

Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke
- Molekulare Genetik -

**Kartierung der Bindungstasche des humanen
Bittergeschmacksrezeptors hTAS2R10**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin „Molekulare Genetik“

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von

Stephan Born

Potsdam, 2012-03

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland
Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2012/6139/>
URN [urn:nbn:de:kobv:517-opus-61392](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-61392)
<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-61392>

“De gustibus non est disputandum”

(Jean Anthelme Brillat-Savarin)

1. Einleitung	1
1.1 Geschmack und Geschmackswahrnehmung	1
1.2 Die Geschmacksqualitäten.....	3
1.3 Die Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren	6
1.3.1 Klassifizierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren.....	6
1.3.2 Das erweiterte ternäre Komplex-Modell der GPCR-Aktivierung.....	7
1.3.3 G-Protein-Isoformen und G-Protein-Effektormoleküle	8
1.4 Die Bittergeschmacksrezeptoren, eine Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.....	9
1.4.1 Signaltransduktion von GPCR am Beispiel der Bittergeschmacksrezeptoren in Typ-II-Zellen	9
1.4.2 Expression von Bittergeschmacksrezeptoren	11
1.4.3 Bitterstoffe und Bittergeschmacksrezeptoren.....	13
1.4.4 Struktur-Funktions-Beziehung von Bittergeschmacksrezeptoren	16
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Materialien	19
2.1.1 Chemikalien.....	19
2.1.2 Geschmacksstoffe	19
2.1.3 Geräte.....	20
2.1.4 Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.5 Computersoftware und Internetanwendungen.....	21
2.1.6 Verwendete Haplotypen der Bittergeschmacksrezeptoren (TAS2R).....	22
2.1.7 Plasmide.....	23
2.2 Molekularbiologie.....	24
2.2.1 Lösungen und Medien	24
2.2.2 Bakterienstämme	25
2.2.3 Enzyme	25
2.2.4 Generierung von Bittergeschmacksrezeptormutanten und -chimären durch zielgerichtete, ortsspezifische Mutagenese.....	25
2.2.5 Restriktionsanalyse.....	29
2.2.6 Dephosphorylierung des geschnittenen Expressionsvektors.....	30
2.2.7 Elektrophorese	30

2.2.8 Ligation.....	31
2.2.9 Transformation kompetenter Bakterien.....	32
2.2.10 Vermehrung und Isolation von Plasmid-DNA.....	32
2.2.11 DNA-Konzentrationsbestimmung mittels UV/VIS-Spektralphotometer	33
2.2.12 DNA-Sequenzierung.....	34
2.2.13 Glycerolstock für Bakterien.....	34
2.3 Zellbiologische Methoden	34
2.3.1 Zelllinie.....	34
2.3.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur.....	35
2.3.3 Beschichten von Zellkulturgefäßen	35
2.3.4 Zellkultivierung	35
2.3.5 Transiente Transfektion.....	36
2.4 Pharmakologische Charakterisierung von Bittergeschmacksrezeptoren, - rezeptormutanten und -rezeptorchimären.....	37
2.4.1 Grundlage der <i>Calcium-Imaging</i> -Analyse.....	37
2.4.2 <i>Calcium-Imaging</i> -Analyse.....	38
2.4.3 Auswertung von <i>Calcium-Imaging</i> -Experimenten.....	40
2.5 Immunzytochemische Charakterisierung	41
2.5.1 Immunzytochemische Färbung von transient transfizierten Zellen.....	41
2.5.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	42
2.5.3 Bestimmung der Expressionsrate anhand von immunzytochemischen Bildern	42
2.6 <i>In-silico</i>-3D-Modellierung von Bittergeschmacksrezeptoren.....	43
2.7 Statistische Auswertung der Daten	45
3. Ergebnisse	46
3.1 Kartierung der hTAS2R10-Bindungstasche.....	46
3.1.1 3D- <i>in-silico</i> -Modellierung des hTAS2R10 auf Basis des Rinderrhodopsins.....	46
3.1.2 Identifizierung der potentiellen Bindungstasche des hTAS2R10.....	47
3.1.3 Charakterisierung potentiell zur Bindungstasche gehörender Aminosäurepositionen nach Alanin-Mutagenese.....	50
3.1.4 Detaillierte Analyse der Position S85 ^{3,29} des hTAS2R10	57

3.1.5	Positionierung von Parthenolid in das hTAS2R10-3D-Modell.....	65
3.1.6	Detaillierte Analyse der Positionen K174 ^{5.39} , Q175 ^{5.40} und L178 ^{5.43}	66
3.1.7	<i>In-silico</i> -Agonisten- <i>Docking</i> in das hTAS2R10-Modell.....	74
3.1.8	Experimentelle Überprüfung des <i>In-silico</i> -Agonisten- <i>Dockings</i>	77
3.2	Vergleichende Betrachtung der Agonisteninteraktion zwischen hTAS2R10 und mTas2r105	82
3.2.1	Bittergeschmacksrezeptorchimären zwischen hTAS2R10 und mTas2r105	83
3.2.2	Vergleich von Positionen mit unterschiedlichen Aminosäuren zwischen hTAS2R10 und mTas2r105	87
3.2.3	Vergleich von Positionen mit gleichen Aminosäuren bei hTAS2R10 und mTas2r105	94
3.3	Gegenüberstellung der Strychnininteraktion von hTAS2R10 und hTAS2R46	99
3.3.1	Austausch von M263 ^{7.39} und T266 ^{7.43} im hTAS2R10 zu E ^{7.39} und A ^{7.42}	99
3.3.2	Vergleich der Position 5.43 zwischen hTAS2R10 und hTAS2R46	103
3.3.3	Vergleich der Position 3.39 zwischen hTAS2R10 und hTAS2R46	105
4.	Diskussion.....	109
4.1	3D-Homologiemodellierung bei Bittergeschmacksrezeptoren	109
4.2	Kartierung der hTAS2R10-Bindungstasche.....	110
4.3	Struktur-Funktions-Beziehungen des hTAS2R10.....	115
4.4	Vergleich der Struktur-Funktions-Beziehungen zu anderen Rezeptoren	124
4.5	Abschließende Betrachtung.....	133
5.	Zusammenfassung	136
Literaturverzeichnis		138
Abbildungsverzeichnis		146
Tabellenverzeichnis		148
Abkürzungsverzeichnis.....		149
Anhang		152
Publikationen		162

Danksagung..... 163
Erklärung 165

1. Einleitung

1.1 Geschmack und Geschmackswahrnehmung

Der Geschmack ist die Sinneswahrnehmung, welche Organismen dazu befähigt, sich für Nahrung zu entscheiden, die essbar, energiereich, verträglich und ungiftig ist (Chaudhari *et al.* 2010). Im Menschen leistet der Geschmackssinn auch einen Beitrag zum Genuss von Nahrung und so zum Wohlbefinden (Chandrashekar *et al.* 2006). Das Organ zum wahrnehmen des Geschmacks ist beim Menschen in erster Linie die Zunge (Abb. 1). Auf ihr befinden sich spezialisierte epitheliale Zellen, welche in abgegrenzten Bereichen, den sogenannten *Caliculi gustatorii* (Geschmacksknospen), organisiert sind (Gray *et al.* 1918).

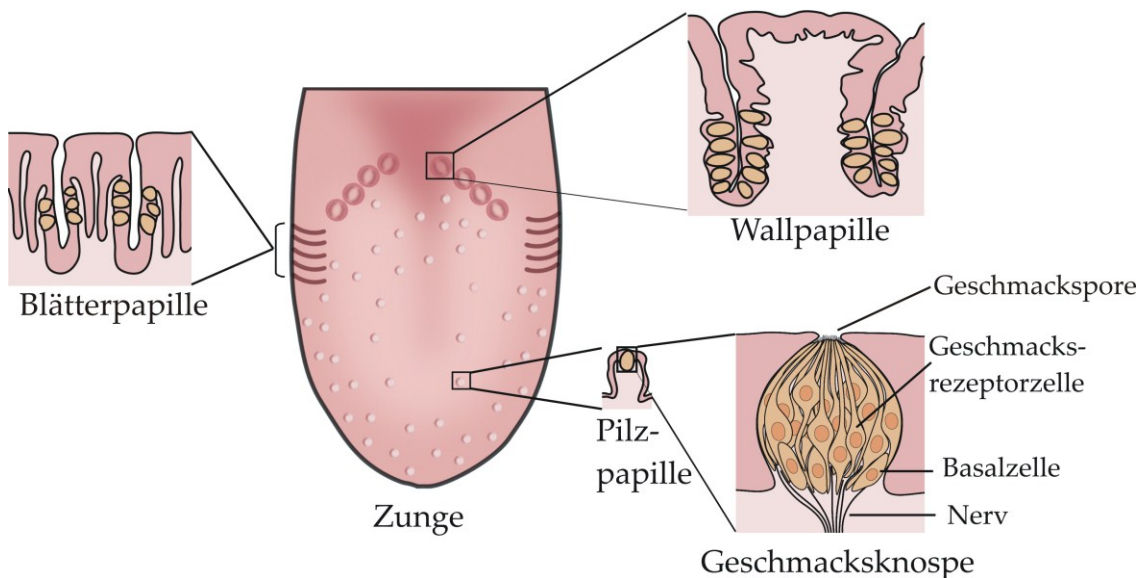


Abb. 1: Humane Zunge mit Papillen und Geschmacksknospe

Abb. zur Verfügung gestellt von F. Stähler und J. Töle (DifE).

Jede dieser Geschmacksknospen, bestehend aus 50-100 Zellen (Lindemann 1996; Chandrashekar *et al.* 2006), besitzt am apikalen Ende einen Geschmacksporus, der die Mikrovilli der Geschmackszellen trägt und so einen direkten Kontakt zur Mundhöhle und somit zu Geschmacksstoffen ermöglicht (entsprechend Abb. 1). Auf der Zunge sind die Geschmacksknospen in drei verschiedenen epithelialen Bereichen, den Papillen, organisiert. Diese werden, wie in Abb. 1 dargestellt, in Pilzpapillen (im vorderen Zungenbereich),

Blätterpapillen (beidseitig im hinteren Zungenbereich) und Wallpapillen (im hinteren Zungenbereich) unterteilt (Hoon *et al.* 1999; Jung *et al.* 2004). Die Zellen, aus denen die Geschmacksknospen bestehen, können physiologisch und morphologisch in vier Zelltypen unterschieden werden: Typ-I-Zellen oder auch Glia-ähnliche Zellen, Typ-II-Zellen oder auch Geschmacksrezeptorzellen, Typ-III-Zellen oder auch präsynaptische Zellen und Typ-IV-Zellen oder Basalzellen (Clapp *et al.* 2004; Behrens *et al.* 2010). Diese Zellen besitzen unterschiedliche Funktionen, die u.a. mit der Detektion der fünf für den Menschen beschriebenen Geschmacksqualitäten, bitter, süß, umami, sauer und salzig (Lindemann 1996), zusammen hängen. Für weitere Geschmacksqualitäten, wie z.B. den Fettgeschmack, gibt es zwar einige Hinweise, jedoch keine endgültigen Beweise (Fukuwatari *et al.* 2003; Chale-Rush *et al.* 2007; Mattes 2009; Cartoni *et al.* 2010; Galindo *et al.* 2011).

Die Typ-I-Zellen sind die am häufigsten vorkommenden Zellen in den Geschmacksknospen, deren genaue Funktion bisher noch nicht vollständig beschrieben wurde (Chaudhari *et al.* 2010). Es konnte gezeigt werden, dass Typ-I-Zellen GLAST (*glutamate-aspartate transporter*) exprimieren, welche an der Aufnahme von Glutamat in Typ-I-Zellen beteiligt sein könnten (Lawton *et al.* 2000). Zusätzlich konnte in Typ-I-Zellen die plasmamembranständige Nucleosid-triphosphate-diphosphohydrolase (NTPDase) 2 nachgewiesen werden, welche extrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP) hydrolysiert (Bartel *et al.* 2006). ATP gilt als Neurotransmitter (Finger *et al.* 2005) und Glutamat als potentieller Neurotransmitter bei der Geschmackswahrnehmung, was für eine Rolle der Typ-I-Zellen in der Signalvermittlung spricht (Chaudhari *et al.* 2010). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Typ-I-Zellen auch ROMK (Kaliumkanal des äußeren Nierenmarks (*Renal Outer Medullary Potassium (K) channel*)) exprimieren, bei dem es sich um einen Kalium-Kanal handelt. Das heißt, dass Typ-I-Zellen auch an der Aufrechterhaltung der Kalium-Homöostase beteiligt sein könnten (Dvoryanchikov *et al.* 2009). Es wird außerdem vermutet, dass Typ-I-Zellen einen Beitrag zur Detektion von Natrium-Ionen (Salzgeschmack) leisten (Vandenbeuch *et al.* 2008; Chandrashekar *et al.* 2010).

Typ-II-Zellen exprimieren die geschmacksspezifischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (*G protein-coupled receptor*, GPCR) und die nachgeschalteten Effektor-Proteine. Dies ermöglicht ihnen die Geschmacksqualitäten süß, umami und bitter zu erkennen (Adler *et al.* 2000; Perez *et al.* 2002; Zhao *et al.* 2003; Clapp *et al.* 2004; DeFazio *et al.* 2006). Sie exprimieren nur jeweils die Rezeptoren für eine dieser Geschmacksqualitäten. Das heißt, dass sie sind entweder auf bitter, süß oder umami eingestellt sind (Nelson *et al.* 2001; Mueller *et al.* 2005; Chandrashekar *et al.* 2006; Tomchik *et al.* 2007).

Typ-III-Zellen haben in erster Linie die Funktion der Signalweiterleitung (Chaudhari *et al.* 2010). Sie exprimieren Proteine, die in Synapsen zu finden sind. Typ-III-Zellen bilden den präsynaptischen Übergang zu den afferenten Nerven (Murray *et al.* 1969; Murray 1993; Yang *et al.* 2000; Yee *et al.* 2001). Diese Zellen exprimieren eine Vielzahl unterschiedlicher neuronaler Gene, wie NCAM (*neural cell adhesion molecule*) (Takeda *et al.* 1992; Nelson *et al.* 1993; Smith *et al.* 1993), das neuronale Zelladhäsionsmolekül. NCAM ist ein Glykoprotein, welches für die Ausbildung spannungsabhängiger Calciumkanälen (VDCC, *Voltage-dependent calcium channels*) benötigt wird (Rutishauser 1984). VDCC stehen im Zusammenhang mit neuronaler Neurotransmitterfreisetzung (Dolphin 1999). Die Typ-III-Zellen sind, wie auch die Typ-II-Zellen, erregbar und exprimieren Natrium- und Kaliumkanäle, welche das Ausbilden von Aktionspotentialen ermöglichen (Medler *et al.* 2003; Gao *et al.* 2009; Vandenbeuch *et al.* 2009). Sie haben somit eine Schlüsselrolle in der Signalweiterleitung (Tomchik *et al.* 2007). Diese Zellen reagieren auf Sauer-Stimuli, so dass vermutet wird, dass diese Geschmacksqualität durch Typ-III-Zellen vermittelt wird (Huang *et al.* 2006; Tomchik *et al.* 2007; Huang *et al.* 2008).

Typ-IV-Zellen sind in erster Linie undifferenzierte und unreife Zellen, die nicht am Geschmacksprozess beteiligt sind (Farbman 1965; Chaudhari *et al.* 2010).

1.2 Die Geschmacksqualitäten

Die bereits erwähnten Geschmacksqualitäten salzig, sauer, süß, umami und bitter erfüllen unterschiedliche Aufgaben in der menschlichen Ernährung. Die Geschmacksqualität salzig vermittelt die Aufnahme von Na^+ - und anderen Ionen. Der Salzgeschmack leistet somit einen Beitrag zur Aufrechterhaltung des Wasserhaushalts und der Blutzirkulation des Körpers (Lindemann 1996). Der Salzgeschmack wird u.a. durch Na^+ -Ionen vermittelt, die apikale Ionenkanäle passieren und so zur Depolarisierung der Geschmackssinneszelle führen (Chaudhari *et al.* 2010). Einer dieser Ionenkanäle ist der Amilorid-sensitive epitheliale Natriumkanal (ENaC, *epithelial sodium channel*) (Heck *et al.* 1984; Lin *et al.* 1999; Chandrashekar *et al.* 2010). Der genaue Expressionsort von ENaC kann keinem Zelltyp zugeordnet werden. Studien zeigen jedoch, dass Typ-I-Zellen die Na^+ -Ionen sensitiven Zellen sind (Vandenbeuch *et al.* 2008; Chandrashekar *et al.* 2010). Es wird angenommen, dass noch

weitere Membranrezeptoren oder Ionenkanäle am Salzgeschmack beteiligt sind (Chaudhari *et al.* 2010).

Mittels der Geschmacksqualität sauer, werden in der Nahrung enthaltene Säuren detektiert. Sauer ist in erster Linie ein aversiver Geschmack und stellt sicher, dass der Säure-Base-Haushalt des Körpers nicht gestört wird (Chaudhari *et al.* 2010). Der Sauergeschmack schützt vor der Aufnahme von unreifen und verdorbenen Speisen (Behrens *et al.* 2010). Wie oben beschrieben, wird ein Sauer-Stimulus durch Typ-III-Zellen vermittelt (Tomchik *et al.* 2007). Als Kandidaten für die Vermittlung des Sauergeschmacks gelten die TRP-Kanäle (TRP = *transient receptor potential*) PKD2L1 (*Polycystic kidney disease 2-like 1 protein*) und PKD1L3 (*Polycystic kidney disease 1-like 3 protein*) (Nelson *et al.* 2001; Huang *et al.* 2006; Ishimaru *et al.* 2006; LopezJimenez *et al.* 2006; Chang *et al.* 2010). Es gibt jedoch auch Studien, die besagen, dass zumindest PKD1L3 wahrscheinlich nicht direkt an der Sauer-Geschmack-Detektion beteiligt ist (Chang *et al.* 2010; Nelson *et al.* 2010; Horio *et al.* 2011) und dass andere Kandidaten wie der HCN-Kanal (*hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channel*), ASIC-Kanäle (*acid-sensing ion channels*) oder auch verschiedene Kalium-Kanäle den Sauergeschmack vermitteln (Stevens *et al.* 2001; Lin *et al.* 2004; Richter *et al.* 2004; Dotson 2010).

Die Geschmacksqualitäten süß und umami weisen auf energiereiche Komponenten in der Nahrung hin, wie beispielsweise Kohlenhydrate und Aminosäuren (Behrens *et al.* 2010; Chaudhari *et al.* 2010). Sie werden über die Gruppe der TAS1-Geschmacksrezeptoren detektiert, dem TAS1R1, TAS1R2 und TAS1R3 (Max *et al.* 2001; Montmayeur *et al.* 2001; Nelson *et al.* 2001; Sainz *et al.* 2001; Nelson *et al.* 2002). Die TAS1R gehören zur Klasse C der Superfamilie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Sie besitzen eine große N-terminale Liganden-Bindungs-Domäne. Diese enthält ein Venusfliegenfallen-Bindungsmotiv, ähnlich dem des metabotropen Glutamatrezeptors, des GABA_B-Rezeptors und des *Calcium-sensing Receptor* (CaSR) (Kinnamon 2011). Die TAS1R sind als Heterodimere funktionell. Der Umamigeschmack wird über ein Heterodimer, bestehend aus den Untereinheiten TAS1R1 und TAS1R3 vermittelt. Das humane Umamigeschmacksrezeptordimer detektiert in erster Linie L-Glutamat (Li *et al.* 2002; Kinnamon 2011). Der Süßgeschmack wird über das Rezeptordimer TAS1R2 und TAS1R3 vermittelt. Das Dimer wird u.a. durch Kohlenhydrate wie Saccharose und Fructose, D-Aminosäuren, synthetischen Süßstoffen wie Saccharin und Acesulfam-K, sowie von Süßproteinen wie Brazzein und Thaumatin aktiviert (Smith *et al.* 1996; Nelson *et al.* 2001; Kitagawa 2002). Sowohl für den Umamigeschmack als auch für den

Süßgeschmack, werden weitere Kandidaten diskutiert (Damak *et al.* 2003; Delay *et al.* 2006; Maruyama *et al.* 2006; Yoshida *et al.* 2009).

Für den Bittergeschmack nimmt man an, dass er in erster Linie eine Warnfunktion vor giftigen Komponenten im Essen hat (Lindemann 1996; Behrens *et al.* 2010), auch wenn der klare Zusammenhang zwischen Bittergeschmack und Giften bisher nicht bestätigt werden konnte (Glendinning 1994). Es ist jedoch auch bekannt, dass eine gewisse Bitterkeit von Lebensmitteln (z.B. Bier, Bitterschokolade, Absinth, Kaffee) von Menschen als angenehm empfunden wird (Drewnowski 2001). Die Wahrnehmung der Bittersubstanzen erfolgt über die Gruppe der Bittergeschmacksrezeptoren (TAS2R), die Produkte der *Tas2R*-Genfamilie sind (Adler *et al.* 2000; Chandrashekar *et al.* 2000; Matsunami *et al.* 2000). Dieser Familie gehören in der Klasse der Säugetiere ca. 30 Mitglieder an, wobei sich die Anzahl der Gene zwischen den einzelnen Unterklassen unterscheiden kann. So besitzen Mäuse ~33, Hunde ~15 und der Mensch ~25 intakte *Tas2R*-Gene (Dong *et al.* 2009). Die *Tas2R*-Gene sind in vier chromosomalen Loci kodiert (Adler *et al.* 2000; Bufo *et al.* 2002; Meyerhof 2005). Das *Tas2R1*-Gen liegt allein auf dem kurzen Arm des Chromosoms 5. Zwei Loci liegen auf Chromosom 7, wovon eins das *Tas2R16*-Gen und das andere den Gen-Cluster für *Tas2R3*, -4, -5, -38, -39, -40, -41 und -60 enthält. Die anderen 15 Gene liegen als Cluster auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12 (Meyerhof *et al.* 2011). Die TAS2R gehören, wie die TAS1R, zu den heptahelikalen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, auf die im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird.

