste for ATP: neurotransmission in taste buds. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7.
- Kitada Y, Mitoh Y, Hill DL (1998) Salt taste responses of the IXth nerve in Sprague-Dawley rats: lack of sensitivity to amiloride. *Physiology & behavior* 63:945-949.

- Kouadjo, K. E., Nishida, Y., Cadrin-Girard, J. F., Yoshioka, M., & St-Amand, J. (2007). Housekeeping and tissue-specific genes in mouse tissues. *BMC genomics*, 8(1), 127.
- Krasteva G, Canning BJ, Hartmann P, Veres TZ, Papadakis T, Muhlfield C, Schliecker K, Tallini YN, Braun A, Hackstein H, Baal N, Weihe E, Schutz B, Kotlikoff M, Ibanez-Tallon I, Kummer W (2011) Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:9478-9483.
- Kratz CM, Levitsky DA, Lustick S (1978) Differential effects of quinine and sucrose octa acetate on food intake in the rat. *Physiology & behavior* 20:665-667.
- Krimm RF, Hill DL (1998) Quantitative relationships between taste bud development and gustatory ganglion cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 855:70-75.
- Lalonde ER, Eglitis JA (1961) Number and distribution of taste buds on the epiglottis, pharynx, larynx, soft palate and uvula in a human newborn. *The Anatomical record* 140:91-95.
- Lawless HT, Schlake S, Smythe J, Lim J, Yang H, Chapman K, Bolton B (2004) Metallic taste and retronasal smell. *Chemical senses* 29:25-33.
- Lawton DM, Furness DN, Lindemann B, Hackney CM (2000) Localization of the glutamate-aspartate transporter, GLAST, in rat taste buds. *The European journal of neuroscience* 12:3163-3171.
- Le Pichon CE, Chesler AT (2014) The functional and anatomical dissection of somatosensory subpopulations using mouse genetics. *Frontiers in neuroanatomy* 8:21.
- Li F, Zhou M (2012) Depletion of bitter taste transduction leads to massive spermatid loss in transgenic mice. *Molecular human reproduction* 18:289-297.
- Liebl DJ, Tessarollo L, Palko ME, Parada LF (1997) Absence of sensory neurons before target innervation in brain-derived neurotrophic factor-, neurotrophin 3-, and TrkC-deficient embryonic mice. *The Journal of neuroscience* 17:9113-9121.
- Lindblom UF, Ottosson JO (1957) Influence of pyramidal stimulation upon the relay of coarse cutaneous afferents in the dorsal horn. *Acta physiologica Scandinavica* 38:309-318.
- Lindemann, B. (1996). Taste reception. *Physiological reviews*, 76(3), 719-766.
- Lindemann B (2001) Receptors and transduction in taste. *Nature* 413:219-225.
- Link W, Konietzko U, Kauselmann G, Krug M, Schwanke B, Frey U, Kuhl D (1995) Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:5734-5738.
- Lundberg A, Voorhoeve P (1962) Effects from the pyramidal tract on spinal reflex arcs. *Acta physiologica Scandinavica* 56:201-219.
- Makous W, S. Nord, B. Oakley, C. Pfaffmann (1963) The gustatory relay in the medulla. In *Olfaction and Taste*, . Pergamon Press, New York 381-393.
- Malki A, Fiedler J, Fricke K, Ballweg I, Pfaffl MW, Krautwurst D (2015) Class I odorant receptors, TAS1R and TAS2R taste receptors, are markers for subpopulations of circulating leukocytes. *Journal of leukocyte biology* 97:533-545.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., & Buck, L. B. (1999). Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*, 96(5), 713-723.
- Marder, E., & Goaillard, J. M. (2006). Variability, compensation and homeostasis in neuron and network function. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(7), 563-574.
- Margolskee RF, Dyer J, Kokrashvili Z, Salmon KS, Ilegems E, Daly K, Maillet EL, Ninomiya Y, Mosinger B, Shirazi-Beechey SP (2007) T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:15075-15080.
- Masterton RB, Imig TJ (1984) Neural mechanisms for sound localization. *Annual review of physiology* 46:275-287.
- Matsumoto I, Ohmoto M, Narukawa M, Yoshihara Y, Abe K (2011) Skn-1a (Pou2f3) specifies taste receptor cell lineage. *Nature neuroscience* 14:685-687.
- Matsunami H, Montmayeur JP, Buck LB (2000) A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature* 404:601-604.

- Maurer S, Wabnitz GH, Kahle NA, Stegmaier S, Prior B, Giese T, Gaida MM, Samstag Y, Hansch GM (2015) Tasting *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Human Neutrophils Express the Bitter Receptor T2R38 as Sensor for the Quorum Sensing Molecule N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserine Lactone. *Frontiers in immunology* 6:369.
- Max M, Shanker YG, Huang L, Rong M, Liu Z, Campagne F, Weinstein H, Damak S, Margolskee RF (2001) *Tas1r3*, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus *Sac*. *Nature genetics* 28:58-63.
- McCaughey SA, Scott TR (1998) The taste of sodium. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 22:663-676.
- McLaughlin SK, McKinnon PJ, Margolskee RF (1992) Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins. *Nature* 357:563-569.
- Megias M, Emri Z, Freund TF, Gulyas AI (2001) Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience* 102:527-540.
- Meyer D, Voigt A, Widmayer P, Borth H, Huebner S, Breit A, Marschall S, de Angelis MH, Boehm U, Meyerhof W, Gudermann T, Boekhoff I (2012) Expression of *Tas1* taste receptors in mammalian spermatozoa: functional role of *Tas1r1* in regulating basal Ca^{2+} and cAMP concentrations in spermatozoa. *PLoS one* 7:e32354.
- Meyerhof W, Batram C, Kuhn C, Brockhoff A, Chudoba E, Bufe B, Appendino G, Behrens M (2010) The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chemical senses* 35:157-170.
- Meyerhof W, Born S, Brockhoff A, and Behrens M. (2011) Molecular biology of mammalian bitter taste receptors. A review. *Flavour Fragr J* 26:260–268.
- Mistretta CM (1984) Aging effects on anatomy and neurophysiology of taste and smell. *Gerodontology* 3:131-136.
- Miura, H., Scott, J. K., Harada, S., & Barlow, L. A. (2014). Sonic hedgehog-expressing basal cells are general post-mitotic precursors of functional taste receptor cells. *Developmental Dynamics*, 243(10), 1286-1297.
- Mombaerts, P. (2004). Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(4), 263-278.
- Montecucco C, Schiavo G (1995) Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. *Quarterly reviews of biophysics* 28:423-472.
- Mosinger B, Redding KM, Parker MR, Yevshayeva V, Yee KK, Dyomina K, Li Y, Margolskee RF (2013) Genetic loss or pharmacological blockade of testes-expressed taste genes causes male sterility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:12319-12324.
- Mueller KL, Hoon MA, Erlenbach I, Chandrashekar J, Zuker CS, Ryba NJ (2005) The receptors and coding logic for bitter taste. *Nature* 434:225-229.
- Murray RG (1993) Cellular relations in mouse circumvallate taste buds. *Microscopy research and technique* 26:209-224.
- Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJ, Zuker CS (2001) Mammalian sweet taste receptors. *Cell* 106:381-390.
- Nishimura Masuhiro, Yaguti Hiroshi, Yoshitsugu Hiroki, Naito Shinsaku, Satoh Tetsuo. (2003). Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi*, 123(5), 369-375.
- Norgren R (1974) Gustatory afferents to ventral forebrain. *Brain research* 81:285-295.
- Norgren R (1976) Taste pathways to hypothalamus and amygdala. *The Journal of comparative neurology* 166:17-30.
- Norgren R (1978) Projections from the nucleus of the solitary tract in the rat. *Neuroscience* 3:207-218.
- Norgren R, Leonard CM (1973) Ascending central gustatory pathways. *The Journal of comparative neurology* 150:217-237.

- Oka Y, Butnaru M, von Buchholtz L, Ryba NJ, Zuker CS (2013) High salt recruits aversive taste pathways. *Nature* 494:472-475.
- Olo C, Schwartz IR (1979) The superior olivary complex in C57BL/6 mice. *The American journal of anatomy* 155:349-373.
- Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Somogyi P (1988) Colocalization of glycine-like and GABA-like immunoreactivities in Golgi cell terminals in the rat cerebellum: a postembedding light and electron microscopic study. *Brain research* 450:342-353.
- Pellizzari R, Rossetto O, Schiavo G, Montecucco C (1999) Tetanus and botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic uses. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 354:259-268.
- Perez CA, Huang L, Rong M, Kozak JA, Preuss AK, Zhang H, Max M, Margolskee RF (2002) A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nature neuroscience* 5:1169-1176.
- Perrin JS, Herve PY, Leonard G, Perron M, Pike GB, Pitiot A, Richer L, Veillette S, Pausova Z, Paus T (2008) Growth of white matter in the adolescent brain: role of testosterone and androgen receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:9519-9524.
- Pfaffmann (1941) Gustatory afferent impulses. *J Cell Comp Physiol* 17:243-258.
- Pfaffmann C ER, Frommer GP, Halpern BP (1961) Gustatory discharges in the rat medulla and thalamus. *Sensory Communication*.
- Polydoro M, Schroder N, Lima MN, Caldana F, Laranja DC, Bromberg E, Roesler R, Quevedo J, Moreira JC, Dal-Pizzol F (2004) Haloperidol- and clozapine-induced oxidative stress in the rat brain. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 78:751-756.
- Prandi S, (2015) Characterization of the expression and function of bitter taste receptor genes in gastrointestinal tissue, Dissertation, Deutsches Institut für Ernährungswissenschaften (DIfE).
- Prandi S, Bromke M, Hubner S, Voigt A, Boehm U, Meyerhof W, Behrens M (2013) A subset of mouse colonic goblet cells expresses the bitter taste receptor Tas2r131. *PloS one* 8:e82820.
- Pumplin DW, Yu C, Smith DV (1997) Light and dark cells of rat vallate taste buds are morphologically distinct cell types. *The Journal of comparative neurology* 378:389-410.
- Radtke A, (2007) Die sympathische und sensible Atemwegsinnervation der Ratte: Herkunft und neurochemische Charakterisierung, Dissertation, Charité, Universitätsmedizin, Berlin.
- Rakic, P. (1971). Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in *Macacus rhesus*. *Journal of Comparative Neurology*, 141(3), 283-312.
- Reimann F, Habib AM, Tolhurst G, Parker HE, Rogers GJ, Gribble FM (2008) Glucose sensing in L cells: a primary cell study. *Cell metabolism* 8:532-539.
- Ren X, Zhou L, Terwilliger R, Newton SS, de Araujo IE (2009) Sweet taste signaling functions as a hypothalamic glucose sensor. *Frontiers in integrative neuroscience* 3:12.
- Ressler, K. J., Sullivan, S. L., & Buck, L. B. (1994). Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell*, 79(7), 1245-1255.
- Romanov RA, Kolesnikov SS (2006) Electrophysiologically identified subpopulations of taste bud cells. *Neuroscience letters* 395:249-254.
- Roper SD (2007) Signal transduction and information processing in mammalian taste buds. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 454:759-776.
- Rosen AM, Roussin AT, Di Lorenzo PM (2010) Water as an independent taste modality. *Frontiers in neuroscience* 4:175.
- Roussin AT, D'Agostino AE, Fooden AM, Victor JD, Di Lorenzo PM (2012) Taste coding in the nucleus of the solitary tract of the awake, freely licking rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:10494-10506.