1.3 Die Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

1.3.1 Klassifizierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören zur größten Proteinfamilie des Säugetiergenoms (Lander *et al.* 2001; Venter *et al.* 2001). Sie zeigen als Superfamilie nur eine geringe Sequenzhomologie und besitzen strukturell sehr unterschiedliche Agonisten. Allen gemein ist ihre Architektur, bestehend aus den sieben Transmembrandomänen (TM), verbunden durch drei intrazelluläre (IL) und drei extrazelluläre Schleifen (EL) (Rompler *et al.* 2007). Für die Nomenklatur der GPCR gibt es unterschiedliche Systeme. Zum einen das System der A-F Klassifikation in dem alle GPCR (Vertebraten und Invertebraten) entsprechend ihrer Sequenz- und Funktionshomologie enthalten sind (Attwood *et al.* 1994; Kolakowski 1994). Demnach ist Klasse A: rhodopsinähnliche Rezeptoren, Klasse B: Sekretin-Rezeptorfamilie, Klasse C: metabotrope Glutamat-/Pheromon-Rezeptoren, Klasse D: Rezeptoren für pheromonähnliche Substanzen aus Pilzen, Klasse E: Cyclo-AMP-Rezeptoren, Klasse F: *frizzled/smoothend*-Rezeptoren (Attwood *et al.* 1994; Kolakowski 1994; Foord *et al.* 2005). Die besonders große Gruppe der rhodopsinähnlichen Rezeptoren wird in 19 weitere Untergruppen (A1-A19) unterteilt (Joost *et al.* 2002). Ein neues System ist das von Fredriksson vorgeschlagene GRAFS-System (*glutamate-rhodopsin-adhesion-frizzled/taste2-secretin*, (Fredriksson *et al.* 2003)). Bei diesem System werden die GPCR des Säugetiergenoms mit einem ähnlichen evolutionären Ursprung gruppiert. Die fünf Gruppen sind die Glutamat-Rezeptoren, Rhodopsin(ähnlichen)-Rezeptoren, „Adhesion“-Rezeptoren, *Frizzled*-/Bittergeschmacksrezeptoren und Sekretin-Rezeptoren. Die Gruppe der Rhodopsin-Rezeptoren wurde weiter in vier Hauptgruppen mit je 13 Untergruppen unterteilt (Fredriksson *et al.* 2003). Für die Klassifizierung der TAS2R innerhalb der GPCR-Superfamilie werden in der Literatur unterschiedliche Möglichkeiten angegeben. So gibt es die Klassifikation der TAS2R als mögliche eigenständige Gruppe (Bachmanov *et al.* 2007). Des Weiteren werden sie auch zu der Klasse der rhodopsinähnlichen GPCR Klasse A (nach der A-F Klassifikation) gezählt (Adler *et al.* 2000; Bachmanov *et al.* 2007). Nach der GRAFS-Klassifizierung (Fredriksson *et al.* 2003), s.o.) bilden die TAS2R einen Cluster mit den *Frizzled*-Rezeptoren.

1.3.2 Das erweiterte ternäre Komplex-Modell der GPCR-Aktivierung

Nach dem ternären Komplex-Modell zur GPCR-Aktivierung durch Ligandenbindung existieren GPCR in einem Equilibrium von zwei Zuständen, dem inaktiven (R) und dem aktiven Zustand (R*) (Samama *et al.* 1993). Die Effizienz eines Liganden richtet sich nach der Fähigkeit das Gleichgewicht zwischen R und R* zu ändern. Ein voller Agonist stabilisiert demnach die R*-Konformation und verschiebt das Gleichgewicht in Richtung des aktivierten Zustands. Ein neutraler Antagonist bindet gleichermaßen an dem Rezeptor im R- und R*-Zustand. Der Effekt wird darüber vermittelt, dass die Bindung anderer Liganden verhindert wird. Ein inverser Agonist bindet bevorzugt am Rezeptor im R-Zustand und verschiebt das Gleichgewicht in Richtung des inaktiven Zustands (Luttrell 2008). Dieses einfache Modell kann aber nicht alle Interaktionen zwischen GPCR und Agonisten erklären, so dass ein erweitertes Modelle der Interaktionen propagiert wird (De Lean *et al.* 1980; Samama *et al.* 1993). Kristallstrukturen bestätigen die Vermutung, dass es nicht nur einen aktiven und einen inaktiven Zustand gibt, sondern auch mehrere Zustände dazwischen (Kolb *et al.* 2011). So besitzen GPCR, wie der β 2-adrenerge Rezeptor (β 2ADR), oft eine Basalaktivität, also eine agonistenunabhängige biologische Aktivität (konstitutive Aktivität). Diese Aktivität kann durch inverse Agonisten inhibiert werden (Chidiac *et al.* 1994; Samama *et al.* 1994). Neutrale Agonisten haben keinen Einfluss auf die biologische Antwort. Volle und partielle Agonisten führen zu einer biologischen Antwort (entsprechend Abb. 2). Die Effizienz eines Agonisten muss dabei jedoch nicht direkt mit der Affinität des Agonisten zum Rezeptor korrelieren. So kann ein partieller Agonist eine höhere Rezeptoraffinität besitzen als ein voller Agonist (Rosenbaum *et al.* 2009). Partielle und volle Agonisten besitzen eine gewisse Anzahl von funktionellen Gruppen, welche die unterschiedlichen Konformationen des Rezeptors während der Aktivierung stabilisieren (Ghanouni *et al.* 2001; Swaminath *et al.* 2004; Swaminath *et al.* 2005). Eine solche Aktivierung geht mit einer Konformationsänderung einher, die eine Bewegung der TM 6 von TM 5 weg, umfasst. Die bisher größte Bewegung während der Aktivierung wurde beim β 2ADR beobachtet und betrug 14 Å (Rasmussen *et al.* 2011). Diese Bewegung wird als notwendig für die Aktivierung angesehen, da sie die Bindungsstelle des G-Proteins öffnet (Kolb *et al.* 2011).

Der Prozess der Desensibilisierung des Rezeptors, im Anschluss an die Aktivierung, umfasst viele unterschiedliche Pfade. Zu ihnen gehören die Rezeptorphosphorylierung, Arrestin vermittelte Rezeptorinternalisierung in Endosomen, Rezeptorrecycling und lysosomale Degradation (Freedman *et al.* 1996; Hanyaloglu *et al.* 2008).

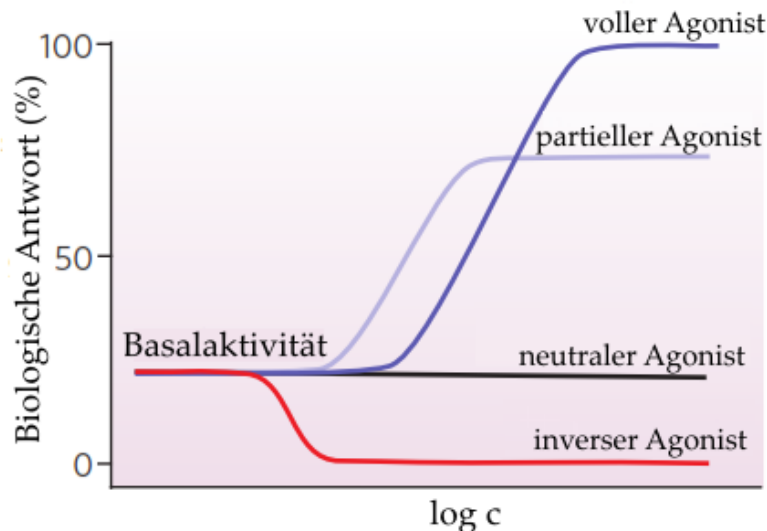


Abb. 2: Klassifizierung der unterschiedlichen GPCR-Zustände

GPCR besitzen teilweise eine basale Aktivität. Inverse Agonisten unterdrücken diese Aktivität und neutrale Agonisten haben keinen Einfluss auf die Basalaktivität. Volle Agonisten und partielle Agonisten führen zu einer biologischen Antwort. Abb. modifiziert nach Rosenbaum *et al.* 2009.

1.3.3 G-Protein-Isoformen und G-Protein-Effektormoleküle

Das heterotrimere G-Protein kann in die GTP-tragende G_α -Untereinheit und in die dimere $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit unterteilt werden. Die G_α -Untereinheiten werden nach ihrer Sequenzhomologie in vier Familien unterteilt. Der $G_{\alpha s}$ -Familie gehören die Adenylylcyclase-stimulierende $G_{\alpha s}$ -Untereinheit und die olfaktorische $G_{\alpha olf}$ -Untereinheit an (Luttrell 2008). Zu der $G_{\alpha i}$ -Familie zählen die Adenylylcyclase-inhibierende $G_{\alpha i}$ -Untereinheiten $G_{\alpha 1}$, $G_{\alpha 2}$, $G_{\alpha 3}$, und $G_{\alpha 0}$, zwei Isoformen der retinalen α -Untereinheit Transducin $G_{\alpha t}$, die geschmackssystemspezifische- α -Untereinheit Gustducin $G_{\alpha gust}$ und die $G_{\alpha z}$ -Untereinheit, über die nicht viel bekannt ist (Luttrell 2008). Die $G_{\alpha q}$ -Familie besteht aus den Phospholipase-C- (PLC)-regulierenden Untereinheiten $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 11}$, $G_{\alpha 14}$, $G_{\alpha 15}$, und $G_{\alpha 16}$, sowie aus den wenig erforschten $G_{\alpha 12}$ - und $G_{\alpha 13}$ -Untereinheiten, die wahrscheinlich mit Rho-GEF (*Guanine nucleotide exchange factor*) interagieren, welche das Zusammenfügen des Zytoskeletts regulieren (Kurose 2003; Luttrell 2008). Bei den $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten sind fünf G_β -Untereinheiten und zwölf G_γ -Untereinheiten bekannt. Spezifische Kombinationen dieser G-Protein-Untereinheiten können selbst auch Effektormoleküle regulieren (Ford *et al.* 1998;

Luttrell 2008). Ein G-Protein-reguliertes Effektormolekül ist die Adenylylcyclase. Diese katalysiert die Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus ATP. cAMP reguliert die Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA), sowie unterschiedliche GTP-Austauschfaktoren (Sunahara *et al.* 1996). Weitere Effektormoleküle für G-Proteine sind die Phospholipase-C-(PLC)- β -Isoformen (Morris *et al.* 1997). Diese katalysieren die Hydrolyse des membranständigen Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG). IP₃ als *second messenger* kontrolliert den Calcium(Ca²⁺)-Efflux aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER). DAG, zusammen mit Ca²⁺, kontrolliert unterschiedliche Proteinkinase-C-(PKC)-Isoformen. PLC β -1-3-Isoformen können sowohl von G α -Untereinheiten der G α_q -Familie, als auch von G $\beta\gamma$ -Untereinheiten aktiviert werden (Morris *et al.* 1997; Luttrell 2008). Effektormoleküle können auch direkt durch G-Proteine reguliert werden, wie die spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanäle vom N- und L-Typ. Dabei werden die N-Typ-Kanäle durch G α_0 inhibiert und L-Typ-Kanäle durch G α_s stimuliert (Wickman *et al.* 1995; Albert *et al.* 2002). G $\beta\gamma$ -Untereinheiten können u.a. Ionen-Kanäle wie den Kalium-Kanal IKaCh (*Inwardly rectifying potassium channel*) oder die G-Protein-Rezeptor-Kinase (GRK) direkt regulieren (Wickman *et al.* 1995; Stoffel *et al.* 1997). Die GPCR im Allgemeinen, funktionieren nach dem Basis GPCR-G-Protein-Effektor-Modell der GPCR-Signalkaskade (Luttrell 2008). Sie wird im nächsten Abschnitt am Beispiel der Signaltransduktion der Bittergeschmacksrezeptoren erklärt.

1.4 Die Bittergeschmacksrezeptoren, eine Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

1.4.1 Signaltransduktion von GPCR am Beispiel der Bittergeschmacksrezeptoren in Typ-II-Zellen

Die Signaltransduktion von Bittergeschmacksrezeptoren in Typ-II-Zellen startet mit der Aktivierung des Rezeptors durch einen Bitterstoff. Das führt zur Aktivierung des heterotrimeren G-Protein-Komplexes und somit zur dessen Dissoziation in die G α - und die heterodimere G $\beta\gamma$ -Untereinheit. Das heterotrimere geschmacksspezifische G-Protein besteht aus der geschmacksspezifischen α -Untereinheit Gustducin (G α_{gust}) (McLaughlin *et al.* 1992)

und der G_γ -Untereinheit 13, sowie der G_β -Untereinheit 1 oder 3 (Huang *et al.* 1999). Das heterodimere $G_{\beta\gamma}$ aktiviert, nach Dissoziation vom GTP- $G_{\alpha\text{gust}}$ -Komplex, die PLC β 2. Diese katalysiert die Hydrolyse des membranständigen Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphats (PIP $_2$) zu Inositoltrisphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerin (DAG), was den Zytoplasmaspiegel an IP $_3$ ansteigen lässt (Rossler *et al.* 1998). IP $_3$ führt, über Bindung an den IP $_3$ -Rezeptor (IP $_3$ R) am ER, zur Freisetzung von Ca $^{2+}$ ins Zytoplasma (Simon *et al.* 2006; Roper 2007). Ca $^{2+}$ als *second messenger* hat zwei mögliche Ziele in Typ-II-Zellen: Zum einen den geschmacksspezifischen Kationen-Kanal TRPM5 (*Transient receptor potential cation channel subfamily M member 5*) und zum anderen *gap junctions hemichannels* wie Panx1. Beide werden in Typ-II-Zellen exprimiert (Perez *et al.* 2002; Huang *et al.* 2007). Die TRPM5-Aktivierung führt zur Generierung eines Rezeptorpotentials in Typ-II-Zellen (Liu *et al.* 2003). Der erhöhte Ca $^{2+}$ -Spiegel und die Depolarisierung führen zur Neurotransmitterfreisetzung, wie z.B. ATP, über die *hemichannels* in dem extrazellulären Raum. Die Information wird dann über die Erregungsweiterleitung des afferenten gustatorischen Nervs zum Gehirn weitergeleitet (Huang *et al.* 2007; Romanov *et al.* 2007; Huang *et al.* 2010; Meyerhof *et al.* 2011). Eine schematische Übersicht des Signalweges ist in Abb. 3 gezeigt. Die genaue Rolle von $G_{\alpha\text{-Gustducin}}$ ist bisher noch nicht vollständig entschlüsselt. Es konnte gezeigt werden, dass *in vitro* α -Gustducin die Phosphodiesterase (PDE) aktivieren kann, was zum Absenken des Cyclo-Nucleotid-Spiegels führt (Ruiz-Avila *et al.* 1995; Moriyama *et al.* 2002). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass der Basis-Spiegel an cAMP in α -Gustducin-*Knockout*-Mäusen erhöht und die cAMP-abhängige PKA aktiviert wird (Clapp *et al.* 2008). Das führt zu einer chronischen Inhibition der Ca $^{2+}$ -Antwort auf Bitter-Stimulation und lässt den Schluss zu, dass $G_{\alpha\text{-Gustducin}}$ die Geschmackszellen in einem sensitiven Zustand hält, um möglichst effektiv auf einen Stimulus reagieren zu können (Clapp *et al.* 2008; Meyerhof *et al.* 2011).

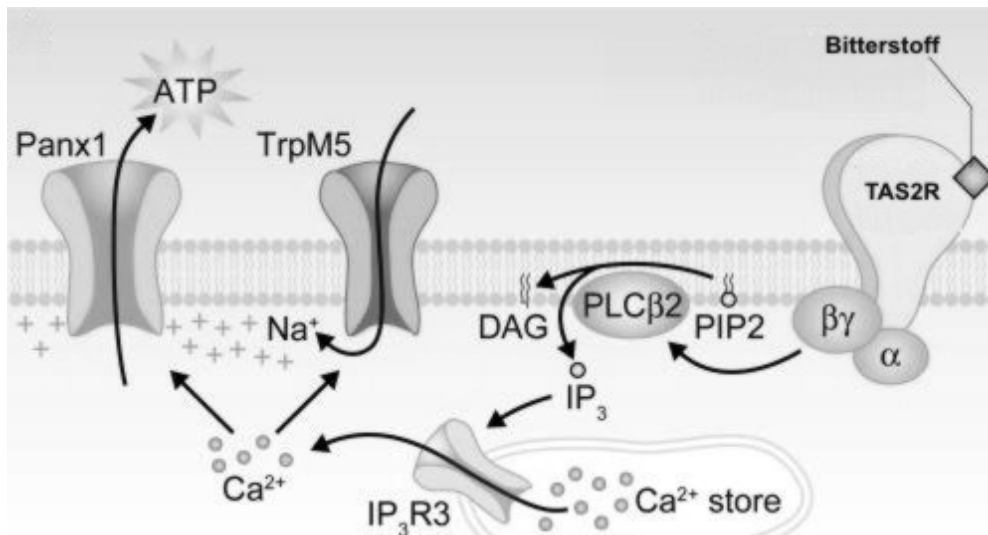


Abb. 3: Signaltransduktion von Bittergeschmacksrezeptoren in Typ-II-Zellen

Die Bitter-Agonisten binden an die Bittergeschmacksrezeptoren und aktivieren in Typ-II-Zellen einen Phosphoinositid-Signalweg. Dies führt zu einem Anstieg des zyttoplasmatischen Ca^{2+} und einer Membrandepolarisierung. Dadurch öffnen sich *gap junction hemichannels* wie Panx1, was zu einer ATP-Freisetzung führt. Abb. modifiziert nach Chaudhari *et al.* 2010.

1.4.2 Expression von Bittergeschmacksrezeptoren

Bittergeschmacksrezeptoren werden in menschlichen Geschmacksknospen in teilweise überlappenden Gruppen von vier bis elf Rezeptoren in den Bitterstimulus-sensitiven Zellen exprimiert (Behrens *et al.* 2007). Sie lassen sich jedoch nicht nur auf der Zunge nachweisen. So wurden die Bittergeschmacksrezeptoren und die zugehörigen Signaltransduktionskomponenten wie α -Gustducin, PLC β 2 und TRPM 5 in chemosensorischen Zellen (SCC, *solitary chemosensory cells*) der Nasenschleimhaut von Mäusen detektiert (Finger *et al.* 2003; Gulbransen *et al.* 2008; Lin *et al.* 2008; Tizzano *et al.* 2010; Tizzano *et al.* 2011). Auch in tieferliegenden Bereichen des respiratorischen Traktes konnten Bittergeschmacksrezeptoren nachgewiesen werden. In kultivierten humanen zilien-tragenden Zellen wurden sowohl Bittergeschmacksrezeptoren, als auch Signaltransduktionskomponenten wie PLC β 2 gefunden (Shah *et al.* 2009). Daneben wurden funktionelle TAS2Rs zusammen mit α -Gustducin auch in kultivierten humanen glatten Muskelzellen der Luftröhre nachgewiesen (Deshpande *et al.* 2010). Es wird angenommen, dass die Bittergeschmacksrezeptoren im respiratorischen Trakt zum einen eine Schutzfunktion besitzen und bei Exposition mit potentiell schädlichen Substanzen Niesen und Husten verursachen (im Bereich der SSCs, (Tizzano *et al.* 2010)). Zum anderen bewirken die

Bitterrezeptoren im tieferliegenden Bereich eine erhöhte Zilienbewegung und Entspannung der Muskulatur, welches die Ausscheidung potentiell schädlicher Stoffe verbessern könnte (tiefliegende Bereiche der Atemwege, (Kinnamon 2011)).

Ein weiterer Ort an dem Bittergeschmacksrezeptoren und die nachgeschalteten Signalwegskomponenten außerhalb der Zunge nachgewiesen wurden, ist der Gastrointestinaltrakt. So konnte α -Gustducin im Magen, im Duodenum (Hofer *et al.* 1996) und im Pankreas (Hofer *et al.* 1998) von Ratten nachgewiesen werden. PLC β 2, α -Gustducin und TRPM5 konnten bei Mäusen im Magen, Dünndarm und im Kolon nachgewiesen werden (Bezencon *et al.* 2007). In unterschiedlichen Studien konnte TAS2R-mRNA mittels RT-PCR in gastrointestinalem Gewebe von Menschen und Nagetieren, sowie in enteroendokrinen Zelllinien nachgewiesen werden (Wu *et al.* 2002; Wu *et al.* 2005; Chen *et al.* 2006; Rozengurt *et al.* 2006; Dotson *et al.* 2008). Eine Funktion, die Bittergeschmacksrezeptoren im Gastrointestinaltrakt haben könnten, ist eine Verzögerung der Magenentleerung (Glendinning *et al.* 2008). Dies konnte bei Experimenten mit Nagetieren gezeigt werden (Glendinning *et al.* 2008). Ob dies auch beim Menschen der Fall ist, ist unklar (Behrens *et al.* 2010).

Die Expression von Bittergeschmacksrezeptoren im heterologen Expressionssystem basierend auf Säugetierzelllinien gestaltet sich schwierig, da vermutet wird, dass die Rezeptoren nur unzureichend funktionell an die Zellmembran gelangen (Chandrashekar *et al.* 2000). Das Problem wurde dadurch gelöst, das Fusionsproteine aus den Bittergeschmacksrezeptoren konstruiert wurden, denen der N-terminale Bereich anderer GPCR wie Rhodopsin oder Somatostatin-Rezeptoren, vorangestellt wurde (Chandrashekar *et al.* 2000; Bufe *et al.* 2002). Durch Untersuchungen im heterologen Expressionssystem konnte gezeigt werden, dass Bittergeschmacksrezeptoren nicht wie andere GPCRs ihre Glykosylierungsmotive im N-terminalen Bereich, sondern in der zweiten extrazellulären Schleife tragen. Dieses konservierte NxS/T-Motiv ermöglicht, nach Glykosylierung, Wechselwirkungen mit endoplasmatischen Chaperonen, welche für die Rezeptorfaltung und den Transport an die Zellmembran notwendig sind (Reichling *et al.* 2008). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass einige der Bittergeschmacksrezeptoren weitere Hilfsproteine wie z.B. die Rezeptor-Transport-Proteine (RTP) 3 und 4, oder auch Mitglieder der „*receptor expression enhancer protein*“ (REEP)-Familie für einen effizienten Transport an die Zelloberfläche benötigen (Behrens *et al.* 2006). Es ist außerdem bekannt, dass diese Hilfsproteine *in vivo* für die funktionelle Expression von Geruchsrezeptoren benötigt werden (Saito *et al.* 2004) und zwei Mitglieder dieser Hilfsproteine zusammen mit Geschmacksrezeptoren exprimiert werden (Behrens *et al.* 2006). Diese Interaktion zwischen den Bittergeschmacksrezeptoren und den

Hilfsproteinen scheint also die Rezeptorfaltung und/oder den vesikulären Transport der Rezeptoren von intrazellulären Kompartimenten zur Zellmembran zu verbessern (Saito *et al.* 2004; Behrens *et al.* 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass GPCR als Homodimere, Heterodimere oder auch Multimere existieren können (Devi 2001; Milligan 2001; Angers *et al.* 2002). Ein Beispiel aus dem Bereich der Geschmackswahrnehmung sind die in Abschnitt 1.2 bereits beschriebenen heterodimeren Rezeptoren für die Süß- (TAS1R2 + TAS1R3) und die Umamiwahrnehmung (TAS1R1 + TAS1R3). Die Oligomerisierung von menschlichen Bittergeschmacksrezeptoren *in vitro* konnte ebenfalls beobachtet werden (Kuhn *et al.* 2010). Die humanen TAS2R können sowohl Homomere als auch Heteromere bilden. Es konnte jedoch keinerlei Einfluss auf die Rezeptor-Pharmakologie oder auf die Rezeptor-Expression beobachtet werden. Die Funktion der Oligomerisierung konnte bisher nicht ergründet werden (Kuhn *et al.* 2010).

1.4.3 Bitterstoffe und Bittergeschmacksrezeptoren

Von den 25 bekannten humanen Bittergeschmacksrezeptoren konnten mittlerweile 20 deorphanisiert werden (entsprechend Abb. 4 (Meyerhof *et al.* 2010)). Im Vergleich dazu wurden von den ca. 33 bekannten Bittergeschmacksrezeptoren der Maus bisher nur der mTas2r105 mit Cycloheximid und der mTas2r108 mit Denatonium deorphanisiert (Chandrashekar *et al.* 2000). Von den Bitterrezeptoren der Ratte (ca. 36) ist lediglich ein Rezeptor (rTas2r105, Cycloheximid (Bufe *et al.* 2002)) deorphanisiert, auch von den ca. 28 Rezeptoren der Schimpansen (Sugawara *et al.* 2011) ist bisher lediglich ein Rezeptor deorphanisiert worden (chTAS2R38, Phenylthiocarbamid, (Wooding *et al.* 2006)).

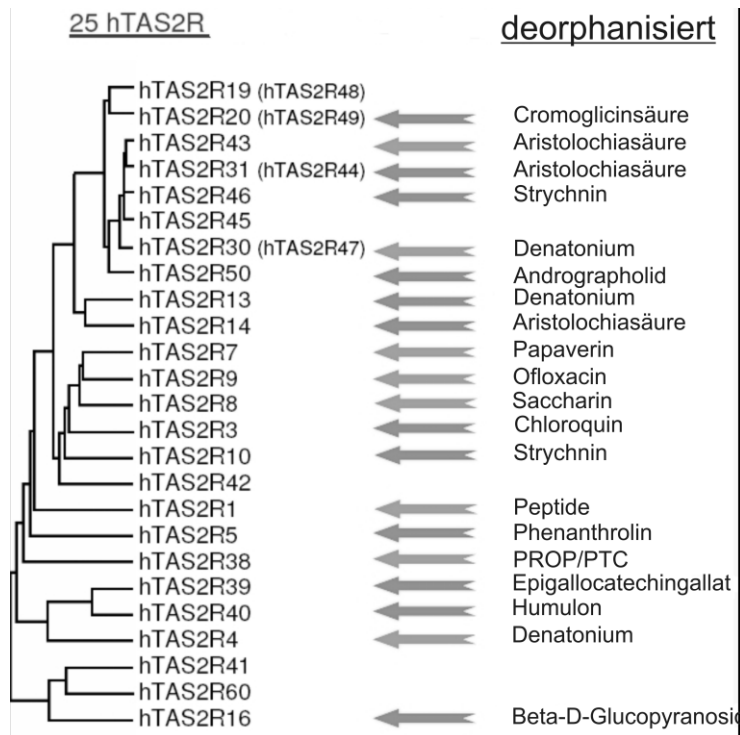


Abb. 4: Dendrogramm der humanen Bittergeschmacksrezeptoren mit ihren Schlüssel-Agonisten

In dem Dendrogramm ist die Verwandtschaft der 25 bekannten humanen Bittergeschmacksrezeptoren dargestellt. 20 von ihnen konnten deorphanisiert werden. Diese Agonisten sind in der rechten Spalte aufgelistet. Für einige Rezeptoren gibt es eine neue Nomenklatur, die alte Rezeptorbezeichnung steht bei diesen Rezeptoren in Klammern. Die Abb. wurde von M. Behrens (DIfE) zur Verfügung gestellt und wurde modifiziert.

Die Fokussierung der Forschung auf die humanen Bittergeschmacksrezeptoren hängt damit zusammen, dass der bittere Geschmack von potentiell gesundheitsfördernden Substanzen, oralen Pharmazeutika, sowie pharmazeutischen Füllstoffen ein bedeutendes Problem der Nahrungsmittel- und Arzneimittelindustrie darstellt. Besonders in der Pädiatrie mögen die Patienten keine bitter schmeckenden Medikamente. Dieses führt zu einer verschlechterten Komplianz. Um den Bittergeschmack solcher Produkte zu senken oder zu eliminieren, muss die Fähigkeit der Substanzen mit den Geschmacksrezeptoren zu interagieren herabgesetzt bzw. unterbunden (Hejaz *et al.* 2011) oder der Bittergeschmack durch den Zusatz von Bittergeschmacksrezeptor-Antagonisten inhibiert werden (Slack *et al.* 2010). Es ist daher notwendig die Interaktionen zwischen Bittergeschmacksrezeptoren und deren Agonisten zu kennen und zu verstehen.

Die Agonisten für Bittergeschmacksrezeptoren, die Bitterstoffe, gehören vielen unterschiedlichen Stoffklassen an. Zu ihnen gehören natürliche Substanzen wie Alkaloide (z.B. Strychnin oder Coffein), Terpenlactone (z.B. Absinthin oder Parthenolid), Peptide (Leucin-Valin-Leucin) oder auch Metallionen (Mg^{2+}), sowie synthetische Substanzen wie Ammoniumverbindungen (z.B. Denatonium), Thioharnstoff-Derivate (Phenylthiocarbamid (PTC) und Propylthiouracil (PROP)), Thiocyanate ($NaSCN$) oder auch künstliche Süßstoffe (Cyclamat und Saccharin) (Meyerhof *et al.* 2010; Meyerhof *et al.* 2011). Die Detektion dieser strukturell sehr unterschiedlichen Bittergeschmacksstoffe erfolgt mittels der vergleichsweise kleinen Anzahl von 25 Bittergeschmacksrezeptoren. Es gibt eine kleine Gruppe an

Rezeptoren, bestehend aus dem hTAS2R10 (Bufe *et al.* 2002), hTAS2R14 (Behrens *et al.* 2004) und hTAS2R46 (Brockhoff *et al.* 2007), mit einem weitgefächerten Agonistenspektrum (Behrens *et al.* 2010). Sie reagieren auf 51 % der 104 publizierten natürlichen und synthetischen Bittersubstanzen (entsprechend Abb. 5 rechts (Meyerhof *et al.* 2010)). Eine zweite Gruppe besitzt ein relativ enges Agonistenspektrum. Zu diesen Rezeptoren gehören der hTAS2R3 (Meyerhof *et al.* 2010), -R5 (Meyerhof *et al.* 2010), -R8 (Pronin *et al.* 2007), -R13 (Pronin *et al.* 2007), -R20 (ehemals 49) (Meyerhof *et al.* 2010), und -R50 (Behrens *et al.* 2009) (entsprechend Abb. 5 links). All diese Rezeptoren werden nur von 7 % der 104 Substanzen aktiviert (Meyerhof *et al.* 2010). Der Großteil der hTAS2R wird von 6-20 % der 104 Bittersubstanzen (Meyerhof *et al.* 2010) aktiviert. Dieser Gruppe gehören die Bittergeschmacksrezeptoren hTAS2R1 (Maehashi *et al.* 2008), -R4 (Chandrashekar *et al.* 2000), -R7 (Sainz *et al.* 2007), -R9 (Dotson *et al.* 2008), -R16 (Bufe *et al.* 2002), -R38 (Kim *et al.* 2003; Bufo *et al.* 2005), -R39 (Meyerhof *et al.* 2010), -R40 (Intelmann *et al.* 2009), -R43 (Kuhn *et al.* 2004; Pronin *et al.* 2004), -R31 (ehemals 44) (Kuhn *et al.* 2004) und -R30 (ehemals 47) (Pronin *et al.* 2004) an.

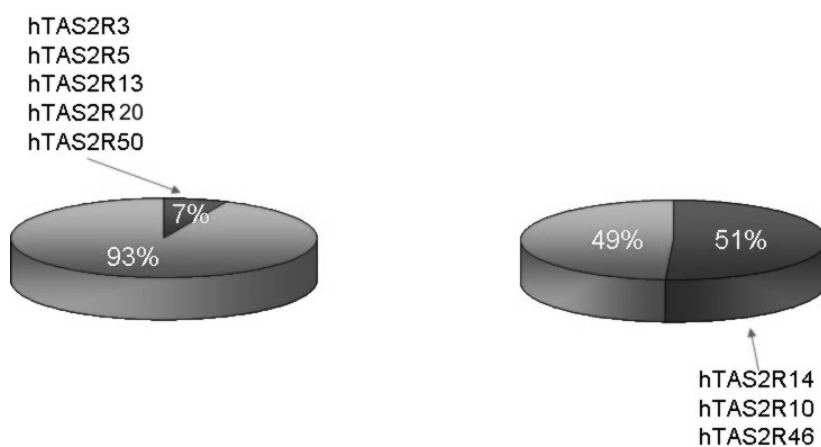


Abb. 5: eng- und weitgefächerte Bittergeschmacksrezeptoren

Gegenübergestellt sind die Gruppen der Rezeptoren mit einem enggefächerten Agonistenspektrum (hTAS2R3, -5, 13, -20 und -50) und die Gruppe der Rezeptoren mit einem weitgefächertem Agonistenspektrum (hTAS2R10, hTAS2R14 und hTAS2R46). Abb. zur Verfügung gestellt von M. Behrens (DIfE), modifiziert.

1.4.4 Struktur-Funktions-Beziehung von Bittergeschmacksrezeptoren

Die Frage nach den unterschiedlich weit gefächerten Agonistenspektren der Bittergeschmacksrezeptoren kann nur durch Kenntnisse der Interaktion der Bittersubstanzen mit den Bittergeschmacksstoffen beantwortet werden. Erste Einblicke in die Interaktion zwischen Agonisten und Rezeptoren erbrachten Studien zwischen den Rezeptoren hTAS2R43, -R30 und -R31 (Pronin *et al.* 2004). In diesen wurden Bereiche der ersten und zweiten extrazellulären Schleife (EL) sowie Bereiche der Transmembrandomänen (TM) als wichtig für Interaktionen mit den Agonisten erachtet. Kristallstrukturen zur Überprüfung der Bittergeschmacksrezeptoren gibt es jedoch bis zum heutigen Tage nicht. Es gibt erste Ansätze die Bittergeschmacksrezeptoren in ausreichenden Mengen zu exprimieren, damit sie kristallisiert werden können (Sugawara *et al.* 2009).

Ein anderer Ansatz ist die Untersuchung der Interaktionen zwischen Agonisten und Rezeptoren mittels computergestützter Rezeptormodellierung kombiniert mit Mutagenese und funktionellen Untersuchungen (Meyerhof *et al.* 2011). Dieser methodische Ansatz erfolgte in neuester Zeit bei den Rezeptoren hTAS2R1 (Upadhyaya *et al.* 2010; Dai *et al.* 2011; Singh *et al.* 2011), -R16 (Sakurai *et al.* 2010a; Sakurai *et al.* 2010b), -R38 (Biarnes *et al.* 2010) und -R46 (Brockhoff *et al.* 2010).

Da sich die Nummerierungen einiger Positionen nach Ballesteros und Weinstein (Ballesteros *et al.* 1995) zwischen den Autoren Brockhoff, Biarnés und Singh unterscheiden, wurden alle Positionen der Transmembrandomänen im Folgenden nach einer einheitlichen durch Dr. Masha Niv (*Hebrew University of Jerusalem*) vorgeschlagenen Nummerierung bezeichnet. Diese Bezeichnungen wurden ebenfalls in dieser Arbeit verwendet. Der zu Grunde liegende Sequenzvergleich ist im Material und Methodenteil beschrieben und in Abb. 50 dargestellt. Sie entspricht im Wesentlichen der Nummerierung, welche von Brockhoff *et al.* 2010 publiziert wurde.

Die Untersuchungen für die Rezeptoren hTAS2R1 (Upadhyaya *et al.* 2010; Dai *et al.* 2011; Singh *et al.* 2011), -R16 (Sakurai *et al.* 2010a; Sakurai *et al.* 2010b), -R38 (Biarnes *et al.* 2010) und -R46 (Brockhoff *et al.* 2010) zeigten, dass diese Bittergeschmacksrezeptoren nur eine Bindungstasche besitzen. Für all diese Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass die TM 6 bedeutend für Agonisten-Interaktion und Rezeptoraktivierung ist (Biarnes *et al.* 2010; Brockhoff *et al.* 2010; Sakurai *et al.* 2010a; Sakurai *et al.* 2010b; Dai *et al.* 2011). Die anderen Transmembrandomänen besitzen einen unterschiedlichen Stellenwert in diesen Rezeptoren. So konnte für TM 3 gezeigt werden, dass diese in den Rezeptoren hTAS2R1

(Upadhyaya *et al.* 2010; Dai *et al.* 2011; Singh *et al.* 2011), hTAS2R16 (Sakurai *et al.* 2010a) und hTAS2R38 (Biarnes *et al.* 2010) wichtig für Aktivierung und Interaktion sind. Die TM 7 wird in den Rezeptoren hTAS2R1 (Upadhyaya *et al.* 2010; Dai *et al.* 2011; Singh *et al.* 2011), hTAS2R38 (Biarnes *et al.* 2010) und hTAS2R46 (Brockhoff *et al.* 2010) als wichtig angesehen. Die TM 5 scheint nur in den Rezeptoren hTAS2R1 (Dai *et al.* 2011) und hTAS2R16 (Sakurai *et al.* 2010a; Sakurai *et al.* 2010b) von Bedeutung zu sein. Die TM 1 und 2 wurden nur im hTAS2R1 (Upadhyaya *et al.* 2010; Singh *et al.* 2011) als bedeutend beschrieben. Der TM 4 wurde in keine dieser Studien eine Bedeutung zugeteilt. Während Pronin *et al.* 2004 den extrazellulären Schleifen 1 und 2 noch eine besondere Bedeutung an der Agonisteninteraktion zugeschrieben hat, zeigen die neuesten Studien (Biarnes *et al.* 2010; Brockhoff *et al.* 2010; Sakurai *et al.* 2010a; Singh *et al.* 2011), dass die Bedeutung der Schleifen geringer zu sein scheint, als von Pronin *et al.* angenommen. Lediglich für den hTAS2R1 (Upadhyaya *et al.* 2010; Dai *et al.* 2011) wird eine mögliche Beteiligung der extrazellulären Schleifen 1 und 2 an der Agonisteninteraktion beschrieben. Nach Brockhoff *et al.* 2010 wird über eine Art von Zugangskontrolle für Agonisten spekuliert, die über unbekannte Positionen in EL1 und Position E70^{2.65} vermittelt werden soll.

Die Interaktionen der bisher untersuchten Bittergeschmacksrezeptoren mit ihren Agonisten unterscheiden sich zum Teil. So wird die Agonisten-Interaktion im hTAS2R1 über die Seitenketten der Aminosäurepositionen N66^{2.61}, N89^{3.36} und E90^{3.37} in den Transmembrandomänen und über E74 und N163 der extrazellulären Schleifen vermittelt (Upadhyaya *et al.* 2010). Im hTAS2R16 wird die Interaktion mit den Agonisten über die Aminosäurepositionen E86^{3.33}, W94^{3.41} und H181^{5.41} vermittelt (Sakurai *et al.* 2010a; Sakurai *et al.* 2010b). Für den hTAS2R38 ist die Aminosäureposition N103^{3.36} als Schlüsselposition in der Agonisten-Interaktion beschrieben worden (Biarnes *et al.* 2010), die auch im hTAS2R1 von Bedeutung ist (N89^{3.36} (Upadhyaya *et al.* 2010)). An der Agonisten-Interaktion im hTAS2R46 sind laut Brockhoff *et al.* 2010 die Positionen Y241^{6.51}, E265^{7.39} und A268^{7.42} beteiligt. Die unterschiedliche Bedeutung von Transmembrandomänen und Aminosäurepositionen an der Agonisten-Interaktion dieser Rezeptoren zeigt, dass für das Verständnis der Agonisten-Interaktion von Bittergeschmacksrezeptoren in ihrer Gesamtheit mehr Rezeptoren untersucht werden müssen. Die Gruppe der Rezeptoren mit einem weitgefächerten Agonistenspektrum (hTAS2R10, -R14 und R46 (Meyerhof *et al.* 2010)) scheint in diesem Zusammenhang besonders interessant, da diese durch ~51 % der von Meyerhof *et al.* 2010 untersuchten Agonisten aktiviert werden.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Bittergeschmacksrezeptoren im Menschen stellen eine Gruppe von 25 G-Proteingekoppelten Rezeptoren dar. Diese Rezeptoren können eine große Anzahl an unterschiedlichsten Bitterstoffen detektieren. Einer dieser Bittergeschmacksrezeptoren ist der hTAS2R10. Der Rezeptor ist, neben dem hTAS2R14 und -R46, einer der Rezeptoren, die durch ein weit gefächertes Agonistenspektrum aktiviert werden. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Bindungstasche des hTAS2R10 und die Struktur-Funktions-Beziehung dieses Rezeptors zu charakterisieren. Daneben soll ergründet werden, worin die Ursache des breiten Agonistenspektrums dieses Rezeptors liegt. Dafür soll ein 3D-Modell des hTAS2R10 berechnet werden, um einen Überblick über potentiell wichtige Positionen zu erhalten, die an der Interaktion zwischen Agonisten und Rezeptor beteiligt sein könnten. Die Überprüfung der durch das Modell identifizierten Positionen, soll durch Mutagenese und pharmakologische Untersuchungen erfolgen. Eine Vorstellung von den möglichen Interaktionen zwischen den ausgewählten Agonisten und dem hTAS2R10 soll ein *In-silico-Docking* geben. Der hTAS2R10 und der bereits gut charakterisierte hTAS2R46 teilen sich eine Vielzahl von Agonisten. Die daraus resultierende Frage ist, ob diese beiden Rezeptoren in ihren Bindungsmodi übereinstimmen und ob sich die beiden Bindungsmodi von einem gemeinsamen evolutionären Ursprung aus entwickelt haben. Der hTAS2R10 und sein dazu orthologer Rezeptor mTas2r105 unterscheiden sich in der Aktivierung durch mindestens einen Agonisten. Unterscheiden sich diese beiden Rezeptoren ebenfalls in ihren Struktur-Funktions-Beziehungen und können daraus Rückschlüsse auf ihre evolutionäre Entwicklung getroffen werden? Die Klärung dieser Fragen ermöglicht wiederum Rückschlüsse auf die Genese der Rezeptoren im Allgemeinen und könnte einen Beitrag zur Lösung der Frage nach einem gemeinsamen Ursprung der Bittergeschmacksrezeptoren leisten. Daneben ist die Struktur-Funktions-Beziehung für die Entwicklung von Bittergeschmack-Inhibitoren von Interesse. Diese würden nicht nur hervorragende Werkzeuge für die Forschung sein, sondern auch ihren Einsatz in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie finden.

2. Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die verwendeten Puffer, Lösungen und Medien, sowie die verwendeten Messgeräte und Programme zur Auswertung aufgelistet und die durchgeführten Methoden erklärt. Die Arbeit lässt sich in fünf große Bereiche unterteilen. Diese Bereiche umfassen molekularbiologischen Methoden, zellbiologischen Methoden, pharmakologische Charakterisierung von Bittergeschmacksrezeptoren, sowie immunzytochemische Expressionsuntersuchungen und *In-silico*-3D-Homologiemodellierung und werden in diesem Kapitel separat behandelt.

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Die gängigen Laborchemikalien sind von Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, Deutschland), VWR International (Darmstadt, Deutschland) oder Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen worden und werden nicht separat aufgelistet.

2.1.2 Geschmacksstoffe

Die in dieser Doktorarbeit verwendeten Geschmacksstoffe Cycloheximid (CYX), Denatoniumbenzoat (DTB), Denatoniumsaccharinat (DTS), Natriumbenzoat (SDB), Gamma-Valerolacton (GVL) und Strychnin (STR) wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen, Deutschland) oder dem Tochterunternehmen FLUKA bezogen. Die Geschmacksstoffe Parthenolid (PAR), Telekin (TEL), Dihydrocostunolid (DHC), AM91A (Menthofofan-Derivat), Menthofurolacton (MFL), Dehydromentholacton (DHM), Epoxy-Parthenolid (EPA), Parthenolid-Aldehyd (PLD) und Dihydroparthenolid (DHP) wurden durch die Arbeitsgruppe von Giovanni Appendino aus Novara Italien isoliert und von dort bezogen.

Die zu den Geschmacksstoffen zugehörigen Strukturformeln (soweit nicht schon im Ergebnisteil gezeigt) befinden sich im Anhang in Tab. 18 S. 152. Die Nomenklatur der C-Atome in Sesquiterpenlactone (PAR, TEL, DHC, EPA, PLD, DHP) erfolgte auf Grundlage der von IUPAC empfohlenen Benennung für Steroide (Moss 1989) entsprechend der in Abb. 6 dargestellten Nomenklatur.

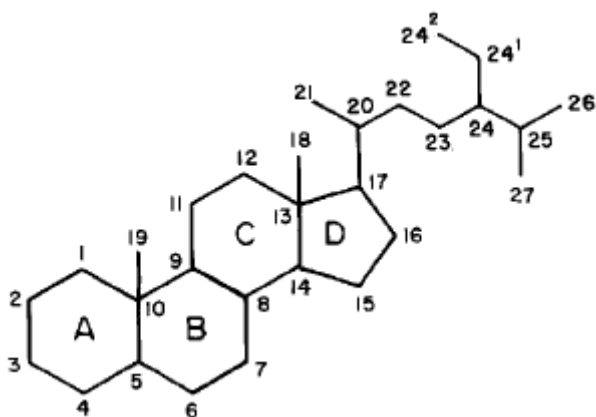


Abb. 6: Nomenklatur für Steroide

Abb. nach (Moss 1989), modifiziert.

2.1.3 Geräte

Alle in dieser Doktorarbeit verwendeten Geräte sind in Tab. 1 aufgelistet.

Tab. 1: Übersicht der verwendeten Geräte

Gerät	Type	Hersteller
pH-Meter	HI 221	Hanna Instruments (Woonsocket, USA)
Zentrifugen	5415C	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
	5417R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
	5804R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
	Varifuge 3.0R	Heraeus (Hanau, Deutschland)
	<i>J2-MI Centrifuge</i>	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
	<i>Micro Centrifuge</i>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Thermoschüttler	<i>Thermomixer compact</i>	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
	<i>Thermomixer 5436</i>	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc (New York, USA)
Magnetrührer	RH basic 2	IKA (Staufen Deutschland)
Waagen	Precisa 120A	Precisa Gravimetrics (Dietikon, Schweiz)
	Acculab Atilon	Sartorius (Göttingen, Deutschland)

	CPA224S-0CE	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Plattenwaschgerät	ELx50	BioTek (Winooski, USA)
Thermocycler	T Professional Basic	Biometra (Göttingen, Deutschland)
	T 3000	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Plattenlesegerät	FLIPR ^{Tetra} (<i>Fluorometric Imaging Plate Reader^{Tetra}</i>)	Molecular Devices (München, Deutschland)
Inkubator	Heracell	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Agarosegelkammer	Horizon 58; 11-14; 20-25	GIBCO BRL (Gaithersburg, USA)
konfokales Laserscanningmikroskop	LCS TCS SP2	Leica Microsystems (Mannheim, Deutschland)
Spannungsquelle für Elektrophorese	<i>Power Pac 300</i>	BioRad (München, Deutschland)
Thermostat	WTE Thermostat 3185 var	Hecht Assistent (Sondheim, Deutschland)
Schüttler	Infors HT TR-250	Infors (Bottmingen, Schweiz)
UV/VIS-Spektralphotometer	Biomate 3	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Gel-Dokumentation	Gene Genius Imaging Systems	Syngene, Cambridge, UK).