- Rozengurt N, Wu SV, Chen MC, Huang C, Sternini C, Rozengurt E (2006) Colocalization of the alpha-subunit of gustducin with PYY and GLP-1 in L cells of human colon. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 291:G792-802.
- Ruan HZ, Burnstock G (2003) Localisation of P2Y1 and P2Y4 receptors in dorsal root, nodose and trigeminal ganglia of the rat. *Histochem Cell Biol* 120:415-426.
- Scherrer G, Imamachi N, Cao YQ, Contet C, Mennicken F, O'Donnell D, Kieffer BL, Basbaum AI (2009) Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. *Cell* 137:1148-1159.
- Schiebler TH, Korf H-W (2005) *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*: Springer-Verlag.
- Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L (1996) P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *The Journal of clinical investigation* 97:2517-2524.
- Scott K (2005) Taste recognition: food for thought. *Neuron* 48:455-464.
- Sesack SR, Bunney BS (1989) Pharmacological characterization of the receptor mediating electrophysiological responses to dopamine in the rat medial prefrontal cortex: a microiontophoretic study. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 248:1323-1333.
- Sewards TV, Sewards MA (2001) Cortical association areas in the gustatory system. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 25:395-407.
- Shah AS, Ben-Shahar Y, Moninger TO, Kline JN, Welsh MJ (2009) Motile cilia of human airway epithelia are chemosensory. *Science* 325:1131-1134.
- Shepherd, G. M. (1994). Discrimination of molecular signals by the olfactory receptor neuron. *Neuron*, 13(4), 771-790.
- Shepherd JD, Bear MF (2011) New views of Arc, a master regulator of synaptic plasticity. *Nature neuroscience* 14:279-284.
- Shi P, Zhang J, Yang H, Zhang YP (2003) Adaptive diversification of bitter taste receptor genes in Mammalian evolution. *Molecular biology and evolution* 20:805-814.
- Shi, S. R., Shi, Y., & Taylor, C. R. (2011). Antigen retrieval immunohistochemistry review and future prospects in research and diagnosis over two decades. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 59(1), 13-32.
- Simon SA, de Araujo IE, Gutierrez R, Nicolelis MA (2006) The neural mechanisms of gustation: a distributed processing code. *Nature reviews Neuroscience* 7:890-901.
- Singh N, Vrontakis M, Parkinson F, Chelikani P (2011) Functional bitter taste receptors are expressed in brain cells. *Biochemical and biophysical research communications* 406:146-151.
- Small DM, Prescott J (2005) Odor/taste integration and the perception of flavor. *Exp Brain Res* 166:345-357.
- Smith DV, Boughter JD, Jr. (2007) Neurochemistry of the Gustatory System. In: *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology* (Lajtha, A. and Johnson, D., eds), pp 109-135: Springer US.
- Smith DV, Frank M (1972) Cross adaptation between salts in the chorda tympani nerve of the rat. *Physiology & behavior* 8:213-220.
- Smith DV, St John SJ (1999) Neural coding of gustatory information. *Current opinion in neurobiology* 9:427-435.
- Smith DV, Travers JB, Van Buskirk RL (1979) Brainstem correlates of gustatory similarity in the hamster. *Brain research bulletin* 4:359-372.
- Smith KR, Treesukosol Y, Paedae AB, Contreras RJ, Spector AC (2012) Contribution of the TRPV1 channel to salt taste quality in mice as assessed by conditioned taste aversion generalization and chorda tympani nerve responses. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 303:R1195-1205.

- Smith SS, Waterhouse BD, Woodward DJ (1987) Sex steroid effects on extrahypothalamic CNS. II. Progesterone, alone and in combination with estrogen, modulates cerebellar responses to amino acid neurotransmitters. *Brain research* 422:52-62.
- Spector AC (2000) Linking gustatory neurobiology to behavior in vertebrates. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 24:391-416.
- Spector AC, Kopka SL (2002) Rats fail to discriminate quinine from denatonium: implications for the neural coding of bitter-tasting compounds. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:1937-1941.
- Spector AC, Travers SP (2005) The representation of taste quality in the mammalian nervous system. *Behavioral and cognitive neuroscience reviews* 4:143-191.
- Stakhiv, T. M., Mesia-Vela, S., & Kauffman, F. C. (2006). Phase II antioxidant enzyme activities in brain of male and female ACI rats treated chronically with estradiol. *Brain research*, 1104(1), 80-91.
- Stone LM, Barrows J, Finger TE, Kinnamon SC (2007) Expression of T1Rs and gustducin in palatal taste buds of mice. *Chemical senses* 32:255-262.
- Streit WJ, Schulte BA, Balentine DJ, Spicer SS (1985) Histochemical localization of galactose-containing glycoconjugates in sensory neurons and their processes in the central and peripheral nervous system of the rat. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 33:1042-1052.
- Takeda, N., Jain, R., Li, D., Li, L., Lu, M. M., & Epstein, J. A. (2013). Lgr5 identifies progenitor cells capable of taste bud regeneration after injury.
- Taruno, A., Vingtdeux, V., Ohmoto, M., Ma, Z., Dvoryanchikov, G., Li, A., ... & Koppel, J. (2013). CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes. *Nature*, 495(7440), 223-226.
- Thalmann S, Behrens M, Meyerhof W (2013) Major haplotypes of the human bitter taste receptor TAS2R41 encode functional receptors for chloramphenicol. *Biochemical and biophysical research communications* 435:267-273.
- Tizzano M, Cristoforetti M, Sbarbati A, Finger TE (2011) Expression of taste receptors in solitary chemosensory cells of rodent airways. *BMC pulmonary medicine* 11:3.
- Tizzano M, Gulbransen BD, Vandenbeuch A, Clapp TR, Herman JP, Sibhatu HM, Churchill ME, Silver WL, Kinnamon SC, Finger TE (2010) Nasal chemosensory cells use bitter taste signaling to detect irritants and bacterial signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:3210-3215.
- Töle JC, (2013) Über die Arc-catFISH-Methode als neues Werkzeug zur Charakterisierung der Geschmacksverarbeitung im Hirnstamm der Maus, Dissertation, Deutsches Institut für Ernährungsforschung (DIfE).
- Tomchik SM, Berg S, Kim JW, Chaudhari N, Roper SD (2007) Breadth of tuning and taste coding in mammalian taste buds. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:10840-10848.
- Travers JB, Herman K, Yoo J, Travers SP (2007) Taste reactivity and Fos expression in GAD1-EGFP transgenic mice. *Chemical senses* 32:129-137.
- Travers SP (2002) Quinine and citric acid elicit distinctive Fos-like immunoreactivity in the rat nucleus of the solitary tract. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 282:R1798-1810.
- Travers SP, Norgren R (1991) Coding the sweet taste in the nucleus of the solitary tract: differential roles for anterior tongue and nasoincisor duct gustatory receptors in the rat. *Journal of neurophysiology* 65:1372-1380.
- Travers SP, Travers JB (2007) Taste-evoked Fos expression in nitrenergic neurons in the nucleus of the solitary tract and reticular formation of the rat. *The Journal of comparative neurology* 500:746-760.
- Trepel M (2003) *Neuroanatomie: Struktur und Funktion*: Urban & Fischer.
- Ueno S, Tsuda M, Iwanaga T, Inoue K (1999) Cell type-specific ATP-activated responses in rat dorsal root ganglion neurons. *British journal of pharmacology* 126:429-436.