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Alle Plastikwaren wurden von Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), B. Braun Melsungen (Melsungen, Deutschland), Falcon (Becton Dickinson Labware, USA), Nunc (Roskilde, Dänemark), Renner (Dannstadt, Deutschland), Greiner (Solingen, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland) und Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

2.1.5 Computersoftware und Internetanwendungen

Alle Datenbankrecherchen wurden auf www.ncbi.nih.gov und <http://www.ensembl.org> durchgeführt. Für Sequenzanalysen wurden verschiedene der dort zur Verfügung stehenden Varianten des BLAST-Algorithmus verwendet, sowie mittels Vector NTI 9.0.0 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Strukturrecherchen von unterschiedlichen Substanzen erfolgten in der Datenbank auf <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Sämtliche Strukturen von Aminosäuren wurden von <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> übernommen. Die Berechnung der Schmelztemperaturen von Oligonukleotiden erfolgte mit Hilfe der *Biomath-Calculator*-Anwendung auf der Internetseite <http://www.promega.com/biomath>. Für die Durchführung

von statistischen Analysen wurde GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software, La Jolla, USA) verwendet.

Eine komplette Liste der verwendeten Software ist in Tab. 2 (S.22) aufgeführt. Deren Verwendung wird an den entsprechenden Punkten beschrieben.

Tab. 2: Übersicht der verwendeten Software

Programm	Hersteller
Microsoft Office 2003	Microsoft (Redmond, USA)
Endnote 7.0.0	Thomson Reuters (Carlsbad, USA)
Vector NTI 9.0.0	Invitrogen, (Karlsruhe, Deutschland)
SigmaPlot 11.1.0.102	Systat Software (Chicago, USA)
CorelDRAW <i>Graphics Suite</i> - Version 12.0	Corel Corporation (Fremont, USA)
ScreenWorks 2.0.0.19	Molecular Devices (München, Deutschland)
Pymol v1.4	Schrödinger (Mannheim, Deutschland)
Maestro 8.0.038 und 9.1.207	Schrödinger (Mannheim, Deutschland)
Leica Confocal Software 2.61	Leica Microsystems (Mannheim, Deutschland)
ChemOffice 2004	CambridgeSoft Corporation (Cambridge, USA)
GraphPad Prism 4.03	GraphPad Software (La Jolla, USA)
GeneSnap 6.01	Synoptics (Cambridge, UK)
Image J 1.45I	<i>Open-Source-Software</i> (http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html)
MarvinView 5.5.1.0	ChemAxon Kft. (Budapest, Ungarn)

2.1.6 Verwendete Haplotypen der Bittergeschmacksrezeptoren (TAS2R)

Die Genloci für hTAS2R kodierende Abschnitte weisen mit 4,2 Varianten pro Gen eine vergleichsweise hohe Diversität auf (Kim *et al.* 2005). Bisherige Untersuchungen zeigen, dass es Unterschiede in der pharmakologischen Antwort dieser Varianten gibt (Chandrashekar *et al.* 2000; Kim *et al.* 2003; Bufe *et al.* 2005; Soranzo *et al.* 2005; Pronin *et al.* 2007; Wooding *et al.* 2011). Es ist daher sinnvoll die verwendeten Rezeptorvarianten anzugeben, welche für die Untersuchungen verwendet wurden. Diese sind in Tab. 3 aufgelistet.

Tab. 3: Übersicht der verwendeten Haplotypen

Rezeptor	Protein-Datenbank-Eintrag	Aminosäure-Position	Literaturnachweis
hTAS2R10	NP_07641	T156 S231	(Kinnamon 2000) (Kim <i>et al.</i> 2005)
hTAS2R46	NP_795368.2	F36 T178 L228 W250 I278 Q288	(Kim <i>et al.</i> 2005) (Conte <i>et al.</i> 2002)
mTas2r105 (<i>Non-Taster</i> C57 BL/6)	NP_065247	T44 I85 T101 T139 G155 V157 L294	(Adler <i>et al.</i> 2000) (Chandrashekar <i>et al.</i> 2000)

Die verwendete Rezeptor-cDNA wurde von der Abteilung Molekulare Genetik des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke (Nuthetal, Deutschland) zur Verfügung gestellt und repräsentiert die hTAS2R-Haplotypen von HEK293T-Zellen (Bufe *et al.* 2002).

2.1.7 Plasmide

Die cDNA der Bittergeschmacksrezeptoren lag bereits kloniert in einem modifizierten pCDNA5/FRT-Expressionsvektor (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) zur heterologen Expression in humanen Ziellinien vor und wurden von der Abteilung Molekulare Genetik des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung (Nuthetal, Deutschland) zur Verfügung gestellt (Bufe *et al.* 2002). Der Rezeptor kodierenden Region wurde eine Kozak-Sequenz ((GCC)GCC R CC ATG G) vorangestellt (Kozak 1984; Kozak 1987). Des Weiteren wurde dem für das Rezeptorprotein kodierenden Bereich, die Sequenz für die ersten 45 Aminosäuren des Somatostatinrezeptors Subtyp 3 der Ratte zur Expressionsverbesserung an der Zellmembran als SST-Tag vorangestellt (Ammon *et al.* 2002; Bufo *et al.* 2002). Für den immunzytochemischen Nachweis der Expression wurde dem Rezeptor C-terminal das

Glykoprotein-D-Epitop des Herpes-Simplex-Virus (HSV-Epitop, QPELAPEDPED) angehängt (siehe Abschnitt 2.5). Als weitere Modifikation wurde mittels Punktmutation die *EcoRI*-Schnittstelle im Hygromycinresistenzgen entfernt, so dass die *EcoRI*-Schnittstelle in der *Multiple Cloning Site* (MCS) zur Klonierung zur Verfügung stand. Die Expression der Rezeptoren erfolgte unter der Kontrolle eines CMV-Promotors.

Eine schematische Darstellung der Klonierungskassette ist in der Abb. 7 zu sehen. Die Klonierung der in dieser Arbeit erzeugten Rezeptormutanten und -chimären erfolgte über die dort abgebildeten *EcoRI*- und *NotI*-Schnittstellen.

CMV-Promotor

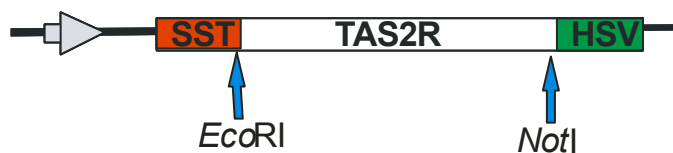


Abb. 7: Klonierungskassette für Bittergeschmacksrezeptoren

Die Klonierungskassette für Bitterrezeptoren enthält einen N-terminalen Somatostatin(SST)-Tag zur Expressionsverbesserung an der Zellmembran und einen C-terminalen HSV-Epitop für den immunzytochemischen Nachweis. Über die abgebildeten *EcoRI*- und *NotI*-Schnittstellen erfolgte die Klonierung von Rezeptoren. Die Kozak-Sequenz ist in dieser Abbildung nicht eingezeichnet. (Abb. zur Verfügung gestellt von M. Behrens (DIfE), modifiziert)

2.2 Molekularbiologie

2.2.1 Lösungen und Medien

Ampicillin	100 mg/mL Lösung in ddH ₂ O; sterilfiltriert; eingesetzt als 1:500 Verdünnung
<i>GelPilot DNA Loading Dye, 5x</i>	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>GeneRuler™ DNA Ladder Mix</i>	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
LB (<i>Lysogeny broth</i>) Medium (Bertani 1951)	1 % (w/v) Caseinhydrolysat; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % (w/v) NaCl pH 7; ggf. mit Antibiotika versetzt LB-Platten wurde 1,5 % (w/v) Agar und ggf. Antibiotika zugesetzt
phiX174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
S.O.C.-Medium	Invitrogen, (Karlsruhe, Deutschland)

50x TAE (TRIS-Acetat-EDTA)-Puffer

2 M Tris Base; 1 M Essigsäure (absolut); 0,05 M EDTA; pH
7,8; autoklaviert

2.2.2 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden die Bakterienstämme *Escherichia coli* TOP 10 von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) mit einer Transformationseffizienz von 1×10^9 cfu/ μ g und *Alpha-Select-Gold-Efficiency* (1×10^9 cfu/ μ g) von Bioline (Luckenwalde, Deutschland) für die Transformation mit ligierter DNA eingesetzt. Für die Retransformation von Plasmid-DNA wurden *Alpha-Select-Bronze-Efficiency* Bakterien (Bioline, Luckenwalde, Deutschland) mit einer Transformationseffizienz von 1×10^7 cfu/ μ g benutzt.

2.2.3 Enzyme

In Tab. 4 sind alle bei molekularbiologischen Methoden verwendeten Enzyme aufgelistet. Die Verwendung der Enzyme erfolgte stets in den vom Hersteller empfohlenen und zur Verfügung gestellten Puffern.

Tab. 4: Übersicht der verwendeten Enzyme

Enzym	Hersteller
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Promega (Mannheim, Deutschland)
Restriktionsenzyme: <i>EcoRI</i> und <i>NotI</i>	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Ligase: Fastlink Ligase	Epicentre Biotechnologies, Madison, USA
Shrimp-Alkaline-Phosphatase SAP	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland

2.2.4 Generierung von Bittergeschmacksrezeptormutanten und -chimären durch zielgerichtete, ortsspezifische Mutagenese

In dieser Doktorarbeit wurde die von Ho *et al.* (Ho *et al.* 1989) beschriebene zielgerichtete, ortsspezifische Mutagenese durch sogenannte *Overlap Extension PCR* zur Erzeugung von Rezeptormutanten durchgeführt. Hierbei wurden spezielle Primer benutzt, die während der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) einen zielgerichteten, ortsspezifischen Triplet-Austausch ermöglichten. Bei diesen Reaktionen entstanden Unterfragmente, oder auch Sub-Fragmente

genannt, bei denen das ursprüngliche Basen-Triplett gegen das für die gewünschte Aminosäure kodierende Triplett ausgetauscht wurde. Des Weiteren enthielten diese Fragmente 5'-Überhänge, die es ermöglichten die Subfragmente in einer zweiten PCR, der Rekombinations-PCR, zu vollständigen Fragmenten zu rekombinieren und amplifizieren. Diese wurden anschließend nach dem im Abschnitt 2.2.5 (S. 29) beschriebenen Restriktionsprotokoll verdaut und in den entsprechend restringierten Expressionsvektor inkloniert (Abb. 7; S. 24). Ein schematischer Ablauf der *Overlap Extension PCR* ist in Abb. 8A (S. 27) zu sehen. Die verwendeten Primer befinden sich im Anhang (S.152 Tab. 19). Das ausgetauschte Basen-Triplett ist dort markiert (dick geschrieben und unterstrichen). Die Erzeugung von Rezeptorchimären gestaltete sich ähnlich wie die der Rezeptormutanten. In einem Geschmacksrezeptor wurde mit Hilfe spezieller Primern, anstelle eines Basentriplett austausches ein 5'-Überhang eingeführt, der komplementär zum verknüpfenden Rezeptor war, so dass Rezeptorfragmente amplifiziert wurden, die bei der anschließenden Rekombinations-PCR zu Rezeptorchimäre kombiniert werden konnten. Auch dieser Ablauf ist in Abb. 8B (S. 27) abgebildet. Die zur Erzeugung der Chimären verwendeten Primer befinden sich im Anhang (S.152 Tab. 19). Der zu verknüpfende Teil des hTAS2R10 ist jeweils schwarz und der des mTas2r105 als dicke, unterstrichene Schrift markiert.

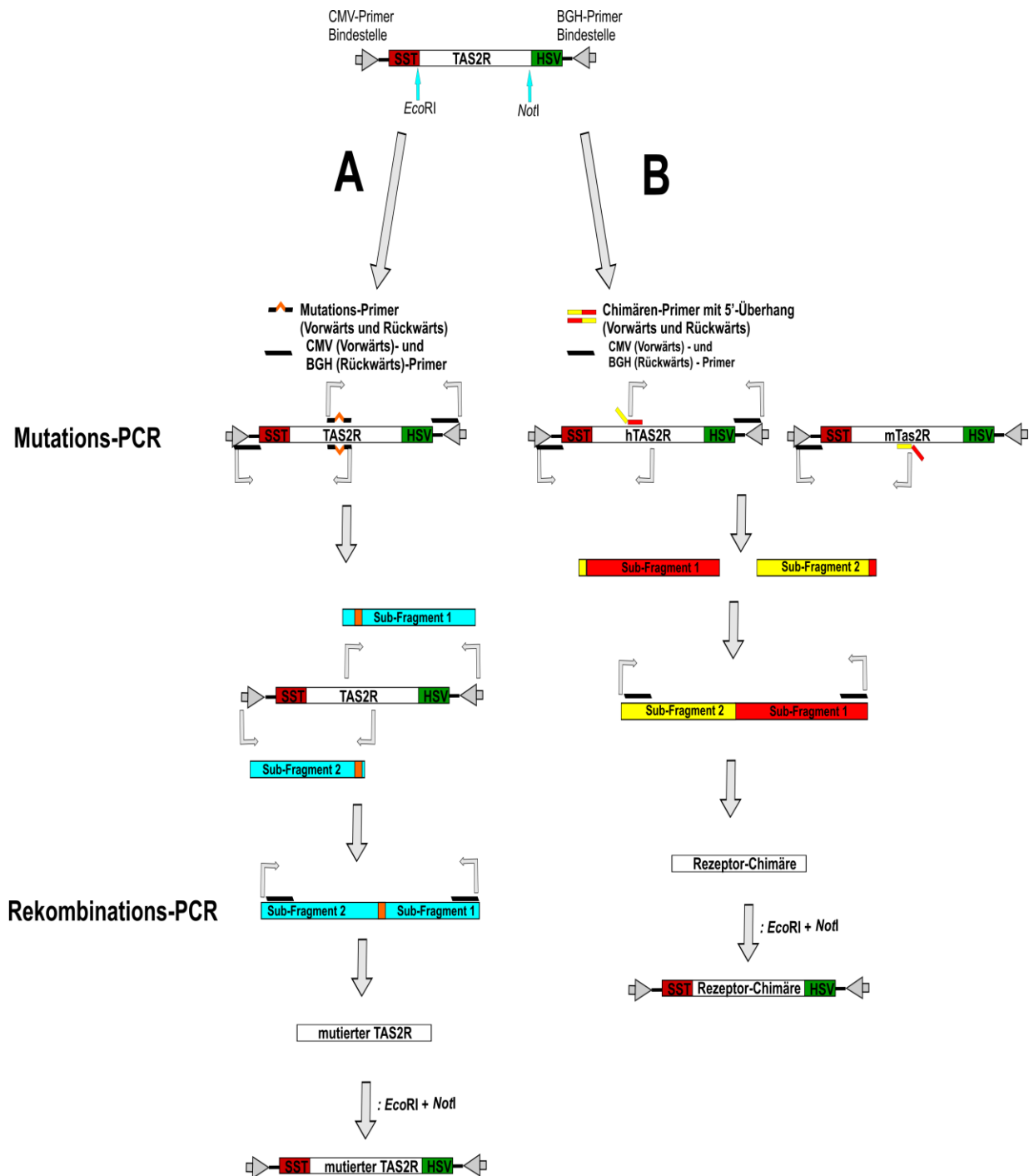


Abb. 8: Klonierungsstrategie zur Generierung von Bittergeschmacksrezeptormutanten und -chimären
(A) Erzeugung von Rezeptormutanten, ausgehend von einer in einen pcDNA-5-Expressionsvektor klonierten N-terminal durch eine CMV-Primer Bindestelle und C-terminal durch eine BGH-Primer Bindestelle flankierte Rezeptor-cDNA mit N-terminalem SST- und C-terminalem HSV-Epitop. Zunächst erfolgte die Mutations-PCR bei dem das gewünschte Basentriplett ausgetauscht und Subfragmente erzeugt wurden. Diese wurden anschließend zu vollständigen Rezeptormutanten rekombiniert und anschließend amplifiziert. Die Rezeptormutanten wurden nach *EcoRI*- und *NotI*-Verdau wieder in den Expressionsvektor kloniert. **(B)** Der Ablauf zur **Generierung von Rezeptorchimären** ist ähnlich dem der Erzeugung der Rezeptormutanten, jedoch wurden mittels der Primer hier nur 5'-Überhänge eingeführt, welche die Verknüpfung zweier unterschiedlicher Rezeptoren (rote und gelbe Rezeptor Subfragmente) zur einer Rezeptorchimäre ermöglichten.

2.2.4.1 Oligonukleotid-Primer

Die Oligonukleotide für den ortsspezifischen Tripletttausch wurden mit Hilfe von Vector NTI so entworfen, dass sich das neu einzuführende Basentriplett möglichst in der Mitte des Primers befand und möglichst wenige Basen ausgetauscht werden mussten. Die Länge der Primer wurde stets so gewählt, dass eine unspezifische DNA-Amplifikation ausgeschlossen werden konnte und eine Schmelztemperatur von $>59\text{ }^{\circ}\text{C}$ erreicht wurde. Die Berechnung der Schmelztemperaturen von Oligonukleotiden erfolgte mit Hilfe der *Biomath-Calculator*-Anwendung auf der Internetseite <http://www.promega.com/biomath>. Das Entwerfen der Primersequenzen für die Konstruktion von Rezeptorchimären erfolgte nach dem gleichen Prinzip; jedoch mit dem Unterschied, dass dem Primer die Sequenz des zu verknüpfenden Rezeptors am 5'-Ende angefügt wurde. Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und die dazugehörigen Sequenzen befinden sich als Übersichtstabelle im Anhang (S.152 Tab. 19).

2.2.4.2 Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes und Ablauf des PCR- Programms

Die für die Mutations- und Rekombinations-PCR verwendeten Reaktionsansätze hatten die folgenden Zusammensetzungen:

Mutations-PCR

10 ng Plasmid-DNA
 0,8 mM dNTP-Mix
 0,2 nM je Primer (Mutagenese / Vektor)
 1x *Pfu*-DNA-Polymerase-Puffer
 1,5 U *Pfu*-DNA-Polymerase
 ad 25 μL ddH₂O

Rekombinations-PCR

8 μL FW- und RV-Subfragmente-Mix
 0,8 mM dNTP-Mix
 0,2 nM je Primer (Vektor)
 1x *Pfu*-DNA-Polymerase-Puffer
 1,5 U *Pfu*-DNA-Polymerase
 ad 25 μL ddH₂O

Die Mutagenese- und Rekombinations-PCR liefen nach folgenden Programmen ab:

	<u>Mutations-PCR</u>	<u>Rekombinations-PCR</u>
1. Denaturierung: 94 °C	5,0 min.	5,0 min.
2. Annealing: 54 °C	1,5 min.	1,5 min.
3. Elongation: 72 °C	3,0 min.	3,5 min.
4. Denaturierung: 94 °C	1,0 min.	1,0 min.
19 mal WH: Schritt 2-4		
5. Annealing: 54 °C	5,0 min.	5,0 min.
6. Elongation: 72 °C	10 min	10 min
7. PCR-Ende: 4 °C	-	-

Alle PCR erfolgten als so genannte *Hot-Start-PCR* bei der die *Pfu*-Polymerase erst während des 1. PCR-Schrittes zum Reaktionsansatz gegeben wurde, nachdem die Proben eine Temperatur von 94 °C erreicht hatten, um unspezifische Amplifikation zu minimieren.

Die Subfragmente wurden nach der Mutations-PCR mittels präparativer Agarosegelelektrophorese isoliert und aufgereinigt. Der Erfolg der Rekombinations-PCR wurde mittels analytischer Gelelektrophorese überprüft (siehe S. 30; Abschnitte 2.2.7). Die Aufreinigung erfolgte ähnlich wie die der Restriktionsansätze mittels des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) (siehe 2.2.5 S.29).

2.2.5 Restriktionsanalyse

Die Restriktionsanalysen wurden als analytische oder präparative Restriktionen mit unterschiedlichen DNA-Mengen durchgeführt. Die Restriktionen wurden bei den vom Hersteller angegebenen Temperaturen für 1-4 Stunden oder über Nacht durchgeführt. Bei Restriktionsanalysen mit einem Enzym (siehe Tab. 4 S.25) wurde der vom Hersteller angegebene Puffer verwendet. Bei Restriktionen mit zwei Enzymen wurde der Puffer gewählt, in dem beide Enzyme die höchste Aktivität zeigen (laut Angabe www.fermentas.com). Die Restriktionen wurden mittels analytischen Agarosegelen auf ihre Vollständigkeit überprüft (siehe 2.2.7) und mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) entsprechend der Herstellerangaben oder mittels präparativem Agarosegel (siehe 2.2.7) gereinigt.

2.2.6 Dephosphorylierung des geschnittenen Expressionsvektors

Die Behandlung des verdauten Vektors mit alkalischer Phosphatase verhindert die Religation der Vektor-DNA, da am 5'-Ende die Phosphatgruppe entfernt wird. Dazu wurde nach der Restriktion des Vektors 1 μ L *Shrimp-Alkaline-Phosphatase* SAP (1 U/ μ L, Roche) hinzugegeben und der Ansatz eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wurde im Anschluss mittels präparativer Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.7) gereinigt.

2.2.7 Elektrophorese

2.2.7.1 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese von DNA für analytische und präparative Zwecke wurde in horizontalen Elektrophoreseapparaturen (Horizon, GIBCO BRL) durchgeführt. Die Agarose (*UltraPure*, Invitrogen) wurde in 1x TAE-Puffer (w/v 1-2 % Agarose) gelöst und mittels Mikrowelle erhitzt. Nach abkühlen der Lösung auf unter 50 °C wurde diese mit Ethidiumbromid (0,3 μ g/mL Endkonz.) versetzt und das Gel entsprechend den Anforderungen (analytisch oder präparativ) gegossen.

Die Proben wurden mit 1/5 Volumen DNA-Probenpuffer (Qiagen) versetzt und in die Taschen geladen. Zur Abschätzung der Fragmentgröße wurden 3-15 μ l (entsprechend der Größe der Taschen) des *GeneRuler™ DNA Ladder Mix* Standards (Fermentas) oder des *phiX174-DNA/BsuRI-(HaeIII)-Standards* (Fermentas) aufgetragen (siehe Abb. 9).



Abb. 9: GeneRuler™ DNA Ladder Mix Standard (links) und phiX174 DNA/BsuRI (HaeIII) Standard (rechts)

(Abb. von www. fermentas.com, 08/2011)

2.2.7.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Unter UV-Licht wurde die gewünschte Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein geeignetes Reaktionsgefäß überführt. Die Isolierung der DNA-Fragmente aus den Agarosegelstücken erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) entsprechend der Herstellerangaben. Die DNA wurde zum Abschluss mit 60 µL ddH₂O eluiert.

2.2.8 Ligation

Alle Ligationen wurden mittels Fast-Link™ DNA Ligation Kit (Epicentre Biotechnologies) durchgeführt und setzten sich wie folgt zusammen:

2 µL geschnittener und dephosphorylierter Expressionsvektor

5 µL geschnittene Rezeptormutante oder -chimäre

1 µL ATP

1 µL Ligase-Puffer

1 µL Ligase

Σ 10 µL

Der Ligationsansatz wurde bei RT für 20-30 min. inkubiert. Anschließend wurden 3,5 µL des Ansatzes zur Transformation kompetenter *E.-coli*-Bakterien (Abschnitt 2.2.2) entsprechend Abschnitt 2.2.9 verwendet.

2.2.9 Transformation kompetenter Bakterien

Chemisch kompetente *E.-coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Diese Zellen wurden zusammen mit 3,5 µl Ligationsansatz auf Eis für 30 min inkubiert. Nach dieser Zeit wurde mit dem Ansatz für 45 s der Hitzeschock bei 42 °C durchgeführt und danach sofort für weitere 2 Minuten auf Eis inkubiert. Zu den transformierten Bakterien wurden dann 250 µL S.O.C.-Medium gegeben und bei 37 °C unter leichtem Schütteln für 1 h inkubiert. Der Transformationansatz wurde anschließend vollständig auf LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen und diese dann über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.10 Vermehrung und Isolation von Plasmid-DNA

Zwischen 4 und 10 Kolonien pro Konstrukt wurden mit sterilen Pipettenspitzen isoliert, in 4 mL LB-Medium mit Ampicillin (200 µg/mL, empirisch ermittelte optimale Konzentration) überführt und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Sollte das Plasmid präparativ vermehrt werden, wurden 150 mL Medium mit den entsprechenden konstrukttragenden Bakterien angeimpft.

Zur Präparation der Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurden 2 mL der Übernachtskultur mit Hilfe des Nucleo Spin Plasmid Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) aufgearbeitet. Folgende Änderungen wurden im Gegensatz zu den Herstellerangaben durchgeführt: Die 2 mL Bakteriensuspension wurde anstatt 1 min bei 10.000 g, 10 min bei 13.000 g zentrifugiert. Die aufgereinigte DNA wurde am Ende in 60 µL ddH₂O eluiert und die Konzentration mittels UV/VIS-Spektralphotometer (Abschnitt 2.2.11) bestimmt. Zur Kontrolle der erfolgreichen Klonierung von Rezeptormutanten wurden die Plasmide mittels *EcoRI* und *NotI* verdaut (siehe 2.2.5) und eine Auswahl der positiven Plasmide sequenziert (Kapitel 2.2.12).

Für die präparative Plasmidvermehrung wurden die gesamten 150 mL der Bakterienkultur, bis auf eine kleine Probe für die Glycerinkultur (2.2.13), mittels NucleoBond® PC 500 EF Kit (Macherey-Nagel) entsprechend den Herstellerangaben aufgearbeitet und die DNA anschließend in 150-500 µL ddH₂O resuspendiert. Die Konzentration der DNA wurde mittels UV/VIS-Spektralphotometer bestimmt (siehe 2.2.11). Zur Verifizierung der erfolgreichen Präparation wurden alle Plasmide sequenziert (Abschnitt 2.2.12).

2.2.11 DNA-Konzentrationsbestimmung mittels UV/VIS-Spektralphotometer

Die Konzentration von wässriger DNA-Lösung wurde mittels Biomate 3 UV/VIS-Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific) und NanoCell-Küvette mit 0,2mm-Kappe (Thermo Fisher Scientific) entsprechend der Herstellerangabe gemessen. Durch die NanoCell-Küvette ist es möglich kleinste Volumina (3 µL) der Lösung zu messen. Die Grundlage der Konzentrationsbestimmung ist das Absorptionsmaximum von doppelsträngiger DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm und das Lambert-Beersche Gesetz. Für die Konzentration der doppelsträngigen DNA gilt: $c = E_{\lambda} / (\epsilon_{\lambda} * d)$

E_{λ} = Extinktion

ϵ_{λ} = dekadischer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ , der für doppelsträngige DNA bei konstanter Schichtdicke 50 ng/µL beträgt

d = Schichtdicke des durchstrahlten Körpers, definiert durch die verwendete NanoCell-Küvette und entsprechende Kappe

c = Konzentration in ng/µL

Die zusätzliche Messung der Absorption bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren, gibt Aufschluss über eine eventuelle Verunreinigung mit Proteinen (Sambrook *et al.* 2001). Proteinfreie Nukleinsäurelösungen weisen einen Quotienten: Absorption 260nm / Absorption 280nm von 1,8-2,0 auf (Huberman 1995).

2.2.12 DNA-Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins MWG Operon durchgeführt. Die Vorbereitung der Proben erfolgte nach deren Vorgaben. Die verwendeten Sequenzierungsprimer sind im Anhang in (S.152 Tab. 19) aufgelistet. Die Auswertung der Sequenzierungen wurde mittels Vector NTI 9.0.0 (Invitrogen) durchgeführt.

2.2.13 Glycerolstock für Bakterien

Eine Flüssigkultur (2.2.10) mit Bakterien zu Beginn oder kurz vor der Plateauphase wurde zu gleichen Teilen mit Glycerol versetzt und direkt in einem Gefrier Röhrchen bei - 80 °C zur Langzeitlagerung eingefroren.(modifizier nach (Sambrook *et al.* 2001))

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Zelllinie

In dieser Doktorarbeit wurden modifizierte HEK293T-Zellen verwendet, welche stabil das chimäre G-Protein $G_{\alpha 16\text{Gust}44}$ exprimieren. Dieses chimäre G-Protein besteht aus dem N-terminalen Bereich des $G_{\alpha 16}$ und den 44 C-terminalen Aminosäuren des α -Gustducins (Ueda *et al.* 2003) und wurde von Jay Slack (Givaudan Flavors Corp.) zur Verfügung gestellt.

2.3.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Trypsin/EDTA für die Zellkultivierung	0,53 mM EDTA pH 7,4; 0,05 % (w/v) Trypsin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) in 1x PBS pH 7,4 und steril filtriert.
1 x PBS	100 mM Na ₂ HPO ₄ , 23 mM NaH ₂ PO ₄ , 65 mM NaCl; pH 7,4
Poly-D-Lysin G418	10 mg/mL Stock; Sigma-Aldrich 100 mg/mL Stock; Calbiochem (San Diego, USA)
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (D-MEM)	mit L-Glutamin; 4500 mg/L D-Glucose, ohne Pyruvat; Invitrogen
Fetales Kälberserum	Biochrom, Lot.Nr.: 0055H
Penicillin/Streptomycin (P/S)	10.000U / 10,000 µg/mL; Biochrom
L-Glutamin	200 mM; Biochrom
Transfektionsreagenzien	Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen); FuGeneHD (Roche)

2.3.3 Beschichten von Zellkulturgefäßen

Um das Anhaften der Zellen auf glatten Oberflächen wie z.B. 96-Loch-Platten (Greiner; siehe 2.3.5) oder Deckgläschen (siehe 2.3.5) zu verbessern, wurden alle Zellkulturgefäße mit poly-D-Lysin (10 µg/mL, 20-30 min.; RT) beschichtet. Dies bewirkte eine Änderung der Polarität der Oberfläche, was die Anhaftung verbesserte. Um die Zellen bereits bei der Kultivierung an das poly-D-Lysin zu gewöhnen, wurden ebenfalls die Kulturschalen (d = 10 cm; Renner) mit poly-D-Lysin beschichtet (1 µg/mL; 10 min.; RT). Kulturschalen und Deckgläschen wurden anschließend mit ddH₂O gewaschen. Überschüssiges poly-D-Lysin in den 96-Loch-Platten wurde durch mehrmaliges ausschlagen der Platten entfernt.

2.3.4 Zellkultivierung

Die Kultivierung der Zellen (HEK293T G_{α16Gust44}) erfolgte bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit 5 % Kohlendioxid, auf poly-D-Lysin beschichteten 10-cm-Kulturschalen mit Kulturmedium (D-MEM incl. 10 % FCS, 1 % P/S, 1 % L-

Glutamin), dem G418 (400 µg/mL Endkonz.) als Selektionsantibiotikum zugesetzt wurden. Zum Passagieren der zu ca. 90 % konfluenten Zellen, wurde das Medium zunächst vollständig abgenommen. Anschließend wurden die Zellen mittels Trypsin/EDTA von der Kulturschale abgelöst, das Trypsin/EDTA durch serumhaltiges Medium inhibiert und die Zellen vereinzelt. Nach Zentrifugation der Zellen (900 rpm, 5 min.; RT) wurde der Überstand verworfen, die Zellen mit Medium versetzt und wieder vereinzelt. Die Aussaat der Zellen erfolgte dann entsprechend der Anforderung der Experimente. Die Zellen wurden ca. bis zur Passage 35 verwendet und dann verworfen.

2.3.5 Transiente Transfektion

Die pharmakologische Charakterisierung von Bittergeschmacksrezeptoren, -rezeptormutanten und -rezeptorchimären (Abschnitt 2.4) erfolgte in transient transfizierten HEK293T- $G_{\alpha 16Gust44}$ -Zellen. Hierfür wurden die Zellen so in 96-Loch-Platten mit klarem Boden und schwarzen Wänden (µClear, Greiner) ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von ca. 70-80 % erreichten. Als Transfektionsreagenz diente hierfür Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen). Entsprechend den Herstellerangaben wurden pro zu transfizierendem Loch 0,15 µg DNA mit je 12,5 µL serumfreien D-MEM (Invitrogen) gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Parallel dazu wurden pro Loch 0,3 µL Lipofectamine™ 2000 mit je 12,5 µL serumfreien D-MEM gemischt und ebenfalls für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die beiden Ansätze vereinigt und für mindestens weitere 20 min bei RT inkubiert. Während dieser Zeit assoziiert die DNA mit Lipofectamine™-2000-Molekülen zu Komplexen, die später von den Zellen aufgenommen werden konnten. Danach wurde der Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben und in Abhängigkeit von der Zelldichte für 3-5h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Transfektion erfolgte dabei in serumfreiem D-MEM (50 µL/Loch). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde wieder auf serumhaltiges D-MEM gewechselt. Die Zellen wurden bis zum nächsten Tag bei 37 °C; 5 % CO₂ bebrütet.

Für die Transfektion von Zellen zur immunzytochemischen Expressionsuntersuchung von Bittergeschmacksrezeptoren, -rezeptormutanten und -rezeptorchimären (Abschnitt 2.5) wurde FuGeneHD (Roche) benutzt. Dieses Transfektionsreagenz bot den Vorteil einer einfacheren Handhabung (kein Mediumwechsel notwendig) und einer geringeren Zytotoxizität bei vergleichbarem Expressionslevel wie Lipofectamine™ 2000. Für diese Untersuchung wurden

die Zellen so auf beschichteten Deckgläschen in 24-Loch-Platten ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 70-90 % erreichten. Entsprechend der Herstellerangaben wurden pro zu transfizierendem Loch 500 ng DNA mit 25 μL /Loch serumfreiem D-MEM für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde zum Transfektionsansatz FuGeneHD im Verhältnis: 1 μg DNA : 3 μL FuGeneHD gegeben und dieses nach dem Mischen für mind. 15 min inkubiert. Danach wurden jeweils 24,5 μL des Ansatzes zu den Zellen gegeben und bis zum nächsten Tag bei 37 °C, 5 % CO_2 bebrütet.

2.4 Pharmakologische Charakterisierung von Bittergeschmacksrezeptoren, -rezeptormutanten und -rezeptorchimären

2.4.1 Grundlage der *Calcium-Imaging*-Analyse

Wie bereits zuvor mehrfach publiziert (Chandrashekar *et al.* 2000; Bufe *et al.* 2002; Bufe *et al.* 2005; Brockhoff *et al.* 2007; Brockhoff *et al.* 2010) werden Bitterrezeptoren und deren Mutanten/Chimären mittels eines heterologen Expressionssystems exprimiert. Das Rezeptorprotein wurde hierfür N-terminal mit den 45 N-terminalen Aminosäuren des Somatostatinrezeptors Subtyp 3 der Ratte zur Expressionsverbesserung fusioniert (entsprechend Abschnitt 2.1.8). Das von den HEK293T-Zellen stabil exprimierte chimäre G-Protein ($G_{\alpha 16\text{Gust44}}$; entsprechend Abschnitt 2.3.1) kann sowohl über die 44 C-terminalen Aminosäuren des α -Gustducins an Bittergeschmacksrezeptoren koppeln, als auch über den N-terminalen $G_{\alpha 16}$ -Teil (G_q -Familie) die Phosphoinositid-Phospholipase C (Phospholipase C, kurz PLC) aktivieren (Offermanns *et al.* 1995; Ueda *et al.* 2003). Nach Aktivierung des heterolog exprimierten Bittergeschmackrezeptors (od. Mutante/Chimäre) durch einen Agonisten, wird durch die Kopplung an die PLC und deren Aktivierung die Umsetzung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) katalysiert. Das IP_3 bewirkt durch Bindung an den spezifischen IP_3 -Rezeptor (IP_3R) die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER). Die dadurch resultierende erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration kann durch einen Ca^{2+} sensitiven Farbstoff w.z.B. Fluo-4-AM (Molecular Probes, Eugene, USA) nach Abspaltung der Acetoxy-Methylester-Gruppe (AM) detektiert werden. Die Bindung von Ca^{2+} an Fluo4

bewirkt eine Steigerung der Fluoreszenz-Intensität von >100 fache (Gee *et al.* 2000), welche nach Anregung des Farbstoffes bei 488 nm, bei 520 nm als Signal gemessen werden kann. In Abb. 10 wird das Grundprinzip der Methodik verdeutlicht.

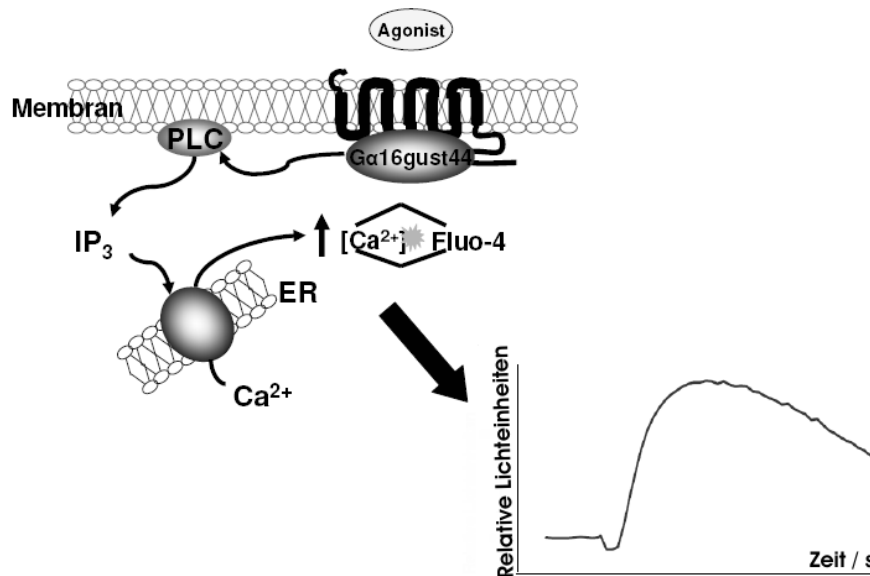


Abb. 10: IP₃-abhängige Signalkaskade und Grundprinzip der *Calcium-Imaging*-Analyse

Nach Aktivierung des Bittergeschmacksrezeptors durch einen Agonisten kommt es über die Aktivierung des heterotrimeren chimären G-Proteins ($G_{\alpha 16\text{Gust}44\beta\gamma}$) zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Diese spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG). IP_3 bindet an den spezifischen IP_3 -Rezeptor (IP_3R), wodurch Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) freigesetzt wird. Dieses bindet an den Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Fluo4. Die dadurch erhöhte Fluoreszenz kann dann nach Anregung des Farbstoffes bei 488 nm als Signal detektiert werden. (Abb. zur Verfügung gestellt von M. Behrens, DIfE; modifiziert)

2.4.2 *Calcium-Imaging*-Analyse

Wie in Abschnitt 2.3.5 beschrieben wurden HEK293T- $G_{\alpha 16\text{Gust}44}$ -Zellen auf poly-D-Lysin beschichteten Platten ausgesät und mit Bittergeschmacksrezeptoren, -rezeptormutanten oder -rezeptorchimären transfiziert. Nach Bebrütung der Zellen für mind. 22 h bei 37 °C und 5 % CO_2 wurden diese mit Fluoreszenzfarbstoff beladen. Je Loch wurden 50 μL Beladungslösung, bestehend aus 2,5 mM Probenecid (Sigma-Aldrich) und 2 μM Fluo4-AM (Molecular Probes), in serumfreiem D-MEM zu den Zellen gegeben und diese anschließend für 1 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Als nächstes wurden die Zellen im

automatischen Plattenwaschgerät (Elx50, BioTek) mit C1-Puffer-Lösung, bestehend aus 130 mM NaCl, 10 mM Na-Hepes, 10 mM Glucose, 5 mM KCl und 2 mM CaCl₂ (Puffer-pH = 7,4), dreimal alle 20-25 min gewaschen. Ein Waschschritt bestand aus dreimaligem Absaugen und Zugeben von C1-Lösung durch das Plattenwaschgerät. Nach der Waschprozedur verblieben 100 µL C1-Lösung je Loch. Die 96-Loch-Platten wurden zwischen den Waschschritten bei RT im Dunkeln inkubiert. Die zu testenden Geschmacksstoffe wurden als Verdünnungsreihen in C1-Puffer gelöst und in 96-Loch-Platten (Renner) vorgelegt. Die Messung erfolgte dann im FLIPR^{Tetra} (*Fluorometric Imaging Plate Reader*, Molecular Devices), einem Platten-Lesegerät mit dem es möglich ist parallel alle 96-Löcher einer 96-Loch-Platte zu messen und mittels Pipettierroboter unterschiedliche Agonisten zu applizieren. Die Messung erfolgte nach folgendem Programm bzw mit folgenden Parametern:

$\lambda_{\text{Exc.}} = 470\text{-}495 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Em.}} = 515\text{-}575 \text{ nm}$; Lichtquelle = LED-Bank; Detektion = CCD-Kamera; Kameraverstärkung = 130; Extinktionsintensität = 100; Belichtungszeit = 0,25–0,75 s

Basislinie: alle 2 s ein Bild, insgesamt 10 Bilder

1. Applikation: 50 µL potentielle Geschmacksstofflösung oder C1-Puffer mit Applikationsgeschwindigkeit: 30 µL/s
 - 70 Bilder alle 2 s, gefolgt von 35 Bilder alle 10 s
 - 10 Bilder alle 2 s
2. Applikation: 50 µL Somatostatin 14 (100 nM Endkonzentration, Sigma-Aldrich) mit Applikationsgeschwindigkeit: 30 µL/s
 - 55 Bilder alle 2 s gefolgt von 2 Bildern im Abstand von 5 s

Zu Beginn der Messung wurde die Grundfluoreszenz so eingestellt, dass ein Wert von 1000 RLU erreicht wurde, um den optimalen Messbereich des Messgerätes zu nutzen. Nach Start des Messprogramms erfolgte zunächst die Aufnahme der Basislinie, die der späteren Korrektur der Werte in Bezug auf unterschiedliche Zellzahl und Beladung diene. Anschließend wurden 50 µL der potentiellen Testsubstanzen appliziert. Diese waren dreimal so hoch konzentriert. Durch die nach dem Waschen auf den Zellen zurückbleibenden 100 µL C1-Puffer ergab sich eine Verdünnung der Testsubstanzen auf die gewünschte Endkonzentration. Alle Konzentrationen wurden so gewählt, dass die Zellen nicht über endogene Rezeptoren durch die Testsubstanz aktiviert wurden. Als Negativkontrolle wurden mit pcDNA5-FRT/PM-Vektor (MOCK) transfizierte Zellen verwendet. Alle Messungen wurden als wiederholte Messungen von Duplikaten oder Triplikaten durchgeführt.

Als Vitalitätskontrolle (2. Applikation) diente Somatostatin 14 (100 nM Endkonzentration, Sigma-Aldrich), das den durch die HEK293T-G_{α16Gust44}-Zellen endogen exprimierten Somatostatin-Rezeptor-Subtyp 2 aktiviert. Die Höhe dieses Signals gab Aufschluss über den Zustand der Zellen.

2.4.3 Auswertung von *Calcium-Imaging-Experimenten*

Zur Extraktion der Messdaten wurde ScreenWorks 2.0.0.19 (Molecular Devices) benutzt. Zunächst wurde auf Grundlage der Basislinie die Hintergrundfluoreszenz exportiert (Mittelwert der Fluoreszenz von Messwert 1-10 für das jeweilige Loch). Anschließend wurde jeder Messwert rezeptortransfizierter Zellen um den Messwert pcDNA5/FRT/PM (MOCK)-transfizierter Zellen bei der entsprechenden Geschmacksstoffkonzentration korrigiert (automatisierte Subtraktion). Als nächstes wurde die relative Signalthöhe, durch Subtraktion der minimalen Signalthöhe von der maximalen Signalthöhe, berechnet und exportiert. Mittels Excel wurde danach der Quotient aus relativer Signalthöhe und Hintergrundfluoreszenz gebildet. Danach wurde der so korrigierte Fluoreszenzwert des Lösungsmittels (C1-Puffer) von den Fluoreszenzwerten der einzelnen Konzentrationen subtrahiert. Daraus ergibt sich für die Berechnung der bereinigten und normalisierten Fluoreszenzsignale $\Delta F/F = ((FR - FSR) - (FM - FSM)) / FSR$, wobei FR = absolutes maximales Fluoreszenzsignal rezeptortransfizierter Zellen nach Aktivierung, FSR = Hintergrundfluoreszenz rezeptortransfizierter Zellen, FM = absolutes maximales Fluoreszenzsignal MOCK-transfizierter Zellen nach Testsubstanzapplikation, FSM = Hintergrundfluoreszenz MOCK transfizierter Zellen ist.