- Trimmer, J. S., & Rhodes, K. J. (2004). Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain. *Annu. Rev. Physiol.*, 66, 477-519.
- Valverde F (1966) The pyramidal tract in rodents. A study of its relations with the posterior column nuclei, dorsolateral reticular formation of the medulla oblongata, and cervical spinal cord. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 71:297-363.
- Vandenbeuch A, Clapp TR, Kinnamon SC (2008) Amiloride-sensitive channels in type I fungiform taste cells in mouse. *BMC neuroscience* 9:1.
- Van Wart, A., & Matthews, G. (2006). Impaired firing and cell-specific compensation in neurons lacking nav1.6 sodium channels. *The Journal of neuroscience*, 26(27), 7172-7180.
- Verhagen JV, Kadohisa M, Rolls ET (2004) Primate insular/opercular taste cortex: neuronal representations of the viscosity, fat texture, grittiness, temperature, and taste of foods. *Journal of neurophysiology* 92:1685-1699.
- Vincent SL, Khan Y, Benes FM (1993) Cellular distribution of dopamine D1 and D2 receptors in rat medial prefrontal cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13:2551-2564.
- Voigt A, Bojahr J, Narukawa M, Hubner S, Boehm U, Meyerhof W (2015a) Transsynaptic Tracing from Taste Receptor Cells Reveals Local Taste Receptor Gene Expression in Gustatory Ganglia and Brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35:9717-9729.
- Voigt A, Hubner S, Doring L, Perlach N, Hermans-Borgmeyer I, Boehm U, Meyerhof W (2015b) Cre-Mediated Recombination in Tas2r131 Cells-A Unique Way to Explore Bitter Taste Receptor Function Inside and Outside of the Taste System. *Chemical senses*.
- Voigt A, Hubner S, Lossow K, Hermans-Borgmeyer I, Boehm U, Meyerhof W (2012) Genetic labeling of Tas1r1 and Tas2r131 taste receptor cells in mice. *Chemical senses* 37:897-911.
- Voigt N, Stein J, Galindo MM, Dunkel A, Raguse JD, Meyerhof W, Hofmann T, Behrens M (2014) The role of lipolysis in human orosensory fat perception. *Journal of lipid research* 55:870-882.
- Wen, S., Götze, I. N., Mai, O., Schauer, C., Leinders-Zufall, T., & Boehm, U. (2011). Genetic identification of GnRH receptor neurons: a new model for studying neural circuits underlying reproductive physiology in the mouse brain. *Endocrinology*, 152(4), 1515-1526.
- Whalen RE, Luttge WG (1971) Differential localization of progesterone uptake in brain. Role of sex, estrogen pretreatment and adrenalectomy. *Brain research* 33:147-155.
- Whitehead MC, Ganchrow JR, Ganchrow D, Yao B (1999) Organization of geniculate and trigeminal ganglion cells innervating single fungiform taste papillae: a study with tetramethylrhodamine dextran amine labeling. *Neuroscience* 93:931-941.
- Whiteside B (1927) Nerve overlap in the gustatory apparatus of the rat. *Journal of Comparative Neurology* 44:363-377.
- Whitney G, Harder DB (1994) Genetics of bitter perception in mice. *Physiology & behavior* 56:1141-1147.
- Wolfe U, Elsholz FA, Kersten A, Haarhaus B, Muller WE, Schempp CM (2015) Expression and functional activity of the bitter taste receptors TAS2R1 and TAS2R38 in human keratinocytes. *Skin pharmacology and physiology* 28:137-146.
- Wu A, Dvoryanchikov G, Pereira E, Chaudhari N, Roper SD (2015) Breadth of tuning in taste afferent neurons varies with stimulus strength. *Nature communications* 6:8171.
- Wu SV, Rozengurt N, Yang M, Young SH, Sinnott-Smith J, Rozengurt E (2002) Expression of bitter taste receptors of the T2R family in the gastrointestinal tract and enteroendocrine STC-1 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:2392-2397.
- Yamamoto M, Wada N, Kitabatake Y, Watanabe D, Anzai M, Yokoyama M, Teranishi Y, Nakanishi S (2003) Reversible suppression of glutamatergic neurotransmission of cerebellar granule cells in vivo by genetically manipulated expression of tetanus neurotoxin light chain. *The Journal of neuroscience* 23:6759-6767.

- Yee CL, Yang R, Bottger B, Finger TE, Kinnamon JC (2001) "Type III" cells of rat taste buds: immunohistochemical and ultrastructural studies of neuron-specific enolase, protein gene product 9.5, and serotonin. *The Journal of comparative neurology* 440:97-108.
- Yong VW (2005) Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nature reviews Neuroscience* 6:931-944.
- Young RL, Sutherland K, Pezos N, Brierley SM, Horowitz M, Rayner CK, Blackshaw LA (2009) Expression of taste molecules in the upper gastrointestinal tract in humans with and without type 2 diabetes. *Gut* 58:337-346.
- Zanger, U. M., & Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & therapeutics*, 138(1), 103-141.
- Zhang CH, Chen C, Lifshitz LM, Fogarty KE, Zhu MS, ZhuGe R (2012) Activation of BK channels may not be required for bitter tastant-induced bronchodilation. *Nature medicine* 18:648-650; author reply 650-641.
- Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Mueller KL, Cook B, Wu D, Zuker CS, Ryba NJ (2003) Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* 112:293-301.
- Zhang Y, Narayan S, Geiman E, Lanuza GM, Velasquez T, Shanks B, Akay T, Dyck J, Pearson K, Gosgnach S (2008) V3 spinal neurons establish a robust and balanced locomotor rhythm during walking. *Neuron* 60:84-96.
- Zhao GQ, Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Erlenbach I, Ryba NJ, Zuker CS (2003) The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* 115:255-266.
- Zhou X-F, Rush RA, McLachlan EM (1996) Differential expression of the p75 nerve growth factor receptor in glia and neurons of the rat dorsal root ganglia after peripheral nerve transection. *The Journal of neuroscience* 16:2901-2911.
- Zottermann Y (1935) Action potentials in the glossopharyngeal nerve and in the chorda tympani. *Scandinavian Physiological Society* 72:73-77.

Anhang

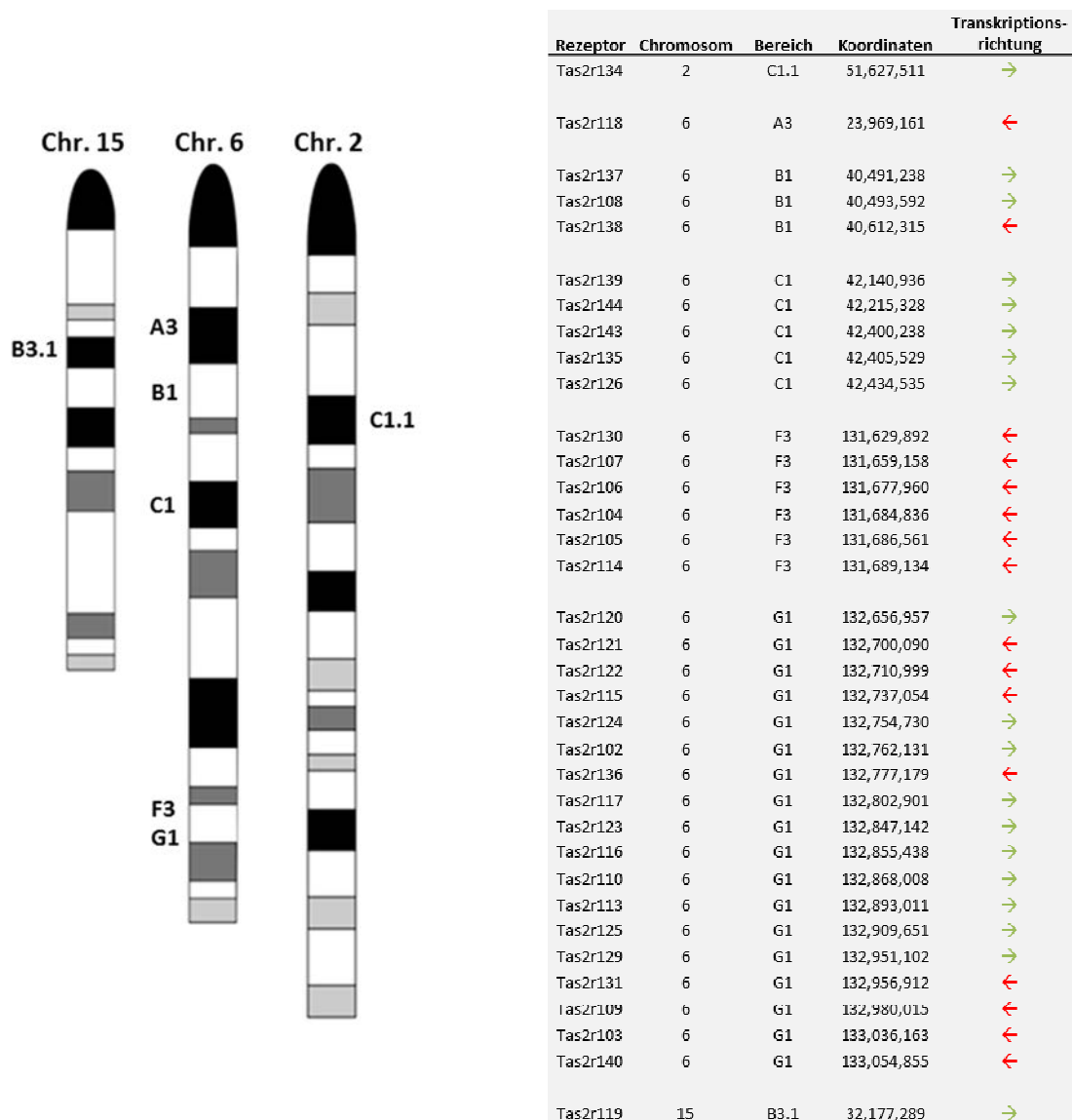


Abbildung A1 Chromosomale Lage der Bitterrezeptoren der Maus auf den Chromosomen 2, 6 und 15. Angegeben sind die chromosomalen Bereiche, die genaue Position der Gene sowie deren Transkriptionsrichtung. Abbildung modifiziert nach David Adler (*Idiogram Album: Mouse* copyright © 1994 David Adler). Die Koordinaten der Tas2r-Gene von C57BL/6-Tieren wurden der NCBI-Gen-Datenbank entnommen.

Tabelle A1 Daten der quantitativen RT-PCR der untersuchten 19 Bitterrezeptoren in den neun Gehirnregionen: *Bulbi olfactorii* (Bul.), Cerebral Cortex (Cor.), Thalamische Region (Thal.), Hypothalamus (Hyp.), *Lamina quadrigemina* (Col.), mediales Mesencephalon (mMes.), caudales Mesencephalon (cMes.), Cerebellum (Cer.) und Medulla oblongata (Med.). Angegeben sind die Mittelwerte (MW) sowie die Standardabweichung (SD) jedes Rezeptors in jedem der neun Hirnregionen.