Für die Berechnung von EC₅₀-Werten (mittels SigmaPlot 11.1.0.102, Systat Software) wurde, soweit wie möglich, die nichtlineare Regressionsfunktion $f(x) = (a - d) / (1 + (x / EC_{50})^{nH}) + d$ verwendet, wobei a = Maximum, d = Minimum und nH = Hill-Koeffizient entsprechen.

Für Dosis-Wirkungs-Kurve wurden die Fluoreszenzsignale als Mittelwert mit Standardabweichung gegen den Logarithmus der Testsubstanz-Konzentration aufgetragen (SigmaPlot 11.1.0.102, Systat Software). Die Berechnung von EC₅₀-Mittelwerten mit Standardabweichung erfolgte auf Basis von mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Neben dem EC₅₀-Wert wurde zum Vergleich von Bittergeschmacksrezeptoren, -rezeptormutanten und -rezeptorchimären auch der Schwellenwert herangezogen, der sich in

dieser Arbeit als die erste Konzentration definiert, welche signifikant höher war als das entsprechend Signale, der MOCK-Kontrolle.

2.5 Immunzytochemische Charakterisierung

2.5.1 Immunzytochemische Färbung von transient transfizierten Zellen

Die immunzytochemische Charakterisierung von Rezeptoren, Mutanten und Chimären dient dem Vergleich in Hinblick auf Expressionsrate und Expressionsart (zytosolisch oder membranständig). Die Charakterisierung erfolgte in 24-Loch-Platten, auf mit poly-D-Lysin beschichteten Deckgläsern (entsprechend 2.3.3) ausgesäten und mit Bittergeschmacksrezeptoren, -rezeptormutanten oder -rezeptorchimären transfizierten (Abschnitt 2.3.5) HEK293T- $G_{\alpha 16Gust44}$ -Zellen. Diese wurden frühestens 24 h nach der Transfektion mehrmals mit 37 °C warmem PBS (100 mM Na_2HPO_4 , 23 mM NaH_2PO_4 , 65 mM NaCl; pH 7,4) gewaschen. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Dies diente der Inhibition der Endozytose als Vorbereitung der Concanavalin-A-Membranfärbung. Hierfür wurde biotinyliertes Concanavalin A (Endkonz. 5 μ g/mL in PBS; Sigma-Aldrich) für 1 h auf Eis mit den lebenden Zellen inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschen der Zellen (5-mal, 1 min) mit eiskaltem PBS. Danach wurden die Zellen mit einem eiskalten, zu gleichen Teilen aus Aceton und Methanol bestehenden Gemisch fixiert und permeabilisiert. Anschließend erfolgte wieder ein Waschschrift (3-mal, 5 min mit PBS, RT). Zur Minimierung der unspezifischen Bindung des primären Antikörpers wurden die Zellen als nächstes für 60 min mit Pferdeserum in PBS (Endkonz. 5 %; Biochrom) inkubiert. Die darauf folgende Inkubation des primären Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4 °C. Das Lösen der Antikörper, sowie das des Alexa Fluor 633 markierte Streptavidin (s. u.; Molecular Probes) erfolgte stets in 5 %-iger Pferdeserumlösung (in PBS, Biochrom). Da bis zum Ende der Arbeit keine gegen die hier verwendeten Bittergeschmacksrezeptoren gerichteten spezifischen Antikörper zur Verfügung standen, wurde ein gegen den C-terminalen HSV-Epitop (entsprechend 2.1.8) gerichteter monoklonaler IgG Antikörper aus Maus (Novagen Merck KGaA, Darmstadt, Lot M00012416 und M00109134) in einer Verdünnung von 1:15,000 verwendet. Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal mit PBS (RT) gewaschen und

anschließend für 45–60 min. mit 5 %-iger Pferdeserumlösung (in PBS, Biochrom) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach erfolgte die Inkubation im Dunkeln mit dem sekundären Antikörper (Alexa Fluor 488 Anti-Maus IgG aus Ziege, Molecular Probes) in einer Verdünnung von 1:2000, zusammen mit dem Alexa Fluor 633 markiertem Streptavidin (Molecular Probes) in einer Verdünnung von 1:1000. Anschließend wurde erneut dreimal für 5 min mit PBS gewaschen (RT). Zum Schluss wurden vorhandene Salze durch waschen mit ddH₂O entfernt und die Deckgläschen mittels Fluorescence Mounting Medium (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) auf Objektträger fixiert. Diese mussten dann für mind. 14 h bei 4 °C aushärten bevor sie ausgewertet werden konnten.

2.5.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die Analyse der fluoreszenzmarkierten Zellen erfolgte an einem inversen konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica TCS SP2, Leica Microsystems) mit Laserlichtquelle und dazugehöriger Software (Leica Confocal Software 2.61, Leica Microsystems). Die Anregung erfolgte für das Alexa Fluor 488 markierte HSV-Epitop bei 488 nm mit einem Argon-Laser (Detektion bei 500-530 nm) und für die mit Alexa Fluor 633 markierte Zellmembran bei 633 nm mit einem Helium-Neon-Laser (Detektion bei 670-720 nm). Die Aufnahmen erfolgten parallel unter Verwendung eines 40-fachen Objektivs, eines 1.5-fachen elektronischen Zooms und hatten eine Auflösung von 1024 x 1024 Bildpunkten. Abschließend erfolgte eine Bearbeitung der Bilder mittels CorelDRAW Graphics Suite - Version 12.0 (Corel Corporation) im Hinblick auf Kontrast und Helligkeit.

2.5.3 Bestimmung der Expressionsrate anhand von immunzytochemischen Bildern

Um die Expressionsrate von Bittergeschmacksrezeptoren, -rezeptormutanten und -rezeptorchimären zu bestimmen, wurden mindestens zwei Bilder pro Konstrukt mit einem abgebildeten Bereich von je ca. 74.000 µm² ausgezählt. Das Zählen der Zellen erfolgte mittels Image J 1.45i (*Open-Source-Software*) und der enthaltenen *Cell-Counter*-Funktion als jeweils mind. eine Wiederholung pro Konstrukt. Die Expressionsrate errechnet sich als Quotient der positiven Zellen zur Gesamtzellzahl und wurde in Prozent angegeben.

2.6 *In-silico*-3D-Modellierung von Bittergeschmacksrezeptoren

Die Modellierung des hTAS2R10-Rezeptor-Modells erfolgte als sogenanntes *homology modeling* auf der Basis der 3D-Kristallstruktur des fotoaktivierten Rinderrhodopsins (DOI:10.2210/pdb2i37/pdb) (Salom *et al.* 2006). Als erstes wurde die Datei mit der Ausgangssequenz des Rinderrhodopsins mittels der in Maestro 8.0.038 und 9.1.207 (Schrödinger) enthaltenen *Protein-Preparation-Wizard*-Funktion bearbeitet, um u. a. den dort enthaltenen Liganden zu entfernen, da dieser bei der Berechnung der 3D-Struktur stört. Außerdem wurde die Aminosäuresequenz des hTAS2R10 mit der des Rinderrhodopsins abgeglichen und die potentiellen Transmembranbereiche des hTAS2R10 an die des Rhodopsins so angepasst, dass sich Lücken durch das *Alignment* nur in den potentiellen intra- bzw. extrazellulären Schleifen des hTAS2R10 befänden. Das *Alignment* befindet sich im Anhang als Abb. 47 S. 155. Die endgültige Berechnung der Transmembrandomänen erfolgte durch Anat Levit (*The Hebrew University of Jerusalem*) mittels Espresso-(3D coffee)-Algorithmus (T-Coffee server <http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi>). Zur Berechnung der 3D-Struktur des hTAS2R10 auf Basis des Rhodopsins wurde Maestro 8.0.038 und 9.1.207 (Schrödinger) und das darin enthaltene Struktur-Vorhersage-Programm *Prime* benutzt. Die Berechnung erfolgte auf Basis des zu Anfang beschriebenen *Alignments*, nach den vom Programm vorgegebenen Parametern, als *Comparative Modeling*. Abschließend wurden die extra- und intrazellulären Schleifen einem *Refinement* zur Energieminimierung unterzogen.

Das Agonisten-*Docking* als *Flexible-Docking*, sowie die Modellierung des hTAS2R10 auf Basis des β 2-adrenergen Rezeptors (DOI:10.2210/pdb3sn6/pdb) (Rasmussen *et al.* 2011) wurde von Anat Levit (*The Hebrew University of Jerusalem*) mittels Discovery-Studio-3.1 Software (Accelrys Inc.; San Diego; USA) durchgeführt. Das *Alignment* zwischen dem hTAS2R10 und dem β 2-adrenergen Rezeptor wurde mittels dem Espresso-(3D coffee)-Algorithmus erstellt und manuell angepasst. Das entsprechende *Alignment* zwischen der Modellvorlage β 2-adrenergen Rezeptor und dem hTAS2R10 ist in Abb. 48 abgebildet. Das Modell wurde unter Verwendung des *Modeller-Scripts*, enthalten in der Discovery Studio 3.1 Software (Accelrys Inc.), von Anat Levit modelliert und von ihr einer Verfeinerungsprozedur unterzogen. Hierfür wurde die Energie des Rezeptormodells unter Verwendung des *Smart Minimizer* Algorithmus und *CHARMM force field* (Brooks *et al.* 2009), welche in Discovery Studio 3.1 enthalten sind, minimiert. Anschließend erfolgte eine Verfeinerung der Seitenketten durch das *SCWRL4*-Programm (Krivov *et al.* 2009), gefolgt von einer weiteren

Energieminimierung. In diesem Modell wurde, als Voraussetzung für das Agonisten-*Docking*, die potentielle Bindungstasche unter Verwendung des *Q-SiteFinder*-Servers (Laurie *et al.* 2005) identifiziert. Das Agonisten-*Docking* für Strychnin, Parthenolid und Denatoniumbenzoat wurde von Anat Levit mittels des „*Flexible-Docking*“-Algorithmus, enthalten in Discovery Studio 3.1, durchgeführt (Koska *et al.* 2008). Für das *Docking* wurde eine Sphäre von 13 Å um die Aminosäureposition W88^{3.32} als Bindungsregion definiert. Den Seitenketten der Aminosäurepositionen S85^{3.29}, W88^{3.32}, V89^{3.33}, N92^{3.36}, Q93^{3.37}, N143^{4.58}, K174^{5.39}, Q175^{5.40}, L178^{5.43}, Y239^{6.51}, M263^{7.39} und T266^{7.42} waren dabei beweglich. Alle Agonisten-*Dockings* wurden ohne extra- und intrazelluläre Schleifen durchgeführt (Yarnitzky *et al.* 2010). Der Rezeptor-Agonisten-Komplex wurde einer Energieminimierung nach dem *adopted basis Newton-Raphson* (ABNR)-Algorithmus mit maximal 500 Schritten unterzogen. Die Modellierung der 3D-Struktur des mTas2r105 erfolgte entsprechend der oben beschriebenen Berechnung der 3D-Struktur für den hTAS2R10. Mittels Maestro 9.1.207 wurde hier die Struktur des mTas2r105 auf Basis der 3D-Struktur des hTAS2R10 (basierend auf dem β 2-adrenergen Rezeptor) als einfache 3D-Struktur ohne weitere Energieminimierung berechnet. Das entsprechende *Alignment* zwischen den Rezeptoren befindet sich im Anhang (Abb. 49). Das 3D-Modell des hTAS2R46 mit dem gedocktem Strychninmolekül (Brockhoff *et al.* 2010) wurde von Maik Behrens (DIfE) zur Verfügung gestellt.

Zur Vergleichbarkeit der Positionen zwischen den Rezeptoren wurde in dieser Arbeit die Nomenklatur nach Ballesteros und Weinstein (Ballesteros *et al.* 1995) verwendet. Die Bestimmung der am höchsten konservierten Positionen wurde von Anat Levit (*The Hebrew University of Jerusalem*) durchgeführt. Das *Alignment* aller Bittergeschmacksrezeptoren, sowie des bovinen Rhodopsins, des auf β 2-adrenergen Rezeptors, des β 1-adrenergen Rezeptors und des Adenosine_{A2A}-Rezeptors, welche der Bestimmung zu Grunde liegen, ist im Anhang abgebildet (Abb. 50). Zur Erstellung des *Alignments* wurde der Espresso-(3D coffee)- Algorithmus verwendet. Die höchstkonservierten Positionen (X.50) für den hTAS2R10 sind folgende:

- 1.50 N24
- 2.50 R54
- 3.50 Y106
- 4.50 F135
- 5.50 F185
- 6.50 L238
- 7.50 S274

In dieser Arbeit wurde ausschließlich der Einbuchstabencode für Aminosäuren verwendet. Eine entsprechende Übersicht befindet sich im Anhang in Tab. 20.

Das Erstellen aller dreidimensionalen Abbildungen erfolgte mittels Pymol 1.4 (Schrödinger).

2.7 Statistische Auswertung der Daten

Alle Mittelwertberechnungen und Berechnungen der Standardabweichungen für die Amplitudenhöhen wurden mittels der entsprechenden Funktionen in Excel (Microsoft Office 2003; Microsoft) durchgeführt. Die EC_{50} -Mittelwerte wurden mittels GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software) berechnet. Der Vergleich der E_{50} -Werte gegen den jeweiligen Wildtyprezeptor erfolgte stets als *One-way*-ANOVA parameterfreier statistischer Test (Kruskal-Wallis-Test, H-Test) (Kruskal *et al.* 1952) und als *Dunns post-hoc* Test bei 95 % Konfidenzintervall mit GraphPad Prism.

Die statistische Betrachtung der Amplituden der Dosis-Wirkungs-Kurven erfolgte auf Grund der großen Datensätze als *One-way*-ANOVA und *Tukey post-hoc*-Test bei 95 % Konfidenzintervall auch mit GraphPad Prism.

Die Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung für die Expressionsrate von Rezeptoren, deren Mutanten und Chimären erfolgte mit Excel (Microsoft Office 2003; Microsoft). Der Vergleich der Expressionsraten erfolgte als *One-way*-ANOVA und *Tukey post-hoc*-Test bei 95 % Konfidenzintervall auch mit GraphPad Prism.

3. Ergebnisse

Im Folgenden wird die Kartierung der Bindungstasche des humanen Bittergeschmacksrezeptors hTAS2R10 mit Hilfe der 3D-*in-silico*-Rezeptormodellierung dargestellt. Den Nutzen und die Vorhersagekraft dieser Methode zeigen die Veröffentlichung in neuester Zeit für die Rezeptoren hTAS2R1 (Upadhyaya *et al.* 2010; Dai *et al.* 2011; Singh *et al.* 2011), -R16 (Sakurai *et al.* 2010a), -R38 (Biarnes *et al.* 2010) und -R46 (Brockhoff *et al.* 2010). Die mögliche Interaktion des Rezeptors mit einer kleinen Agonistenauswahl wurde mittels molekularen Agonisten-*Dockings* vorhergesagt. Die Verifizierung des Modells und des späteren molekularen *Dockings* erfolgte mittels Mutagenese und pharmakologischen Untersuchungen. Die gewonnenen Erkenntnisse wurden auf den mTas2r105, einem zum hTAS2R10 sehr homologen Rezeptor der Maus, und dem hTAS2R46, einem Rezeptor mit überlappendem Agonistenspektrum (Meyerhof *et al.* 2010), übertragen. Es wurde untersucht, ob diese drei Rezeptoren sich in ihrem Bindungsmodus unterscheiden, was Rückschlüsse über deren evolutionäre Entwicklung ermöglichen sollte.

3.1 Kartierung der hTAS2R10-Bindungstasche

3.1.1 3D-*in-silico*-Modellierung des hTAS2R10 auf Basis des Rinderrhodopsins

Die Analyse der Bindungstasche des bereits deorphanisierten humanen Bittergeschmacksrezeptors hTAS2R10 (Bufe *et al.* 2002; Meyerhof *et al.* 2010) startete mit der *In-silico*-Modellierung des Rezeptors auf Basis der Struktur des Rinderrhodopsins (entsprechend Abschnitt 2.6). Anschließend wurden die extra- und intrazellulären Schleifen einem *Refinement* zur Energieminimierung unterzogen. Das fertige 3D-Modell des hTAS2R10 ist in Abb. 11 (A) abgebildet. Als Vergleich ist auch die Struktur des Rinderrhodopsins (B) abgebildet, die die Basis des hTAS2R10-Modells bildete.

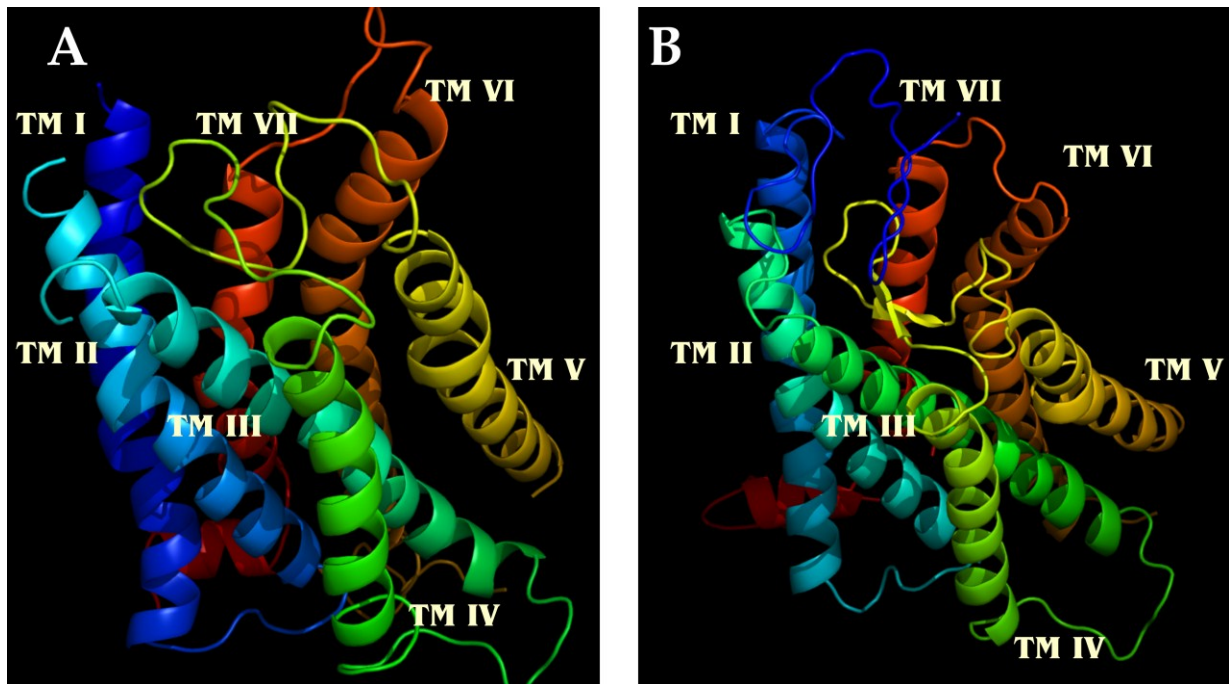


Abb. 11: *In silico* 3D-Modell des hTAS2R10 (A) im Vergleich zur 3D-Struktur des Rinderrhodopsins (B) Das 3D-Homologiemodell des hTAS2R10 (A) und das Modell der Kristallstruktur des fotoaktivierten Rinderrhodopsins(B) als angekippte Seitenansicht. Die Transmembrandomänen (TM) sind mit römischen Zahlen nummeriert und in einer Regenbogenfärbung dargestellt. Die extrazellulären Schleifen befinden sich im oberen Teil, die intrazellulären Schleifen im unteren Teil der Rezeptoren.

3.1.2 Identifizierung der potentiellen Bindungstasche des hTAS2R10

Zur Identifizierung einer möglichen Bindungstasche wurde das 3D-Modell mittels dem Programm Pymol (Schrödinger) betrachtet und, entsprechend der Erkenntnisse zur Bindungstasche des hTAS2R46 (Brockhoff *et al.* 2010), die zweite extrazelluläre Schleife ausgeblendet. Visuell konnte so, wie in der Abb. 12A dargestellt, eine potentielle Bindungstasche im oberen Bereich des Rezeptors identifiziert werden. Ausgehend von der direkt im Zentrum der potentiellen Bindungstasche befindlichen Aminosäure Asparagin 92^{3,36} (Abb. 12 B, rot markiert) wurden alle Aminosäuren im Radius von 6 Å markiert (Abb. 12 C, orange markierte Aminosäuren und D). Die in diesem Radius markierten Positionen sind in Tab. 5 aufgelistet. Der ausgewählte Radius von 6 Å entspricht dem Durchmesser von Strychnin (Daten nicht gezeigt), dem Agonisten mit dem der hTAS2R10 zuerst aktiviert wurde (Bufe *et al.* 2002). Durch die Auswahl von 6 Å konnte sichergestellt werden, dass sich in dem Radius Aminosäure-Positionen befinden die mit Strychnin interagieren könnten. Bei einem kleineren Durchmesser würde die Gefahr bestehen, dass eventuell wichtige Positionen

übersehen werden. Bei einem Radius von 7 \AA würde bereits das Proteinrückgrat tangiert werden, wodurch auch Aminosäuren markiert werden die nicht an der Auskleidung der Bindungstasche beteiligt sind.