Rezeptor	Bul.		Cor.		Thal.		Hyp.		Col.	
	MW	SD ±	MW	SD ±	MW	SD ±	MW	SD ±	MW	SD ±
Tas2r105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r108	2,45E-03	1,23E-04	5,77E-04	7,42E-05	1,09E-03	4,51E-04	2,59E-03	6,13E-05	2,13E-03	4,82E-04
Tas2r110	-	-	2,63E-05	8,25E-06	2,40E-04	8,07E-05	2,47E-04	2,18E-05	9,03E-05	4,28E-05
Tas2r114	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r115	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r117	-	-	6,62E-06	2,55E-06	4,66E-05	2,61E-05	2,23E-05	1,16E-05	1,63E-05	1,92E-06
Tas2r118	2,09E-06	2,96E-06	3,54E-06	2,61E-06	7,38E-06	5,22E-06	6,98E-06	3,82E-06	5,70E-06	1,87E-06
Tas2r119	3,69E-06	3,04E-06	-	-	2,91E-06	1,17E-06	6,32E-06	8,28E-07	3,94E-06	2,26E-06
Tas2r120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r121	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r126	8,94E-04	6,95E-05	1,05E-04	2,89E-05	1,86E-04	9,21E-05	5,37E-04	4,39E-05	6,77E-04	1,62E-04
Tas2r131	1,06E-06	1,50E-06	-	-	-	-	-	-	4,22E-06	5,46E-07
Tas2r134	1,04E-05	5,04E-06	3,68E-06	4,53E-07	5,95E-06	3,74E-06	3,21E-05	9,01E-07	1,64E-05	3,53E-06
Tas2r136	-	-	-	-	3,72E-06	8,61E-07	-	-	-	-
Tas2r137	1,97E-03	4,84E-05	3,65E-04	5,54E-05	8,08E-04	3,37E-04	1,71E-03	6,41E-05	1,80E-03	1,54E-04
Tas2r138	6,72E-06	4,45E-06	8,91E-07	1,26E-06	3,09E-06	1,79E-06	8,89E-06	4,64E-07	8,34E-06	1,36E-06
Tas2r140	1,50E-06	1,09E-06	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r143	1,15E-03	2,92E-04	1,30E-04	4,53E-05	1,98E-04	1,14E-04	3,93E-04	3,63E-07	9,04E-04	3,61E-04
Tas2r144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Rezeptor	mMes.		cMes.		Cer.		Med.	
	MW	SD ±	MW	SD ±	MW	SD ±	MW	SD ±
Tas2r105	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r108	1,84E-03	6,50E-04	1,74E-03	1,56E-04	5,55E-03	1,03E-03	1,95E-03	2,51E-04
Tas2r110	2,28E-04	2,75E-04	1,39E-04	7,93E-05	1,25E-04	5,94E-05	1,61E-04	2,39E-05
Tas2r114	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r115	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r117	3,63E-05	2,39E-05	2,61E-05	1,33E-05	2,31E-05	9,29E-06	2,96E-05	7,80E-06
Tas2r118	2,68E-06	2,75E-06	5,41E-06	7,79E-07	7,74E-06	2,67E-06	1,95E-06	1,40E-06
Tas2r119	1,74E-06	1,66E-06	2,25E-06	1,80E-06	-	-	4,76E-06	1,39E-06
Tas2r120	6,18E-07	8,75E-07	-	-	-	-	-	-
Tas2r121	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r126	4,34E-04	1,25E-04	4,06E-04	4,57E-05	8,17E-03	8,04E-04	3,98E-04	5,98E-05
Tas2r131	7,76E-07	1,10E-06	1,94E-06	1,57E-06	-	-	-	-
Tas2r134	9,66E-06	2,67E-06	5,82E-06	1,47E-06	3,86E-07	5,46E-07	6,70E-06	3,48E-06
Tas2r136	8,73E-07	1,23E-06	-	-	-	-	-	-
Tas2r137	1,45E-03	4,49E-04	1,29E-03	5,00E-05	3,98E-03	5,46E-04	1,39E-03	1,72E-04
Tas2r138	6,39E-06	4,87E-06	7,68E-06	2,33E-06	9,63E-06	1,86E-06	7,26E-06	3,10E-06
Tas2r140	2,21E-06	1,31E-06	4,01E-07	5,67E-07	4,71E-06	1,16E-06	-	-
Tas2r143	4,59E-04	2,05E-05	5,46E-04	1,55E-04	9,66E-03	3,35E-03	4,90E-04	1,12E-04
Tas2r144	8,76E-07	1,24E-06	-	-	-	-	1,56E-06	1,11E-06

Tabelle A2 Daten der quantitativen RT-PCR aller 35 untersuchten Bitterrezeptoren in der thalamischen Hirnregion inklusive Basalganglien. Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichung (SD) jedes Rezeptors sowie die Ergebnisse eines Tests auf Signifikanz mittels zweiseitigem t-Test. Gruppengröße n = 3.

Thalamische Region	C57BL/6		Tas2r131 ^{+/+} /Rosa26 ^{+/DTA}		Tas2r131 ^{+/BLUC} /Rosa26 ^{+/DTA}		T-Test		
	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	C57BL/6 vs. Tas2r131 ^{+/+} /Rosa26 ^{+/DTA}	C57BL/6 vs. Tas2r131 ^{+/BLUC} /Rosa26 ^{+/DTA}	Tas2r131 ^{+/+} /Rosa26 ^{+/DTA} vs. Tas2r131 ^{+/BLUC} /Rosa26 ^{+/DTA}
Tas2r102	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r103	3,06E-06	3,57E-06	3,59E-06	2,55E-06	7,34E-06	5,20E-06	0,874	0,392	0,411
Tas2r104	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r105	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r106	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r107	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r108	1,09E-03	4,51E-04	1,38E-03	1,30E-04	1,56E-03	4,74E-04	0,432	0,370	0,637
Tas2r109	-	-	7,00E-08	9,91E-08	1,60E-05	3,83E-06	0,374	0,004*	0,005*
Tas2r110	2,40E-04	8,07E-05	1,98E-04	5,47E-05	3,31E-04	2,88E-04	0,571	0,692	0,557
Tas2r113	3,69E-04	3,84E-04	2,09E-04	6,22E-05	3,33E-04	2,98E-04	0,591	0,922	0,594
Tas2r114	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r115	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r116	5,81E-04	2,66E-04	4,45E-04	7,61E-05	5,99E-04	3,30E-04	0,524	0,955	0,554
Tas2r117	4,66E-05	2,61E-05	2,59E-05	5,23E-06	2,63E-05	5,26E-06	0,334	0,343	0,937
Tas2r118	7,38E-06	5,22E-06	3,18E-06	2,28E-06	7,82E-06	3,29E-06	0,356	0,924	0,177
Tas2r119	2,91E-06	1,17E-06	3,47E-06	6,20E-07	4,60E-06	2,56E-06	0,583	0,442	0,574
Tas2r120	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r121	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r122	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r123	2,98E-04	1,96E-04	1,10E-04	3,00E-05	2,17E-04	8,68E-05	0,250	0,619	0,176
Tas2r124	-	-	9,88E-07	1,40E-06	5,76E-07	8,15E-07	0,374	0,374	0,737
Tas2r125	3,02E-04	4,93E-05	2,33E-04	4,36E-05	3,96E-04	1,87E-04	0,209	0,528	0,293
Tas2r126	1,86E-04	9,21E-05	2,35E-04	2,51E-05	2,90E-04	8,10E-05	0,516	0,299	0,408
Tas2r129	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r130	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r131	-	-	9,89E-07	7,09E-07	-	-	0,120	-	0,120
Tas2r134	5,95E-06	3,74E-06	1,15E-05	3,29E-06	8,42E-06	1,10E-06	0,188	0,421	0,274
Tas2r135	9,03E-04	8,25E-04	8,62E-04	5,06E-05	1,03E-03	1,87E-04	0,947	0,840	0,280
Tas2r136	3,72E-06	8,61E-07	-	-	-	-	0,004*	0,004*	-
Tas2r137	8,08E-04	3,37E-04	1,01E-03	8,05E-05	1,29E-03	2,61E-04	0,452	0,188	0,230
Tas2r138	3,09E-06	1,79E-06	3,78E-06	1,30E-06	7,05E-06	1,87E-06	0,683	0,097	0,112
Tas2r139	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r140	-	-	6,94E-07	9,82E-07	1,77E-06	1,77E-06	0,374	0,201	0,448
Tas2r143	1,98E-04	1,14E-04	2,41E-04	1,10E-05	3,37E-04	9,94E-05	0,624	0,265	0,248
Tas2r144	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle A3 Daten der quantitativen RT-PCR aller 35 untersuchten Bitterrezeptoren im Bereich des medialen Mesencephalon inklusive PAG. Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichung (SD) jedes Rezeptors sowie die Ergebnisse eines Tests auf Signifikanz mittels zweiseitigem *t*-Test. Gruppengröße *n* = 3.

Mediales Mesencephalon	C57BL/6		Tas2r131 ^{+/+} / Rosa26 ^{+/-} /DTA		Tas2r131 ^{+/-BLIC} / Rosa26 ^{+/-} /DTA		T-Test		
	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	C57BL/6 vs. Tas2r131 ^{+/+} / Rosa26 ^{+/-} /DTA	C57BL/6 vs. Tas2r131 ^{+/-BLIC} / Rosa26 ^{+/-} /DTA	Tas2r131 ^{+/+} / Rosa26 ^{+/-} /DTA vs. Tas2r131 ^{+/-BLIC} / Rosa26 ^{+/-} /DTA
Tas2r102	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r103	1,84E-06	2,60E-06	1,49E-06	1,07E-06	2,79E-05	5,88E-06	0,294	0,008*	0,003*
Tas2r104	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r105	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r106	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r107	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r108	1,84E-03	6,50E-04	1,69E-03	4,32E-04	2,49E-03	1,45E-03	0,787	0,594	0,492
Tas2r109	-	-	3,57E-07	5,04E-07	1,01E-04	1,85E-05	0,374	0,002*	0,002*
Tas2r110	2,28E-04	2,75E-04	1,54E-04	8,68E-05	2,82E-04	5,65E-05	0,735	0,797	0,153
Tas2r113	2,26E-04	1,39E-04	1,98E-04	6,58E-05	2,86E-04	2,04E-05	0,810	0,578	0,146
Tas2r114	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r115	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r116	1,99E-04	4,58E-05	3,89E-04	1,66E-04	5,26E-04	1,37E-04	0,195	0,033	0,419
Tas2r117	3,63E-05	2,39E-05	3,87E-05	1,74E-05	4,86E-05	1,65E-05	0,913	0,581	0,592
Tas2r118	2,68E-06	2,75E-06	4,03E-06	9,35E-07	1,13E-05	1,89E-06	0,547	0,022*	0,008*
Tas2r119	1,74E-06	1,66E-06	4,24E-06	1,49E-06	4,15E-06	1,35E-06	0,188	0,187	0,949
Tas2r120	6,18E-07	8,75E-07	-	-	-	-	0,374	0,374	-
Tas2r121	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r122	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r123	1,83E-04	6,05E-05	1,43E-04	4,20E-05	2,59E-04	1,20E-04	0,495	0,467	0,269
Tas2r124	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r125	3,60E-04	1,73E-04	2,45E-04	9,09E-05	4,86E-04	3,06E-04	0,452	0,638	0,345
Tas2r126	4,34E-04	1,25E-04	4,58E-04	3,79E-05	6,32E-04	1,31E-04	0,805	0,197	0,145
Tas2r129	-	-	3,43E-06	1,03E-06	3,27E-06	1,33E-06	0,147	0,202	0,901
Tas2r130	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r131	7,76E-07	1,10E-06	4,58E-07	6,48E-07	-	-	0,742	0,374	0,374
Tas2r134	9,66E-06	2,67E-06	1,62E-05	4,16E-06	1,29E-05	3,64E-06	0,136	0,374	0,445
Tas2r135	1,64E-03	5,24E-05	2,33E-03	5,90E-04	2,33E-03	4,70E-04	0,175	0,108	0,999
Tas2r136	8,73E-07	1,23E-06	-	-	1,10E-06	1,56E-06	0,374	0,878	0,374
Tas2r137	1,45E-03	4,49E-04	1,87E-03	3,47E-04	1,79E-03	5,55E-05	0,353	0,348	0,759
Tas2r138	6,39E-06	4,87E-06	5,70E-06	4,08E-06	5,80E-06	8,03E-07	0,884	0,874	0,065
Tas2r139	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r140	2,21E-06	1,31E-06	3,91E-06	7,10E-07	1,90E-05	4,46E-06	0,287	0,007*	0,009*
Tas2r143	4,59E-04	2,05E-05	4,84E-04	6,25E-05	6,66E-04	1,93E-04	0,627	0,207	0,274
Tas2r144	8,76E-07	1,24E-06	-	-	-	-	0,374	0,374	-

Tabelle A4 Daten der quantitativen RT-PCR aller 35 untersuchten Bitterrezeptoren im Bereich des Cerebellums. Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichung (SD) jedes Rezeptors sowie die Ergebnisse eines Tests auf Signifikanz mittels zweiseitigem *t*-Test. Gruppengröße *n* = 3.

Cerebellum	C57BL/6		Tas2r131 ^{+/+} /Rosa26 ^{+/DTA}		Tas2r131 ^{+/BLUC} /Rosa26 ^{+/DTA}		T-Test		
	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	C57BL/6 vs. Tas2r131 ^{+/+} /Rosa26 ^{+/DTA}	C57BL/6 vs. Tas2r131 ^{+/BLUC} /Rosa26 ^{+/DTA}	Tas2r131 ^{+/+} /Rosa26 ^{+/DTA} vs. Tas2r131 ^{+/BLUC} /Rosa26 ^{+/DTA}
Tas2r102	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r103	3,67E-06	3,21E-06	2,52E-06	2,25E-06	7,32E-06	3,17E-06	0,700	0,316	0,156
Tas2r104	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r105	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r106	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r107	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r108	5,55E-03	1,03E-03	4,95E-03	2,71E-03	4,89E-03	2,78E-04	0,784	0,433	0,979
Tas2r109	-	-	-	-	6,31E-05	7,14E-06	0,374	< 0,001*	< 0,001*
Tas2r110	1,25E-04	5,94E-05	1,22E-04	3,10E-05	1,65E-04	6,77E-05	0,952	0,564	0,460
Tas2r113	1,31E-04	2,56E-05	1,70E-04	4,38E-05	1,92E-04	5,66E-05	0,348	0,238	0,675
Tas2r114	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r115	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r116	1,03E-04	3,70E-05	2,02E-04	1,27E-05	2,41E-04	5,43E-05	0,024*	0,041*	0,378
Tas2r117	2,31E-05	9,29E-06	1,87E-05	7,69E-06	2,16E-05	1,65E-06	0,634	0,832	0,632
Tas2r118	7,74E-06	2,67E-06	1,57E-05	2,52E-06	2,17E-05	8,68E-06	0,038	0,096	0,402
Tas2r119	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r120	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r121	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r122	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r123	6,97E-05	3,83E-05	9,28E-05	2,29E-05	1,17E-04	6,08E-05	0,504	0,403	0,624
Tas2r124	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r125	1,98E-04	7,20E-05	2,36E-04	6,26E-05	2,75E-04	1,26E-04	0,607	0,497	0,716
Tas2r126	8,17E-03	8,04E-04	7,01E-03	3,54E-03	6,52E-03	1,14E-03	0,673	0,169	0,861
Tas2r129	-	-	-	-	4,93E-06	1,26E-06	-	0,003*	0,003*
Tas2r130	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r131	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r134	3,86E-07	5,46E-07	-	-	-	-	0,374	0,374	-
Tas2r135	2,47E-02	9,04E-03	2,08E-02	7,36E-03	2,03E-02	4,62E-03	0,654	0,574	0,950
Tas2r136	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r137	3,98E-03	5,46E-04	3,57E-03	9,45E-04	4,65E-03	1,17E-03	0,625	0,503	0,368
Tas2r138	9,63E-06	1,86E-06	6,33E-06	2,02E-06	1,36E-05	6,27E-06	0,165	0,444	0,196
Tas2r139	-	-	1,47E-06	2,08E-06	-	-	0,123	-	0,123
Tas2r140	4,71E-06	1,16E-06	4,83E-06	7,84E-07	1,41E-05	1,15E-05	0,912	0,314	0,319
Tas2r143	9,66E-03	3,35E-03	7,16E-03	3,53E-03	7,28E-03	3,45E-03	0,507	0,523	0,973
Tas2r144	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle A5 Daten der quantitativen RT-PCR der 10 untersuchten Bitterrezeptoren im Bereich des medialen Mesencephalons. Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichung (SD) jedes Rezeptors sowie die Ergebnisse eines Tests auf Signifikanz mittels zweiseitigem *t*-Test. Gruppengröße *n* = 3.

mediales Mesencephalon Rezeptor	C57BL/6		Tas2r131 ^{BLUG/BLUG}		T-Test
	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	
Tas2r103	1,84E-06	2,60E-06	1,08E-06	1,52E-06	0,260
Tas2r105	-	-	-	-	-
Tas2r106	-	-	-	-	-
Tas2r109	-	-	2,22E-06	5,93E-07	0,006*
Tas2r116	1,99E-04	4,58E-05	2,65E-04	1,01E-04	0,449
Tas2r125	3,60E-04	1,73E-04	5,26E-04	1,26E-04	0,333
Tas2r126	4,34E-04	1,25E-04	5,71E-04	6,43E-05	0,240
Tas2r131	7,76E-07	1,10E-06	-	-	0,374
Tas2r140	2,21E-06	1,31E-06	5,15E-06	1,96E-06	0,153
Tas2r143	4,59E-04	2,05E-05	7,24E-04	1,62E-04	0,084

Rezeptor	Tas2r131 ^{+/+} /Rosa26 ^{+DTA}		Tas2r131 ^{BLUG} /Rosa26 ^{+DTA}		T-Test
	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	
Tas2r103	1,49E-06	1,07E-06	2,79E-05	5,88E-06	0,003*
Tas2r105	-	-	-	-	-
Tas2r106	-	-	-	-	-
Tas2r109	3,57E-07	5,04E-07	1,01E-04	1,85E-05	0,002*
Tas2r116	3,89E-04	1,66E-04	5,26E-04	1,37E-04	0,419
Tas2r125	2,45E-04	9,09E-05	4,86E-04	3,06E-04	0,345
Tas2r126	4,58E-04	3,79E-05	6,32E-04	1,31E-04	0,145
Tas2r131	4,58E-07	6,48E-07	-	-	0,374
Tas2r140	3,57E-06	8,41E-07	1,90E-05	4,46E-06	0,009*
Tas2r143	4,84E-04	6,25E-05	6,66E-04	1,93E-04	0,274

Rezeptor	Tas2r131 ^{+/+} /Rosa26 ^{+TeNT}		Tas2r131 ^{BLUG} /Rosa26 ^{+TeNT}		T-Test
	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	
Tas2r103	2,36E-06	1,78E-06	4,89E-05	2,96E-05	0,045*
Tas2r105	-	-	-	-	-
Tas2r106	-	-	-	-	-
Tas2r109	3,14E-07	4,44E-07	1,02E-04	2,48E-05	0,036*
Tas2r116	4,00E-04	1,71E-04	2,85E-04	4,13E-05	0,522
Tas2r125	6,26E-04	3,11E-04	5,27E-04	1,64E-05	0,479
Tas2r126	7,04E-04	9,03E-05	5,27E-04	4,27E-05	0,632
Tas2r131	-	-	1,84E-06	1,84E-06	0,374
Tas2r140	4,70E-06	7,01E-07	2,58E-05	8,65E-07	< 0,001*
Tas2r143	4,42E-04	3,55E-05	4,19E-04	5,08E-05	0,483

Tabelle A6 Daten der quantitativen RT-PCR der 10 untersuchten Bitterrezeptoren im Bereich des Cerebellums. Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichung (SD) jedes Rezeptors sowie die Ergebnisse eines Tests auf Signifikanz mittels zweiseitigem *t*-Test. Gruppengröße *n* = 3.