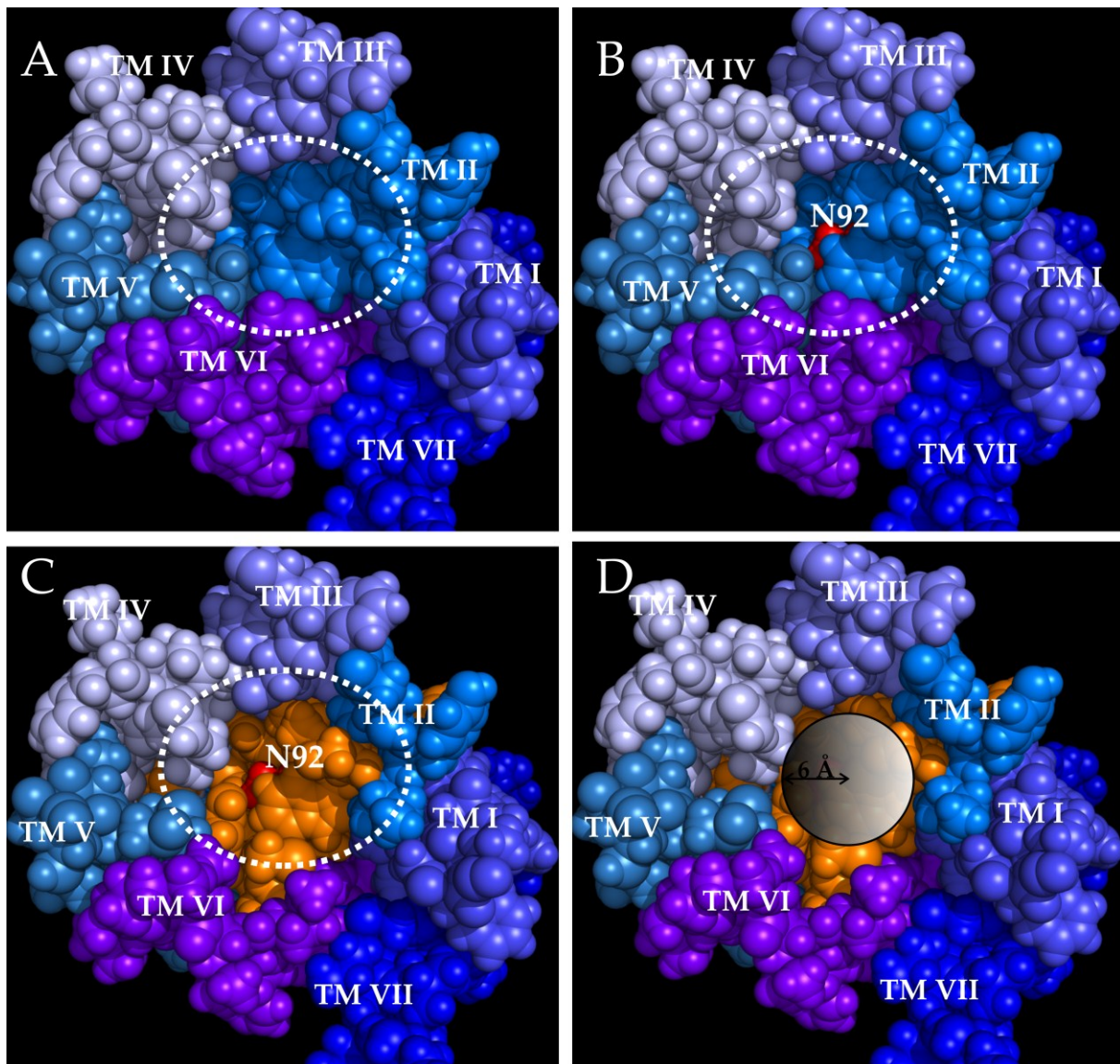


Abb. 12: Potentielle Bindungstasche des hTAS2R10 im Kalottenmodell

(A) Draufsicht auf das Kalottenmodell des hTAS2R10 nach Ausblenden der zweiten extrazellulären Schleife, wodurch die potentielle Bindungstasche (innerhalb des weißen gestrichelten Kreises) sichtbar wurde. In deren Zentrum (B) liegt die zentrale Aminosäure N92^{3,36} (rot), um die alle Aminosäuren in einem Radius von 6 \AA markiert sind (orange, C und Kreis in D). Die Transmembrandomänen (TM) sind in unterschiedlichen Blautönen dargestellt und mit römischen Zahlen nummeriert.

Tab. 5: Aminosäurepositionen im Radius von 6 Å ausgehend von N92

Aufgelistet sind die Aminosäurepositionen im Umkreis von 6 Å ausgehend von der Aminosäure N in Position 92^{3,36}. Zusätzlich ist auch die dazugehörige Positionierung laut der Nomenklatur nach Ballesteros und Weinstein (B.und W. Nr.) aufgelistet.

Aminosäureposition	B.und W. Nr.	Aminosäureposition	B.und W. Nr.
S53	2.49	M96	3.40
L57	2.53	W97	3.41
S85	3.29	I183	5.48
F87A	3.31	F232	6.44
W88	3.32	F236	6.48
V89	3.33	Y239	6.51
I90	3.34	M263	7.39
G91	3.35	T266	7.42
N92	3.36	A267	7.43
Q93	3.37	Y269	7.45
S94	3.38		
S95	3.39		

Im nächsten Schritt wurden die Positionen im Hinblick auf mögliche potentielle Agonisten-Interaktion weiter eingegrenzt. Dafür wurden die Positionen im 3D-Modell auf ihre Orientierung hin überprüft und alle Aminosäurepositionen aussortiert, deren Seitenketten eine Orientierung weg von der potentiellen Bindungstasche aufweisen oder unterhalb der Position N92^{3,36} liegen und somit keine Interaktion mit potentiellen Agonisten ermöglichen würden (entsprechend Abb. 13 rote Aminosäuren). An einer möglichen Interaktion können die folgenden Positionen beteiligt sein: S85^{3,29}, W88^{3,32}, V89^{3,33}, N92^{3,36}, Q93^{3,37}, I183^{5,48}, F236^{6,48}, Y239^{6,51}, M263^{7,39} und T266^{7,42} (Abb. 13 grüne Aminosäuren). Der mögliche Aufenthaltsraum des potentiellen Agonisten ist in Abb. 13 als weiße Gitterform dargestellt und wurde automatisch vom Programm Pymol (Schrödinger) erzeugt. Die so identifizierten Aminosäurepositionen wurden einzeln zu Alanin mutiert und die resultierenden Rezeptormutanten auf eine mögliche Änderung in ihrem pharmakologischen Verhalten analysiert, sowie immunzytochemisch charakterisiert. Die Ergebnisse dieser Analyse werden im nächsten Abschnitt dargestellt.

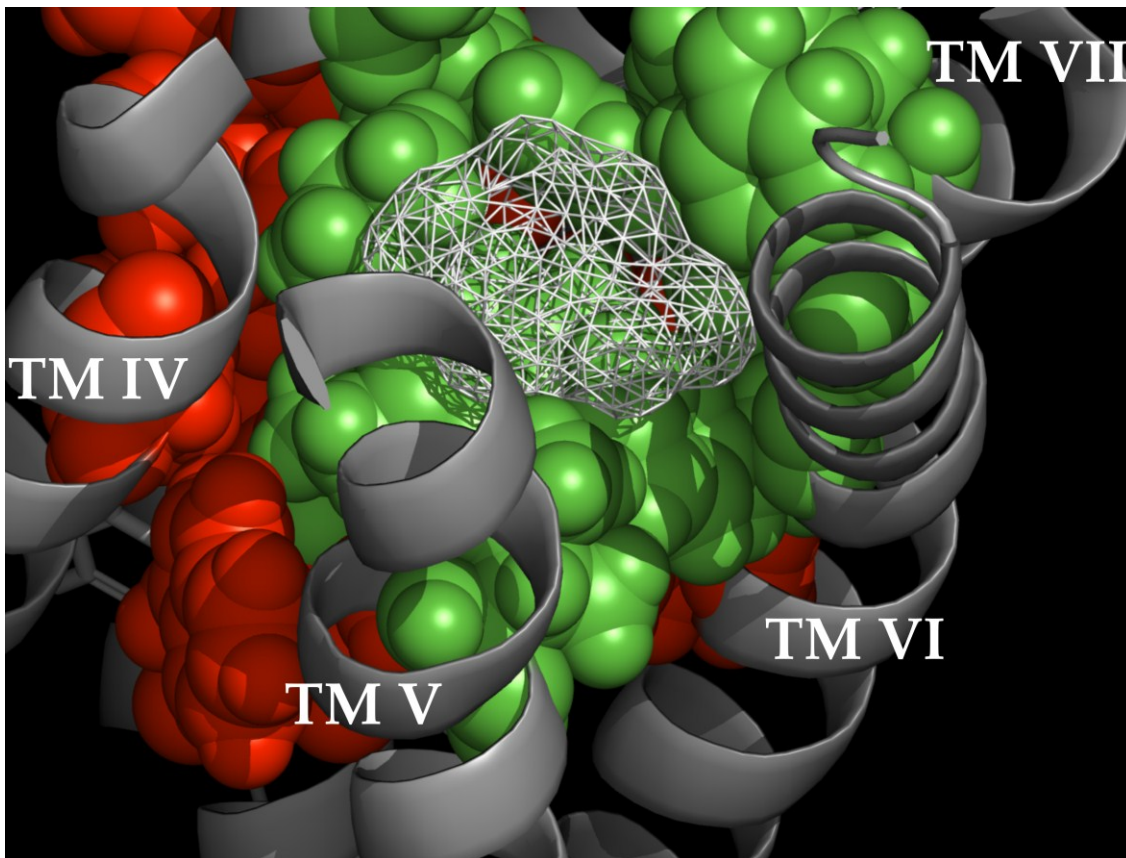


Abb. 13: Positionen im 3D-hTAS2R10-Modell mit Möglichkeit zur Agonisten-Interaktion

Die grün markierten Aminosäuren im inneren Bereich der potentiellen Bindungstasche haben Zugang zur potentiellen Bindungshöhle (weiße Gitterform). Die rot markierten Aminosäuren im äußeren Bereich sind zu weit entfernt oder besitzen die falsche Orientierung, um Zugang zur möglichen Bindungshöhle zu haben. Die Transmembrandomänen (TM) sind als graue Schleifen abgebildet und mit römischen Zahlen nummeriert. Die weiße Gitterform ist die von dem Programm Pymol (Schrödinger) gefundene mögliche Bindungshöhle des Rezeptors.

3.1.3 Charakterisierung potentiell zur Bindungstasche gehörender Aminosäurepositionen nach Alanin-Mutagenese

Die S85^{3.29}, W88^{3.32}, V89^{3.33}, N92^{3.36}, Q93^{3.37}, I183^{5.48}, F236^{6.48}, Y239^{6.51}, M263^{7.39} und T266^{7.42} Aminosäurepositionen wurden mittels zielgerichteter, ortsspezifischer Mutagenese (Abschnitt 2.2.4) einzeln zu Alanin mutiert und die Mutanten-Konstrukte durch Sequenzieren auf ihre Richtigkeit überprüft (Abschnitt 2.2.12). Mit diesen Rezeptormutanten – sowie dem Ursprungsrezeptor – wurden HEK293T_{Gα16Gust44}-Zellen in 96-Loch-Platten transient transfiziert (Abschnitt 2.3.5). Diese Zellen wurden nach Stimulation mit unterschiedlichen Bittergeschmacksstoffen mittels *Ca-Imaging*-Analyse in einem 96-Loch-Platten-Lesegerät

(Abschnitt 2.4) auf ihre Änderung im intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel gemessen. Die Änderung des Ca^{2+} -Spiegels entspricht dabei der biologischen Antwort auf den Bitter-Stimulus.

Die Auswahl der Bittergeschmacksstoffe erfolgte basierend auf den Untersuchungen für die 2010 von Meyerhof *et al.* veröffentlichte, breit angelegte Suche nach Agonisten für Bittergeschmacksrezeptoren, die bis zur Beginn der Doktorarbeit vorlagen. Neben Strychnin (STR), ein Indolalkaloid und erster identifizierter Agonist für den hTAS2R10 (Bufe *et al.* 2002), wurden zwei weitere Agonisten ausgewählt. Dabei handelte es sich um Parthenolid (PAR), ein Sesquiterpenlacton, sowie um Denatoniumbenzoat (DTB), einer quartären Ammoniumverbindung. Diese drei Agonisten (Abb. 14) können ebenfalls den hTAS2R46 aktivieren (Brockhoff *et al.* 2007), worauf in Abschnitt 3.3 näher eingegangen wird. Im Zuge dieser Arbeit wurden weitere Bittergeschmacksstoffe getestet, die dann in Abschnitt 3.1.4 und 3.2 separat behandelt werden.

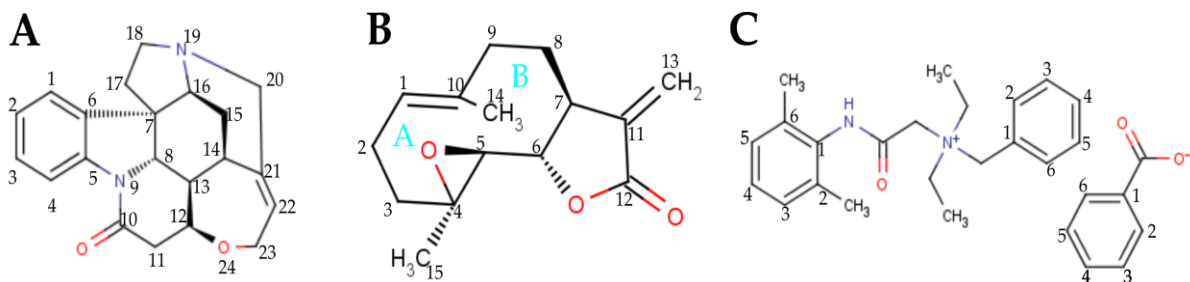


Abb. 14: Struktur der verwendeten Agonisten

Abgebildet sind Strychnin (A), Parthenolid (B) und Denatoniumbenzoat (C) mit ihrer Nummerierung der Kohlenstoffringe nach IUPAC (Moss 1989; Vollhardt *et al.* 2005; Berger *et al.* 2009). Für Parthenolid erfolgte ebenfalls die nach IUPAC vorgeschlagene Benennung der Terpen-Ringe (blaue Buchstaben) (Moss 1989).

Für Denatoniumbenzoat ist bekannt, dass auch das Anion (Benzoat) Bittergeschmacksrezeptoren (hTAS2R14 und -16) aktivieren kann (Behrens *et al.* 2004; Meyerhof *et al.* 2010). Somit musste vor der Messung der Alanin-Mutanten überprüft werden, ob der Bittergeschmacksrezeptor hTAS2R10 von Denatonium oder Benzoat aktiviert wird. Wie in Abb. 15 zu sehen, wird der hTAS2R10 nur durch Denatonium jedoch nicht durch Benzoat in dem gewählten Konzentrationsbereich (3-1000 μM) aktiviert. Der EC_{50} -Wert für hTAS2R10, gemessen mit Denatoniumsaccharinat, beträgt 54 (+/-14) μM (n= 3). Im Vergleich zu Denatoniumbenzoat (59 +/-30 μM n=58) konnte kein Unterschied gemessen werden. Alle weiteren Messungen des hTAS2R10 und dessen Mutanten konnten entsprechend mit Denatoniumbenzoat durchgeführt werden.

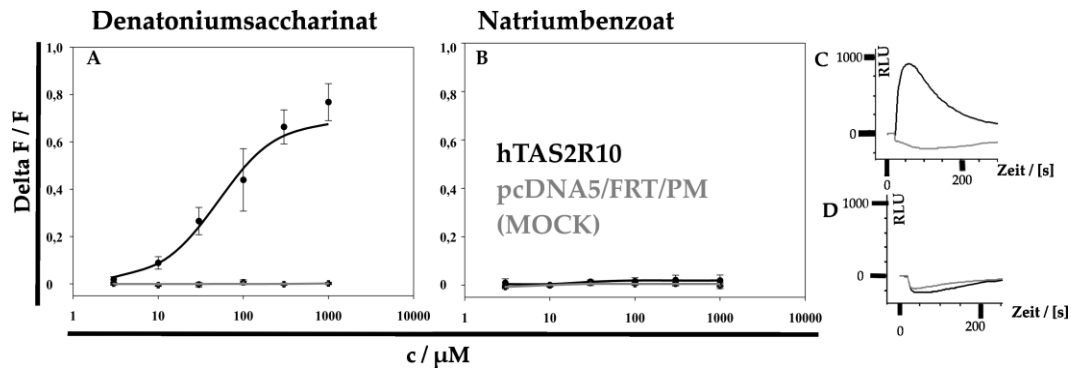


Abb. 15: Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurve von hTAS2R10 gemessen mit Denatoniumsaccharinat und Natriumbenzoat

A+B: Gemessen wurden mit hTAS2R10 (schwarz, Kreise) und pcDNA5/FRT/PM (MOCK, grau, Kreuze) transfizierte Zellen, die mit Denatoniumsaccharinat (3-1000 μM , A) und Natriumbenzoat (3-1000 μM , B) stimuliert wurden. Die Signale ($\Delta F/F$) sind aufgetragen gegen die gemessenen Konzentrationen als Dosis-Wirkungs-Kurven (stets Mittelwerte wiederholte Experimente).

C+D: Die Signale bei Stimulation mit 1000 μM Denatoniumsaccharinat (C) und 1000 μM Natriumbenzoat (B) und die resultierende intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung von hTAS2R10 (schwarz) im Vergleich zu MOCK (grau) transfizierten Zellen. Beides stellen die im FLIPR^{Tetra} gemessenen Spuren ohne MOCK-Korrektur als Einzelmessung dar, mit X-Achse: Zeit in s und Y-Achse: relative Lichteinheiten (RLU).

Die Analyse der Alanin-Mutanten, sowie des hTAS2R10-Wildtyps und einer Negativkontrolle (pcDNA5 /FRT/PM, „MOCK“) erfolgte, wie oben bereits beschrieben, mit den Agonisten Strychnin (0,3-300 μM), Parthenolid (0,3-300 μM) und Denatoniumbenzoat (1-1000 μM) und wurde in Form von Dosis-Wirkungs-Kurven dargestellt (Abb. 16), basierend auf mehreren Wiederholungsexperimenten. Die Resultate ließen sich anhand der Schwellenwerte (SW) in Tab. 6 in drei Gruppen (entsprechend Abb. 16) zusammenfassen:

1. Gruppe 1 (A): keine statistisch signifikante Aktivierung nach Mutation zu Alanin (hTAS2R10-W88^{3.32}A, -N92^{3.36}A, -Q93^{3.37}A, -I183^{5.48}A, -F236^{6.48}A, -Y239^{6.50}A, -M263^{7.39}A)
2. Gruppe 2 (B): Aktivierung verschlechtert zum Wildtyp nach Mutation zu Alanin (hTAS2R10- V89^{3.33}A, -T266^{7.45}A)
3. Gruppe 3 (C): agonistenselektive veränderte Aktivierung nach Mutation (hTAS2R10-S85^{3.29}A)

Als Schwellenwert in Tab. 6 wurde die Konzentration angegeben, bei der das gemessene gemittelte Calcium-Signal ($\Delta F/F$) der Rezeptormutanten exprimierenden Zellen nach statistischer Auswertung (*One-way-ANOVA* und *Tukey-post-hoc-Test* bei 95 %

Konfidenzintervall, entsprechend Abschnitt 2.7) signifikant höher, als das gemittelte Signal der pcDNA5/FRT/PM (Leerkontrolle / MOCK) exprimierenden Zellen war. Neben den Schwellenwerten sind in Tab. 6 auch die EC_{50} -Mittelwerte aufgelistet. Die statistischen Auswertungen der EC_{50} -Mittelwerte erfolgten stets als Kruskal-Wallis-Test, verglichen mit den EC_{50} -Werten des Wildtyp(WT)-Rezeptors (entsprechend Abschnitt 2.7). Als signifikant unterschiedlicher EC_{50} -Mittelwert zeigte sich lediglich der EC_{50} -Wert für die hTAS2R10-S85^{3.29}A-Mutante gemessen mit Parthenolid im Vergleich zum WT-Rezeptor. Die Rezeptormutante hTAS2R10-S85^{3.29}A zeigte für diesen Stimulus ebenfalls eine statistisch signifikant größere maximale Amplitude als die des WT-Rezeptors (Tab. 6). Die statistische Auswertung der maximalen Amplituden erfolgte stets als *One-way*-ANOVA und *Tukey post-hoc*-Test bei 95 % Konfidenzintervall im Vergleich zum hTAS2R10-WT-Rezeptor. Die maximale Amplitude der hTAS2R10-S85^{3.29}A-Mutante für den Strychnin-Stimulus war signifikant kleiner; die für den Denatoniumbenzoat-Stimulus unverändert im Vergleich zu den maximalen Amplituden des Wildtyprezeptors. Die Rezeptormutante hTAS2R10-V89^{3.33} zeigte für die Stimulation mit Strychnin und Denatoniumbenzoat und die Rezeptormutante hTAS2R10-T266^{7.42}A für die Stimulation mit Parthenolid eine signifikant kleinere maximale Amplitude als die des WT-Rezeptors. Die in Tab. 6 in grauen Zahlen aufgelisteten maximalen Amplituden waren nicht signifikant größer als die der MOCK-Kontrolle.

Tab. 6: Zusammenstellung der gemessenen Schwellenwerte und berechneten EC₅₀-Werte und Expressionsrate für die Alanin-Rezeptor-Mutanten

Aufgelistet sind die Alanin-Mutanten und der hTAS2R10-Wildtyp (WT) mit ihren Schwellenwerten (SW) in μM , ihren maximalen Amplituden (Max. Ampl.) und dem Mittelwert der EC₅₀-Werte in μM , inklusive der Standardabweichung für die entsprechenden Agonisten. Die Anzahl der Messungen wird mit „n“ angegeben. Die in grau dargestellten maximalen Amplituden waren nicht signifikant höher als die der MOCK-Kontrolle. Die statistische Auswertung der maximalen Amplituden erfolgte als *One-way*-ANOVA und *Tukey post-hoc*-Test bei 95 % Konfidenzintervall und stets im Vergleich zum WT-Rezeptor (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Die statistische Auswertung der EC₅₀-Werte erfolgte als Kruskal-Wallis-Test im Vergleich zum WT-Rezeptor. Außerdem sind die Expressionsraten der Alanin-Rezeptormutanten und des hTAS2R10-Wildtyps (WT) in % aufgelistet. Die statistische Auswertung der Expressionsraten erfolgte ebenfalls als *One-way*-ANOVA und *Tukey post-hoc*-Test bei 95 % Konfidenzintervall, stets im Vergleich zum WT-Rezeptor.