Cerebellum Rezeptor	C57BL/6		Tas2r131 ^{BLIG/BLIG}		T-Test
	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	
Tas2r103	3,67E-06	3,21E-06	4,04E-06	6,94E-07	0,881
Tas2r105	-	-	-	-	-
Tas2r106	-	-	-	-	-
Tas2r109	-	-	7,15E-07	1,01E-06	0,853
Tas2r116	1,03E-04	3,70E-05	1,25E-04	2,88E-05	0,541
Tas2r125	1,98E-04	7,20E-05	2,97E-04	5,33E-05	0,195
Tas2r126	8,17E-03	8,04E-04	7,65E-03	6,06E-04	0,504
Tas2r131	-	-	-	-	-
Tas2r140	4,71E-06	1,16E-06	4,62E-06	1,19E-06	0,937
Tas2r143	9,66E-03	3,35E-03	4,09E-03	1,84E-03	0,108
Rezeptor	Tas2r131 ^{+/-} /Rosa26 ^{+/-DTA}		Tas2r131 ^{+/-BLIC} /Rosa26 ^{+/-DTA}		T-Test
	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	
Tas2r103	2,52E-06	2,25E-06	7,32E-06	3,17E-06	0,156
Tas2r105	-	-	-	-	-
Tas2r106	-	-	-	-	-
Tas2r109	-	-	6,31E-05	7,14E-06	< 0,001*
Tas2r116	2,02E-04	1,27E-05	2,41E-04	5,43E-05	0,378
Tas2r125	2,36E-04	6,26E-05	2,75E-04	1,26E-04	0,716
Tas2r126	7,01E-03	3,54E-03	6,52E-03	1,14E-03	0,861
Tas2r131	-	-	-	-	-
Tas2r140	4,83E-06	7,84E-07	1,41E-05	1,15E-05	0,319
Tas2r143	7,16E-03	3,53E-03	7,28E-03	3,45E-03	0,973
Rezeptor	Tas2r131 ^{+/-} /Rosa26 ^{+/-TeNT}		Tas2r131 ^{+/-BLIC} /Rosa26 ^{+/-TeNT}		T-Test
	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	
Tas2r103	5,67E-06	9,31E-07	1,95E-05	3,61E-06	0,006*
Tas2r105	-	-	-	-	-
Tas2r106	-	-	-	-	-
Tas2r109	5,33E-07	7,54E-07	8,77E-05	3,69E-06	< 0,001*
Tas2r116	2,80E-04	2,31E-04	1,08E-04	2,66E-05	0,354
Tas2r125	2,30E-04	6,90E-05	2,23E-04	3,92E-05	0,912
Tas2r126	8,34E-03	1,50E-03	7,07E-03	7,29E-04	0,341
Tas2r131	2,28E-06	1,68E-06	-	-	0,128
Tas2r140	2,97E-06	4,71E-07	9,98E-06	3,21E-06	0,038*
Tas2r143	5,36E-03	5,68E-04	5,31E-03	7,30E-04	0,952

Tabelle A7 Daten der quantitativen RT-PCR der 10 untersuchten Bitterrezeptoren im angereicherten Gewebe der Wallpapille. Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichung (SD) jedes Rezeptors sowie die Ergebnisse eines Tests auf Signifikanz mittels zweiseitigem t-Test. Gruppengröße n = 3.

Wallpapille Rezeptor	C57BL/6		Tas2r131 ^{BLIG/BLIG}		T-Test
	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	
Tas2r103	2,02E-04	5,84E-05	1,40E-04	5,69E-05	0,340
Tas2r105	1,05E-03	1,56E-04	1,11E-03	3,25E-04	0,800
Tas2r106	6,52E-04	2,41E-04	1,08E-03	2,03E-04	0,129
Tas2r109	1,30E-04	5,72E-05	1,71E-04	4,64E-05	0,469
Tas2r116	8,29E-04	2,29E-04	8,55E-04	3,05E-04	0,928
Tas2r125	2,26E-04	8,48E-05	1,54E-04	3,69E-05	0,334
Tas2r126	1,42E-03	3,52E-04	1,74E-03	5,96E-04	0,546
Tas2r131	5,54E-05	5,20E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,004*
Tas2r140	5,54E-05	1,77E-05	9,27E-05	3,00E-05	0,204
Tas2r143	4,58E-04	4,03E-04	7,15E-04	6,09E-05	0,374
	Tas2r131 ^{+/+} /Rosa26 ^{+/-DTA}		Tas2r131 ^{+/-BLIC} /Rosa26 ^{+/-DTA}		
Rezeptor	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	T-Test
Tas2r103	1,02E-03	2,50E-04	-	-	≤ 0,001*
Tas2r105	3,46E-03	1,44E-03	6,83E-04	2,66E-04	0,005*
Tas2r106	2,58E-03	1,06E-03	7,82E-04	3,85E-04	0,007*
Tas2r109	4,98E-04	2,32E-04	-	-	0,003*
Tas2r116	3,80E-03	1,88E-03	6,57E-05	5,28E-05	0,006*
Tas2r125	1,32E-03	5,84E-04	2,97E-05	1,83E-05	0,003*
Tas2r126	4,17E-03	1,81E-03	4,35E-03	9,76E-04	0,840
Tas2r131	2,25E-03	2,19E-03	1,80E-05	2,65E-05	0,055
Tas2r140	6,84E-04	1,85E-04	6,99E-06	8,14E-06	≤ 0,001*
Tas2r143	8,55E-04	1,80E-04	1,56E-03	4,94E-04	0,015*
	Tas2r131 ^{+/+} /Rosa26 ^{+/-TeNT}		Tas2r131 ^{+/-BLIC} /Rosa26 ^{+/-TeNT}		
Rezeptor	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	T-Test
Tas2r103	2,56E-04	4,45E-05	2,52E-04	6,58E-05	0,953
Tas2r105	1,44E-03	2,74E-04	1,42E-03	4,13E-04	0,958
Tas2r106	1,21E-03	3,39E-04	2,05E-03	6,34E-04	0,175
Tas2r109	2,71E-04	6,52E-05	2,22E-04	6,70E-05	0,499
Tas2r116	8,94E-04	1,63E-04	1,05E-03	3,93E-04	0,622
Tas2r125	3,25E-04	5,41E-05	1,81E-04	7,71E-05	0,097
Tas2r126	2,31E-03	3,08E-04	1,94E-03	3,81E-04	0,341
Tas2r131	4,40E-04	8,21E-05	2,14E-04	8,17E-05	0,051
Tas2r140	7,06E-05	2,54E-06	8,33E-05	1,76E-05	0,372
Tas2r143	9,40E-04	8,69E-05	8,33E-04	1,06E-04	0,333

Tabelle A8 Daten der quantitativen RT-PCR der 10 untersuchten Bitterrezeptoren im Rückenmark. Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichung (SD) jedes Rezeptors sowie die Ergebnisse eines Tests auf Signifikanz mittels zweiseitigem t-Test. Gruppengröße n = 3.

Rückenmark Rezeptor	Tas2r131 ^{+/+} /Rosa26 ^{+/-DTA}		Tas2r131 ^{+/-BLIC} /Rosa26 ^{+/-DTA}		T-Test
	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	
Tas2r103	3,61E-06	2,58E-06	5,44E-05	1,87E-05	0,019*
Tas2r105	-	-	-	-	-
Tas2r106	-	-	-	-	-
Tas2r109	-	-	9,62E-05	8,38E-06	< 0,001*
Tas2r116	3,63E-04	1,23E-04	3,47E-04	8,56E-05	0,889
Tas2r125	6,16E-04	2,63E-04	1,31E-03	1,41E-04	0,030*
Tas2r126	3,21E-04	6,02E-05	3,69E-04	8,99E-05	0,570
Tas2r131	-	-	-	-	-
Tas2r140	-	-	4,27E-05	2,12E-05	0,046*
Tas2r143	2,41E-04	1,51E-04	3,01E-04	1,41E-04	0,701

Tabelle A9 Daten der quantitativen RT-PCR der 10 untersuchten Bitterrezeptoren im *Ganglion nodosum/petrosum*. Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichung (SD) jedes Rezeptors sowie die Ergebnisse eines Tests auf Signifikanz mittels zweiseitigem *t*-Test. Gruppengröße *n* = 3-4.

NPG	C57BL/6		Tas2r131 ^{+/+} /Rosa26 ^{+/DTA}		Tas2r131 ^{+/BLIC} /Rosa26 ^{+/DTA}		T-Test		
	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	C57BL/6 vs. Tas2r131 ^{+/+} /Rosa26 ^{+/DTA}	C57BL/6 vs. Tas2r131 ^{+/BLIC} /Rosa26 ^{+/DTA}	Tas2r131 ^{+/+} /Rosa26 ^{+/DTA} vs. Tas2r131 ^{+/BLIC} /Rosa26 ^{+/DTA}
Tas2r103	-	-	5,07E-07	7,17E-07	2,00E-06	1,40E-06	0,374	0,014*	0,213
Tas2r105	6,44E-07	9,11E-07	-	-	-	-	0,374	0,374	-
Tas2r106	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tas2r109	-	-	2,33E-07	4,04E-07	1,29E-06	1,09E-07	0,437	< 0,001*	0,005*
Tas2r116	6,88E-06	9,72E-06	6,11E-05	6,09E-05	7,89E-07	1,37E-06	0,383	0,450	0,235
Tas2r125	2,89E-05	1,94E-05	9,11E-05	8,66E-05	1,68E-06	2,91E-06	0,377	0,127	0,141
Tas2r126	2,20E-04	3,48E-05	2,75E-04	7,49E-05	2,62E-04	8,93E-05	0,357	0,766	0,846
Tas2r131	6,66E-07	9,41E-07	-	-	-	-	0,286	0,374	-
Tas2r140	2,14E-06	1,85E-07	1,10E-06	8,84E-07	2,47E-07	4,29E-07	0,089	0,007*	0,357
Tas2r143	1,73E-04	2,21E-05	1,98E-04	4,90E-05	1,68E-04	6,78E-05	0,516	0,088	0,560

Tabelle A10 Daten der quantitativen RT-PCR der 10 untersuchten Bitterrezeptoren im *Ganglion geniculum*. Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichung (SD) jedes Rezeptors sowie die Ergebnisse eines Tests auf Signifikanz mittels zweiseitigem *t*-Test. Gruppengröße *n* = 3-4.

GG	C57BL/6		Tas2r131 ^{+/+} /Rosa26 ^{+/DTA}		Tas2r131 ^{+/BLIC} /Rosa26 ^{+/DTA}		T-Test		
	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	Mittelwert (2-ΔCT)	± SD	C57BL/6 vs. Tas2r131 ^{+/+} /Rosa26 ^{+/DTA}	C57BL/6 vs. Tas2r131 ^{+/BLIC} /Rosa26 ^{+/DTA}	Tas2r131 ^{+/+} /Rosa26 ^{+/DTA} vs. Tas2r131 ^{+/BLIC} /Rosa26 ^{+/DTA}
Tas2r103	3,35E-06	4,73E-06	-	-	5,40E-06	4,11E-06	0,286	0,667	0,077
Tas2r105	-	-	1,19E-06	1,81E-06	-	-	0,363	-	0,285
Tas2r106	-	-	1,44E-06	2,04E-06	-	-	0,374	-	0,286
Tas2r109	4,55E-06	3,64E-06	4,69E-07	8,13E-07	9,05E-07	1,57E-06	0,126	0,190	0,684
Tas2r116	3,57E-04	1,51E-04	5,41E-05	5,27E-05	-	-	0,056	0,010*	0,143
Tas2r125	7,13E-04	2,65E-04	1,06E-04	1,11E-04	2,03E-06	3,52E-06	0,040*	0,006*	0,175
Tas2r126	4,74E-04	5,18E-05	5,02E-04	1,53E-04	4,34E-04	5,00E-05	0,820	0,479	0,585
Tas2r131	1,41E-06	1,00E-06	6,77E-07	9,57E-07	-	-	0,495	0,117	0,374
Tas2r140	-	-	5,09E-06	4,14E-06	3,95E-07	6,85E-07	0,132	0,437	0,101
Tas2r143	4,12E-04	5,62E-05	7,44E-04	2,51E-05	5,01E-04	1,63E-04	0,002*	0,598	0,106

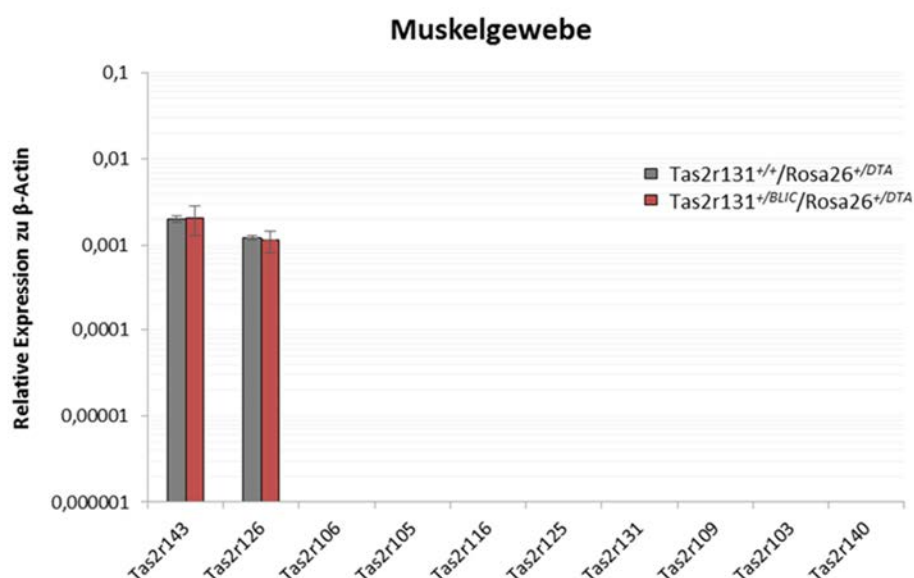


Abbildung A2 Vergleich der Expressionspegel von zehn Bittergeschmacksrezeptoren im Gewebe des *Musculus quadriceps femoris*. Die Analysen wurden in Mäusen der Linie Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/DTA} (rot) und deren Kontrolltiere Tas2r131^{+/+}/Rosa26^{+/DTA} (hellgrau) durchgeführt. Logarithmische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Rezeptoren in Abhängigkeit der Lage und Anordnung auf dem Chromosom 6. Gruppengröße n = 3. Die Ergebnisse der Analysen zeigten eine Expression sowie vergleichbare Expressionspegel der Rezeptoren Tas2r143 und Tas2r126 in Tas2r131^{+/BLIC}/Rosa26^{+/DTA} (rot) und deren Kontrolltieren Tas2r131^{+/+}/Rosa26^{+/DTA}. Andere Bitterrezeptoren konnten im Gewebe des *Musculus quadriceps femoris* in beiden Gruppen nicht nachgewiesen werden.

Tabelle A11 Daten der quantitativen RT-PCR der 10 untersuchten Bitterrezeptoren im Muskelgewebe des *Musculus quadriceps femoris*. Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichung (SD) jedes Rezeptors sowie die Ergebnisse eines Tests auf Signifikanz mittels zweiseitigem t-Test. Gruppengröße n = 3.

Muskelgewebe Rezeptor	Tas2r131 ^{+/+} /Rosa26 ^{+/DTA}		Tas2r131 ^{+/BLIC} /Rosa26 ^{+/DTA}		T-Test
	Mittelwert (2- Δ CT)	\pm SD	Mittelwert (2- Δ CT)	\pm SD	
Tas2r103	-	-	-	-	-
Tas2r105	-	-	-	-	-
Tas2r106	-	-	-	-	-
Tas2r109	-	-	-	-	-
Tas2r116	-	-	-	-	-
Tas2r125	-	-	-	-	-
Tas2r126	1,22E-03	7,31E-05	1,14E-03	3,20E-04	0,738
Tas2r131	-	-	-	-	-
Tas2r140	-	-	-	-	-
Tas2r143	2,02E-03	1,92E-04	2,07E-03	7,61E-04	0,935

Tabelle A12 Daten der nukleären Arc-Expression im NPG von C57BL/6-Tieren nach oraler Stimulation. Als Stimulus dienten ein Kontrollstimulus, die drei Bitterstimuli Cucurbitacin I (1 mM), Cycloheximid (0,5 mM) und Chinin HCl (10 mM) sowie ein Bittermix (0,1 mM Cycloheximid, 3 mM Chinin HCl, 0,1 mM Cucurbitacin I, 10 mM Denatoniumbenzoate, 3 mM 6n-Propylthiouracil, 10 mM Papaverin, 100 mM Natriumbenzoat, 100 mM Arbutin). Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen der gezählten Arc-exprimierenden Zellen. Gruppengröße n = 2-5.

NPG	C57BL/6	
	MW	\pm SD
Kontrollstimulus	45,0	17,9
Cucurbitacin I	146,5	5,5
Cycloheximid	318,7	81,8
Chinin	380,0	121,7
Bittermix	288,3	30,6

Tabelle A13 Daten der nukleären Arc-Expression im NPG in Tas2r131^{+/-}/Blic/Rosa26^{+/-}/TeNT- sowie Kontrolltieren nach oraler Stimulation. Als Stimulus dienten eine Kontrollsubstanz und die beiden Bitterstoffe Cycloheximid (0,5 mM) und Papaverin (3 mM). Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen der gezählten Arc-exprimierenden Zellen im NPG jedes Tieres. Gruppengröße n = 3.

NPG	Tas2r131 ^{+/-} /Rosa26 ^{+/-} /TeNT Tas2r131 ^{+/-} /Blic/Rosa26 ^{+/-}		Tas2r131 ^{+/-} /Blic/Rosa26 ^{+/-} /TeNT	
	MW	± SD	MW	± SD
Kontrollstimulus	74,7	39,161	93,3	4,922
Cycloheximid	197,3	52,955	242,3	25,486
Papaverin	226,5	38,982	256,3	16,859

Tabelle A14 Daten der nukleären Arc-Expression im NTS in Tas2r131^{+/-}/Blic/Rosa26^{+/-}/TeNT sowie Kontrolltieren nach oraler Stimulation. Appliziert wurde ein Kontrollstimulus oder eine der beiden Bittersubstanzen Cycloheximid (0,5 mM) und Papaverin (3 mM). Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen der gezählten Arc-exprimierenden Zellen pro mm² im NTS. Gruppengröße n = 3.

NTS	Tas2r131 ^{+/-} /Rosa26 ^{+/-} /TeNT Tas2r131 ^{+/-} /Blic/Rosa26 ^{+/-}		Tas2r131 ^{+/-} /Blic/Rosa26 ^{+/-} /TeNT	
	MW	± SD	MW	± SD
Kontrollstimulus	4,7	0,4077	6,0	1,8604
Cycloheximid	13,8	4,7436	13,1	1,575
Papaverin	21,2	4,2007	6,7	0,9944

Tabelle A15 Zwei-Flaschen-Präferenztests beim Test Bitterlösung gegen Wasser. Angegeben sind die Konzentrationen des Bitterstoffes. Weiterhin angegeben sind der durchschnittliche Konsum in ml sowie die Standardabweichung von der jeweiligen Bittersubstanz und Wasser.

	Konsum (MW) in ml +/- SD in 48 h		Wasser	Konsum (MW) in ml +/- SD in 48 h	
Chi	0,1 mM	3,19 ± 0,74	Wasser	4,27 ± 1,02	
	0,2 mM	2,71 ± 0,93		4,31 ± 0,48	
	0,3 mM	1,54 ± 1,17		5,66 ± 1,95	
	1 mM	1,72 ± 0,45		8,65 ± 1,28	
Den.	0,3 mM	4,42 ± 1,97	Wasser	6,61 ± 1,47	
	1 mM	3,96 ± 0,52		8,76 ± 1,08	
	3 mM	1,63 ± 1,13		8,33 ± 1,01	
Pap.	0,1 mM	4,17 ± 0,78	Wasser	6,47 ± 1,78	
	0,3 mM	1,86 ± 1,15		6,69 ± 1,21	
	1 mM	1,77 ± 0,75		7,76 ± 0,81	
	3 mM	1,55 ± 0,38		7,55 ± 0,85	
Sal.	1 mM	5,07 ± 1,32	Wasser	6,92 ± 1,93	
	3 mM	3,37 ± 1,60		7,04 ± 2,13	
	10 mM	1,37 ± 0,64		8,32 ± 1,29	
Soa	0,1 mM	4,90 ± 1,82	Wasser	6,65 ± 1,83	
	0,5 mM	3,58 ± 1,98		3,48 ± 1,63	
	1 mM	4,72 ± 1,14		4,86 ± 0,53	
	3 mM	5,07 ± 1,05		4,68 ± 0,87	
Arbutin	1 mM	3,66 ± 1,03	Wasser	8,53 ± 1,76	
	5 mM	2,35 ± 0,34		8,72 ± 1,69	
	10 mM	2,12 ± 0,44		9,68 ± 1,51	
	30 mM	2,29 ± 0,47		9,87 ± 1,43	
	100 mM	2,21 ± 0,70		8,48 ± 1,39	

Tabelle A16 Die 11 Paarungen des Zwei-Flaschen-Präferenztests beim Test Bittersubstanz gegen Bittersubstanz. Angegeben sind die Konzentrationen des Bitterstoffes sowie das Leckverhältnis zu Wasser. Ein Wert nahe 1 entspricht einem Konsum der Bittersubstanz ähnlich wie Wasser. Ein Wert nahe null zeigt, dass die Substanz vorwiegend vermieden wurde. Arb.: Arbutin, Chi.: Chinin, Den.: Denatoniumbenzoat, Pap.: Papaverin, Sal.: Salicylsäure.

Testpaar	Konsumverhältnis zu Wasser	Testpaar	Konsumverhältnis zu Wasser	Testpaar	Konsumverhältnis zu Wasser
Pap 3 mM	0,206	Chi. 0,2 mM	0,628	Pap. 0,1 mM	0,645
Chi. 1 mM	0,199	Sal. 3 mM	0,478	Sal. 1 mM	0,733
Chi. 0,2 mM	0,628	Den. 3 mM	0,196	Chi. 0,2 mM	0,628
Arb. 1 mM	0,429	Pap. 3 mM	0,206	Dem. 1 mM	0,452
Den. 3 mM	0,196	Arb. 1 mM	0,429	Den. 3 mM	0,196
Sal. 10 mM	0,164	Sal. 3 mM	0,478	Arb. 10 mM	0,219
Pap 3 mM	0,206	Soa 1 mM	0,973		
Arb. 5 mM	0,269	Den. 0,3 mM	0,668		

Tabelle A17 Ergebnisse der Zwei-Flaschen-Präferenz-Tests des Konsums der Bitterlösungen. Angegeben sind die Mittelwerte (MW) und Standardabweichung der Flüssigkeitsaufnahme der entsprechenden Paarungen an Bitterlösungen sowie die Tests auf Signifikanz mittels zweiseitigem t-Test. Arb.: Arbutin, Chi.: Chinin, Den.: Denatoniumbenzoat, Pap.: Papaverin, Sal.: Salicylsäure.

Testpaar	Konsum (MW) in ml ± SD in 48 h	Testpaar	Konsum (MW) in ml ± SD in 48 h	Testpaar	Konsum (MW) in ml ± SD in 48 h
Pap 3 mM	4,39 ± 1,29	Chi. 0,2 mM	1,90 ± 1,16	Pap. 0,1 mM	2,50 ± 0,80
Chi. 1 mM	3,76 ± 1,69	Sal. 3 mM	6,89 ± 2,15	Sal. 1 mM	5,08 ± 0,92
Chi. 0,2 mM	3,72 ± 1,91	Den. 3 mM	3,65 ± 2,22	Chi. 0,2 mM	2,02 ± 1,05
Arb. 1 mM	6,93 ± 2,97	Pap. 3 mM	0,98 ± 1,09	Den. 1 mM	4,96 ± 1,58
Den. 3 mM	3,52 ± 1,76	Arb. 1 mM	7,11 ± 1,61	Den. 3 mM	0,61 ± 0,66
Sal. 10 mM	4,18 ± 1,39	Sal. 3 mM	3,54 ± 1,38	Arb. 10 mM	6,95 ± 1,66
Pap 3 mM	1,66 ± 1,47	Soa 1 mM	5,70 ± 1,47		
Arb. 5 mM	7,75 ± 1,15	Den. 0,3 mM	1,80 ± 1,36		

Paarung	T-Test	Paarung	T-Test	Paarung	T-Test
Pap. vs. Chi.	0,524	Chi. vs. Sal.	< 0,001*	Pap. vs. Sal.	< 0,001*
Chi. vs. Arb.	0,014*	Den. vs. Pap.	0,002*	Chi. vs. Den.	0,006*
Den. vs. Sal.	0,461	Arb. vs. Sal.	< 0,001*	Den. vs. Arb.	< 0,001*
Pap. Vs. Arb.	< 0,001*	Soa vs. Den.	< 0,001*		

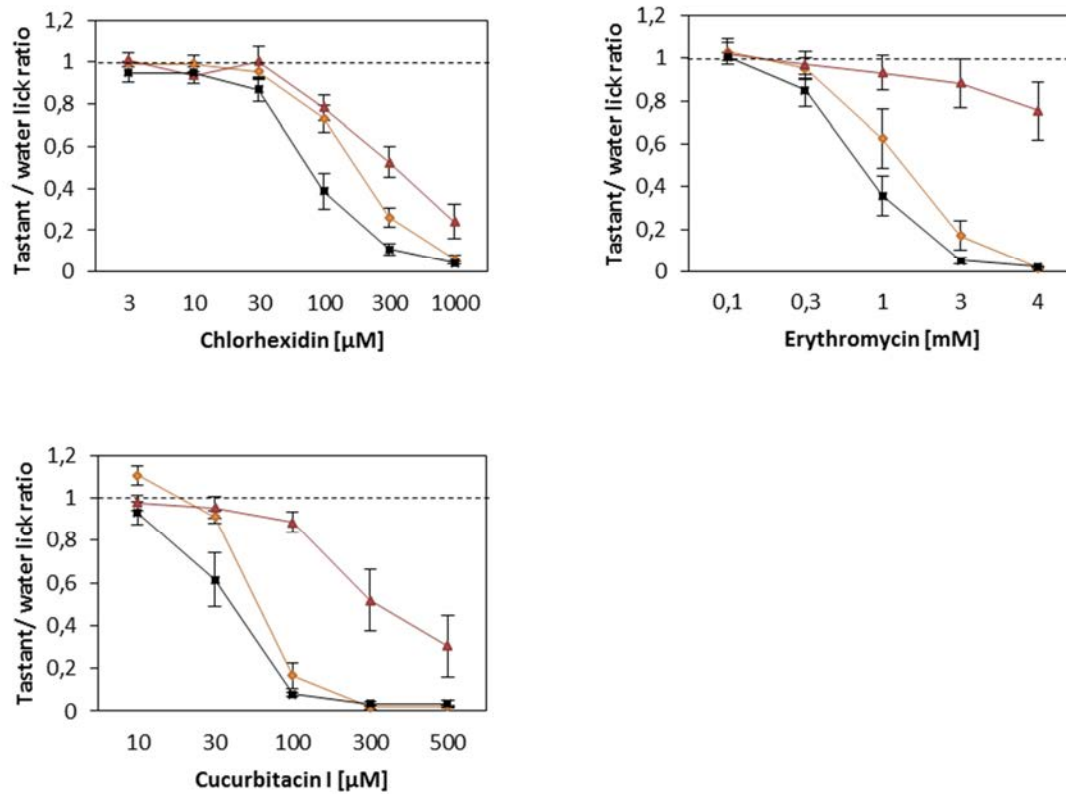


Abbildung A3 Dosis-Wirkungskurven nach Kurzzeitpräferenztest mit Chlorhexidin, Erythromycin und Cucurbitacin I mit *Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA}*- und *Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}*-Mäusen. Daten der *Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA}*-Mäuse, in denen die gesamte *Tas2r131*-Zellpopulation eliminiert ist, sind in Rot dargestellt, deren Kontrolltiere in schwarz. Die Daten der *Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}*-Mäuse mit unterbrochener synaptischer Weiterleitung in *Tas2r131*-Neuronen aufweisen, sind in Gelb dargestellt. *Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{TeNT}*-Tiere zeigen für alle Substanzen ein intermediäres Leckverhalten im Vergleich zu *Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA}*- und Kontrolltieren. Die Daten der *Tas2r131^{BLIC}/Rosa26^{DTA}*-Mäuse wurden durch Dr. Sabine Frenzel erhoben.

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei all jenen Menschen, die mich auf dem Weg meiner Dissertation so tatkräftig unterstützt und mir den Rücken gestärkt und frei gehalten haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Wolfgang Meyerhof für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit in der Abteilung Molekulare Genetik. Ich danke ihm für die stete Unterstützung, die anregenden Diskussionen und die Freiräume in der wissenschaftlichen Gestaltung dieser Arbeit. Ich weiß ihren Rat und Ihre Zeit zu schätzen. Danke dafür!

Ein großes Dankeschön an Frau Dr. Anja Voigt für die ständige Unterstützung. Deine ewig währende Geduld insbesondere bei der Präparation der Ganglien, deine Ratschläge und deine stetige Motivation haben das Projekt mit voran gebracht. Danke für deine gute Laune und Visionen insbesondere in den langen Diskussionsrunden.

Vielen Dank auch an Dr. Kristina Loßow für die *in-vitro*-Daten und die Bitterrezeptor-Plasmide, die ich mit benutzen durfte. Ich danke dir für deine Ratschläge und Diskussionen sowie den unterhaltsamen Gesprächen bei uns im Büro.

Ein großes Dankeschön auch an Dr. Jonas Töle, der mir die *Arc-in-situ*-Hybridisierung mit dem Tecan beigebracht hat. Vielen Dank ebenfalls für die Auszählung der Arc Signale im NTS und die schönen und lustigen Pausenzeiten! Vielen Dank an Dr. Sandra Hübner für die anregenden Diskussionen.

Einen lieben Dank auch an Suszie Tyree für die vielen gemeinsamen Stunden bei der Stimulation der Mäuse, der Vorbehandlung von unseren Objektträgern und den langen Tecan-Läufen.

Ein großes Dankeschön ebenfalls an „meine“ studentische Hilfskraft Lisa Schmors, die so ausdauernd Gehirne am Kryostaten geschnitten hat.

Ein ganz liebes Dankeschön auch an Stefanie Demgensky und Josefine Würfel, die mich stets bei den Experimenten unterstützt haben, insbesondere bei den schier endlos vielen qRT-PCRs und den Lickometerexperimenten. Danke, dass ihr mir stets mit Rat und Tat zur Seite standet für die kleinen und großen Probleme im Laboralltag. Vielen Dank auch für die lustigen Stunden mit euch im Labor, insbesondere während des teils so eintönigen Schneidens am Kryostaten.

Vielen Dank an Dr. Reinhard Kluge, Dr. Stefanie Krämer, Elke Thom und die vielen fleißigen Mitarbeiter des Max Rubner Labors, die sich um unsere Mäuse kümmern.

Ein dickes Dankeschön für die moralische Unterstützung an das gesamte Team der Molekularen Genetik. Vielen Dank euch allen für das schöne Arbeitsklima und auch für die Aktivitäten, die außerhalb des Labors stattfanden.

Zuletzt danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich in jeder Situation unterstützt und bestärkt haben. Es war schön nach Hause zu kommen und so von euch umsorgt zu werden.

Vielen Dank auch an Thomas, der meine Launen ausgehalten hat und mich nach Rückschlägen immer wieder aufgebaut hat, insbesondere wenn ich mal wieder unterzuckert und deprimiert nach Hause kam.

Ihr hattet oft das richtige Wort zur richtigen Zeit, Ihr ward mein Licht in der Dunkelheit!

Vielen Dank euch allen!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit wurde bisher an keiner anderen Hochschule zur Begutachtung eingereicht.

Potsdam, Januar 2016

Antje Stolzenburg