	Strychnin				Parthenolid			
hTAS2R10-	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC50 / [μM]	n	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC50 / [μM]	n
WT	3	0,522 (+/-0,118)	33 (+/-24)	60	10	0,466 (+/-0,140)	69 (+/-26)	54
-S85A	30	0,315 (+/-0,088) ***	45 (+/-39)	13	1	0,824 (+/-0,208) ***	20 (+/-9) ***	15
-W88A	-	-	-	4	-	-	-	3
-V89A	100	0,249 (+/-0,057) ***	-	4	-	0,183 (+/-0,046) **	-	4
-N92A	-	-	-	3	-	-	-	3
-Q93A	-	-	-	3	-	-	-	3
-I183A	-	-	-	4	-	-	-	4
-F236A	-	0,088 (+/-0,048) ***	-	3	-	0,075 (+/-0,043) ***	-	3
-Y239A	-	-	-	4	-	-	-	4
-M263A	-	0,062 (+/-0,020) ***	-	4	-	-	-	4
-T266A	-	0,093 (+/-0,050) ***	-	4	300	0,227 (+/-0,117) *	-	4
	Denatoniumbenzoat				Expressionsrate			
hTAS2R10-	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC50 / [μM]	n	MW / [%]	n		
WT	10	0,639 (+/-0,188)	59 (+/- 30)	58	13 (+/-7,9)	12		
-S85A	30	0,548 (+/-0,166)	93 (+/-41)	13	12 (+/-6,2)	2		
-W88A	-	-	-	3	12 (+/-6,7)	4		
-V89A	300	0,341 (+/-0,084) *	162 (+/-49)	4	5 (+/-0,8)	2		
-N92A	-	-	-	3	8 (+/-2,8)	2		
-Q93A	-	-	-	3	5 (+/-2,8)	2		
-I183A	-	-	-	4	4 (+/-2,3)	4		
-F236A	-	0,111 (+/-0,059) ***	-	3	6 (+/-2,2)	2		
-Y239A	-	-	-	4	7 (+/-4,2)	4		
-M263A	-	-	-	4	5 (+/-1,7)	4		
-T266A	-	0,276 (+/-0,122) **	-	4	6 (+/-2,4)	2		

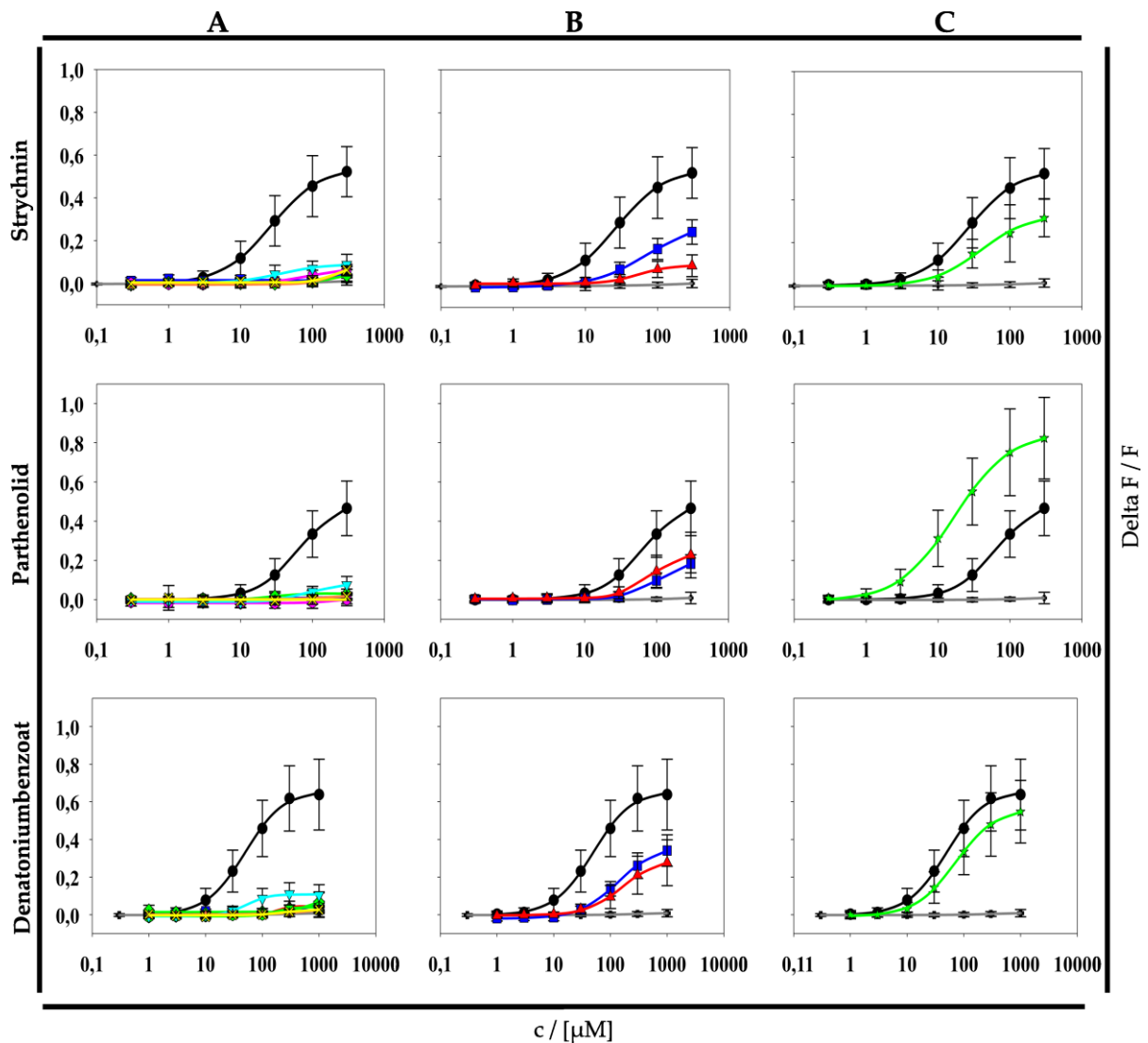


Abb. 16: Pharmakologische Charakterisierung der Alanin-Mutanten

Die Alanin-Rezeptormutanten und hTAS2R10-Wildtyp (A-C) exprimierenden Zellen wurden mit Strychnin (0,3-300 μM), Parthenolid (0,3-300 μM) und Denatoniumbenzoat (1-1000 μM) gemessen und die resultierenden $\Delta F/F$ -Werte (Y-Achse) gegen die Agonistenkonzentration (X-Achse) aufgetragen. Die Graphen stellen die Ergebnisse wiederholter Experimente dar. Der hTAS2R10-Wildtyp ist stets als schwarze Kreise und Linie, die pcDNA5 FRT/PM-Kontrolle als graue Kreuze und Linie abgebildet. Die Ergebnisse der Alanin-Rezeptormutanten wurden wie folgt gruppiert: Gruppe 1 (A): hTAS2R10-W88^{3,32}A (rot), -N92^{3,36}A (blau), -Q93^{3,37}A (grün), -I183^{5,48}A (pink), -F236^{6,48}A (cyan), -Y239^{6,51}A (orange) und -M263^{7,39}A (gelb); Gruppe 2 (B): -V89^{3,33}A (blau); -T266^{7,45}A (rot); Gruppe 3 (C): -S85^{3,29}A (grün)

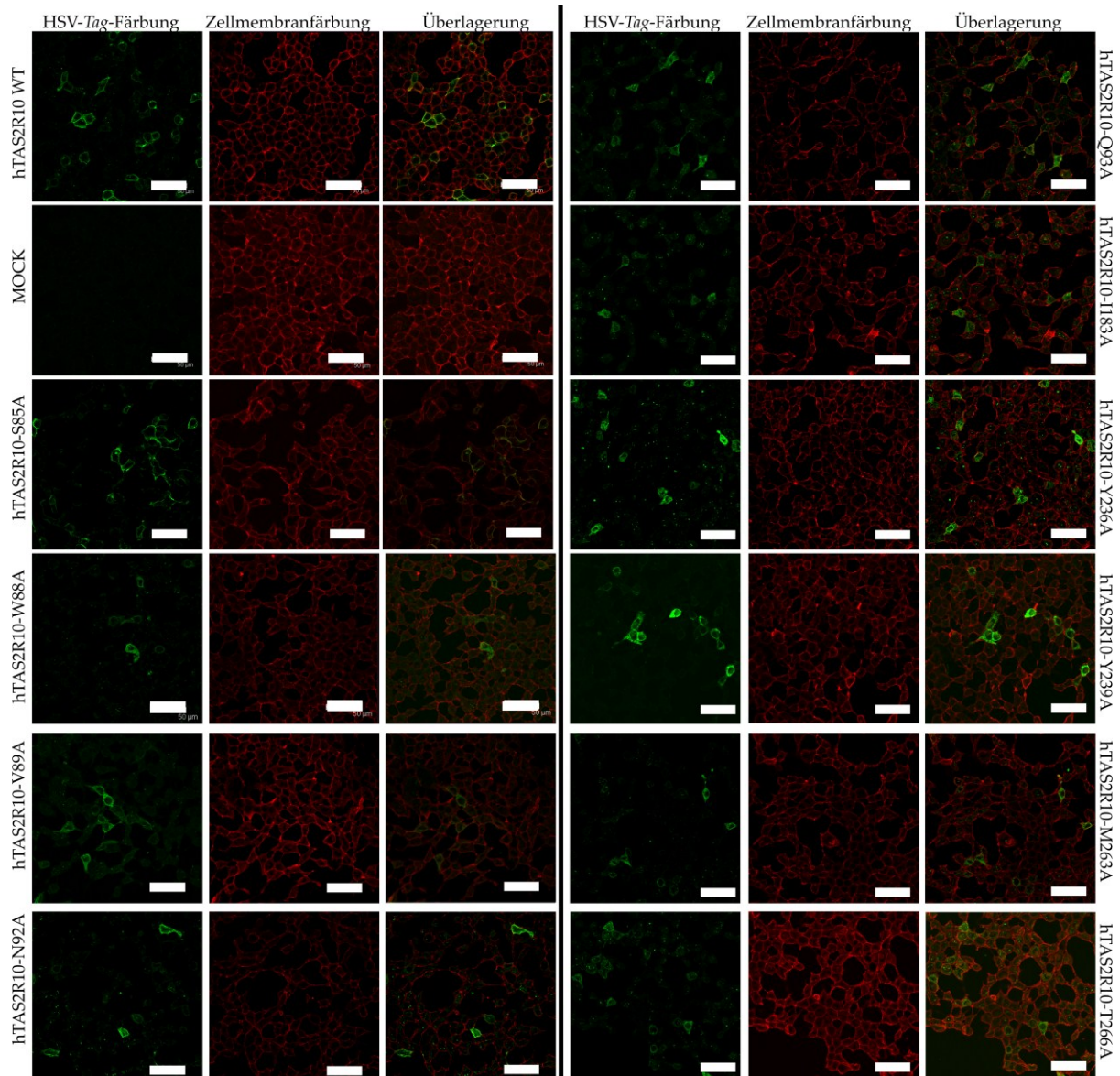


Abb. 17 Immunzytochemische Charakterisierung der Alanin-Mutanten

hTAS2R10, MOCK und Rezeptormutanten transient exprimierende HEK293T_{Gα16Gust44}-Zellen wurden fixiert und der C-terminale HSV-Epitop (grün), sowie die Zellmembran (rot) nachgewiesen. Die Auswertung der Färbung erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Abgebildet sind der Wildtyprezeptor, die MOCK-Kontrolle und die Alanin-Mutanten. Die Bilder wurden mit folgenden Parametern aufgenommen: 40fach Objektiv, 1,5facher digitale Vergrößerung, Maßstab (weißer Balken): 50 μm.

Zusätzlich zur pharmakologischen Charakterisierung mittels *Ca-Imaging*-Analyse, wurden die Alanin-Rezeptormutanten auch immunzytochemisch charakterisiert (entsprechend Abschnitt 2.5). HEK293T_{Gα16Gust44}-Zellen wurden auf 24-Loch-Platten ausgesät und transient mit Bittergeschmacksrezeptor-Wildtyp und -rezeptormutanten transfiziert. Zum Nachweis der Expression wurde der C-terminale HSV-Epitop mittels einem aus Maus stammenden monoklonalen IgG-Anti-HSV-Antikörper und Anti-Maus-Antikörper konjugiert mit Alexa Fluor 488 (grün) markiert (Abb. 17). Außerdem wurde die Zellmembran mittels

Concanavalin-A-Membranfärbung nachgewiesen, um die Lokalisation des Rezeptors (membranständig oder zytosolisch) beurteilen zu können. Hier erfolgte eine Färbung des biotinkonjugierten Concanavalin A mittels Alexa Fluor 633 (rot) markiertem Streptavidin (Abb. 17). Die Analyse der fluoreszenzmarkierten Zellen erfolgte durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie. Eine exemplarische Zusammenstellung der immunzytochemischen Färbung der Alanin-Mutanten-Gruppen 1-3, sowie der des hTAS2R10-Wildtyps und der MOCK-Kontrolle (pcDNA5/FRT/PM) sind in Abb. 17 dargestellt. Die Expression der Rezeptormutanten unterschied sich nur gering von der des hTAS2R10-Wildtyprezeptors. Die Lokalisation des Rezeptors und der Rezeptormutanten war überwiegend membranständig. Des Weiteren wurde die Expressionsrate im Vergleich zum Wildtyprezeptor bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 dargestellt. Dafür wurde die Anzahl der Rezeptorwildtyp- bzw. Rezeptormutanten exprimierenden Zellen durch auszählen ermittelt und ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl im ausgezählten Bereich gesetzt. Die Angabe der Expressionsrate erfolgte in Prozent. Die statistische Auswertung erfolgte als *One-way*-ANOVA und *Tukey post-hoc*-Test bei 95 % Konfidenzintervall im Vergleich zum hTAS2R10-WT-Rezeptor. Wie aus Tab. 6 ersichtlich, unterscheiden sich Wildtyprezeptor und Mutanten nicht signifikant in ihrer Expressionsrate. Das nachgewiesene zum hTAS2R10 unterschiedliche pharmakologische Verhalten der Mutanten (entsprechend Tab. 6 und Abb. 16) beruhte daher nicht auf Unterschiede im Expressionsmuster oder der Expressionsrate.

3.1.4 Detaillierte Analyse der Position S85^{3,29} des hTAS2R10

Die Untersuchungen der Alanin-Rezeptormutanten (Abb. 16 und Tab. 6) zeigten, dass die Mutation der Position S85^{3,29} zu Alanin, zu einer auffälligen Änderung im pharmakologischen Verhalten – auf dem Stimulus mit den drei untersuchten Agonisten Strychnin, Parthenolid und Denatoniumbenzoat – führte (entsprechend Abb. 16 C und Tab. 6). So konnte für die Stimulation mit Strychnin eine Herabsetzung der Sensitivität im Vergleich zum Wildtyprezeptor beobachtet werden (Abb. 16C). So sind der Schwellenwert (SW) und der EC₅₀-Wert der Rezeptormutante S85^{3,29}A größer als die des Wildtyprezeptors. Die maximale Amplitude war mit 0,315 (+/-0,088) kleiner als die des WT-Rezeptors (0,522 +/-0,118). Für den Parthenolid-Stimulus konnte eine Verbesserung in der Sensitivität beobachtet werden.

So waren der Schwellenwert mit 1 μM und der EC_{50} -Wert mit 20 \pm 9 μM der S85^{3,29}-Rezeptormutante im Vergleich zum Wildtyprezeptor (EC_{50} -Wert: 69 \pm 26 μM ; SW: 10 μM) kleiner. Die maximale Amplitude der Rezeptormutante war mit 0,824 (\pm 0,208) größer als die des WT-Rezeptors (0,466 \pm 0,140). Die Antwort der Rezeptormutante auf den Denatoniumbenzoat-Stimulus unterschied sich nur im Schwellenwert (30 μM) von der des WT-Rezeptors (10 μM). Diese Agonistenselektivität der Position S85^{3,29} wirft die folgenden Fragen auf:

1. Die S85^{3,29}A-Mutante zeigte eine verringerte Reaktion auf Strychnin. Gibt es möglicherweise Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der OH-Gruppe des Serins (Wasserstoffbrücken-Donor) an Position 85^{3,29} mit Wasserstoffbrücken-Akzeptor-Gruppen im Strychnin, die nach Mutation nicht mehr vorhanden sind?
2. Resultiert die gesteigerte Reaktion auf Parthenolid nach Mutation zu Alanin, aus einer sterisch oder polaren störenden Interaktion zwischen S85^{3,29} und Parthenolid?

Zur Klärung dieser Fragen wurde das Serin an Position 85^{3,29} (Abb. 18A) zu Cystein, Threonin und Valin mutiert. Mit diesen Mutanten wurden HEK293T_{G α 16Gust44}-Zellen transient transfiziert und ihre Reaktion auf Strychnin (STR; 0,3-300 μM), Parthenolid (PAR; 0,3-300 μM) und Denatoniumbenzoat (DTB; 1-1000 μM) mittels *Calcium-Imaging*-Analyse (Abschnitt 2.4) gemessen. Die Dosis-Wirkungs-Kurven dieser Messungen im Vergleich zum Wildtyprezeptor und zur ursprünglichen Alanin-Mutante sind in Abb. 18B abgebildet. Cystein ist eine Aminosäure, die sich von Serin durch ihre funktionelle Gruppe unterscheidet (-OH Gruppe gegen -SH Gruppe). Die beiden funktionellen Gruppen unterscheiden sich in ihren Eigenschaften. So besteht ein Unterschied in der Elektronegativität zwischen den S- und O-Atomen. Deshalb bildet die SH-Gruppe nur schwache Wasserstoffbrückenbindung aus und ist stärker sauer als die OH-Gruppe (Vollhardt *et al.* 2005). Mittels der Mutation zu Cystein sollte eine Aussage über den Einfluss der funktionellen Gruppe getroffen werden. Die Cystein-Mutation führte zu einer signifikanten Verschlechterung der Rezeptoraktivierung nach Stimulation mit allen drei Agonisten (entsprechend Abb. 18B rote Kurven und Tab. 7). Threonin hingegen ist eine Aminosäure, die wie Serin eine OH-Gruppe besitzt, jedoch zusätzlich eine Methylgruppe (entsprechend Abb. 13A). Basierend auf den Ergebnissen aus der Alanin-Mutation (Tab. 6 und Abb. 16G), sollte durch die Mutation zu Threonin geprüft werden, ob die Interaktion zwischen Parthenolid und der Aminosäure in Position 85^{3,29} eine sterische Hinderung ist. Im Gegensatz zur Alanin-Mutante (Abb. 18B, grüne Kurve), die eine

signifikant gesteigerte Aktivierung für Parthenolid zeigte, zeigte die Threonin-Mutante (Abb. 18B, blaue Kurve) für den Parthenolid-Stimulus nur noch eine schwache Aktivierung. Die maximale Amplitude war mit 0,141 (+/-0,106) nicht signifikant höher als die der MOCK-Kontrolle. Der Kurvenverlauf für die Threonin-Mutante (Abb. 18B, blaue Kurve) – aktiviert mit Strychnin – unterscheidet sich nur in einem geringen Maße – jedoch nicht signifikant – vom Wildtyp. Der EC₅₀-Mittelwert für den Strychnin-Stimulus der Threonin-Mutante (17 +/- 3 µM) ist nicht signifikant kleiner als der des Wildtyps (33 +/-24 µM) (Tab. 7). Auch für die maximale Amplitude konnte keine Änderung zu der gemessenen maximalen Amplitude des Wildtyprezeptors beobachtet werden. Nach Stimulation mit Denatoniumbenzoat entsprach die Aktivierung der Threonin-Mutante (EC₅₀-Mittelwert: 74 +/-25 µM), der des Wildtyps (Abb. 18B, schwarze Kurve, EC₅₀-Mittelwert: 59 +/-30 µM) und der der Alanin-Mutante (grüne Kurve, EC₅₀-Mittelwert: 93 +/-41 µM). Dies spiegelt sich ebenfalls in den maximalen Amplituden der beiden Rezeptormutanten und des Rezeptorwildtyps wieder. Bei Valin handelt es sich – im Gegensatz zu Serin (entsprechend Abb. 18A) – um eine größere, unpolare Aminosäure, ähnlich der Aminosäure Threonin, jedoch mit einer zweiten Methylgruppe. Durch die Mutation zu Valin sollte überprüft werden, ob die OH-Gruppe an dieser Stelle für die Interaktion mit Strychnin von Bedeutung ist. Die Mutation zu Valin (Abb. 18B, orangefarbene Kurve und Tab. 7) zeigte eine signifikante Verschlechterung für die Aktivierung nach Stimulation mit allen drei Agonisten.

Zusätzlich zur pharmakologischen Charakterisierung wurden die Mutanten immunzytochemisch charakterisiert. Hierfür wurden die S85-C-, -T-, -V-Rezeptormutanten transient exprimierende Zellen fixiert und der C-terminale HSV-Epitop (grün), sowie die Zellmembran (rot) nachgewiesen. Die Analyse der fluoreszenzmarkierten Zellen erfolgte durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie. Abgebildet sind nur exemplarisch die Bilder der Überlagerung von HSV-Epitop – und die Zellmembranfärbung der C-, T- und V-Mutanten (Abb. 18C). In Tab. 7 sind die Mittelwerte der Expressionsraten im Vergleich zum Wildtyprezeptor und der A-Mutante aufgelistet. Der Wildtyprezeptor und die Mutanten (A, C, T, V) unterscheiden sich weder in der Lokalisation (Abb. 17 und Abb. 18C), noch in der Expressionsrate (Tab. 7) signifikant voneinander.

Tab. 7: Pharmakologische Parameter und Expressionsrate der S85^{3,29}-Mutanten

Aufgelistet sind die S85^{3,29}-Mutanten und der hTAS2R10-Wildtyp (WT) mit ihren Schwellenwerten (SW) in μM , ihrer maximalen Amplituden (Max. Ampl.) und dem Mittelwert der EC₅₀-Werte in μM , inklusive der Standardabweichung für die entsprechenden Agonisten. Die Anzahl der Messungen wird mit „n“ angegeben. Die in grau dargestellten maximalen Amplituden waren nicht signifikant höher als die der MOCK-Kontrolle. Die statistische Auswertung der maximalen Amplituden erfolgte als *One-way*-ANOVA und *Tukey post-hoc*-Test bei 95 % Konfidenzintervall, stets im Vergleich zum WT-Rezeptor (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Die statistische Auswertung der EC₅₀-Werte erfolgte als Kruskal-Wallis-Test im Vergleich zum WT-Rezeptor. Zusätzlich sind die Expressionsraten der Mutanten und des hTAS2R10-Wildtyps (WT) in % aufgelistet. Die statistische Auswertung der Expressionsrate erfolgte ebenfalls als *One-way*-ANOVA und *Tukey post-hoc*-Test bei 95 % Konfidenzintervall, stets im Vergleich zum WT-Rezeptor.

hTAS2R10 Mutante	Strychnin				Parthenolid			
	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC50 / [μM]	n	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC50 / [μM]	n
WT	3	0,522 (+/-0,118)	33 (+/-24)	60	10	0,466 (+/-0,140)	69 (+/-26)	54
-S85A	30	0,315 (+/-0,088) ***	45 (+/-39)	13	1	0,824 (+/-0,208) ***	20 (+/-9) ***	15
-S85C	100	0,279 (+/-0,034) ***	46 (+/-14)	4	-	0,192 (+/-0,119) *	-	4
-S85T	10	0,561 (+/-0,097)	17 (+/-3)	4	-	0,141 (+/-0,106) ***	-	4
-S85V	300	0,126 (+/-0,004) ***	-	6	-	-	-	5
hTAS2R10 Mutante	Denatoniumbenzoat				Expressionsrate			
	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC50 / [μM]	n	MW / [%]	n		
WT	10	0,639 (+/-0,188)	59 (+/-30)	58	13 (+/-7,9)	12		
-S85A	30	0,548 (+/-0,166)	93 (+/-41)	13	12 (+/-6,2)	2		
-S85C	300	0,296 (+/-0,047)	79 (+/-11)	4	26 (+/-6,0)	2		
-S85T	30	0,567 (+/-0,088)	74 (+/-25)	4	22 (+/-3,9)	2		
-S85V	-	-	-	4	7 (+/-5,5)	2		

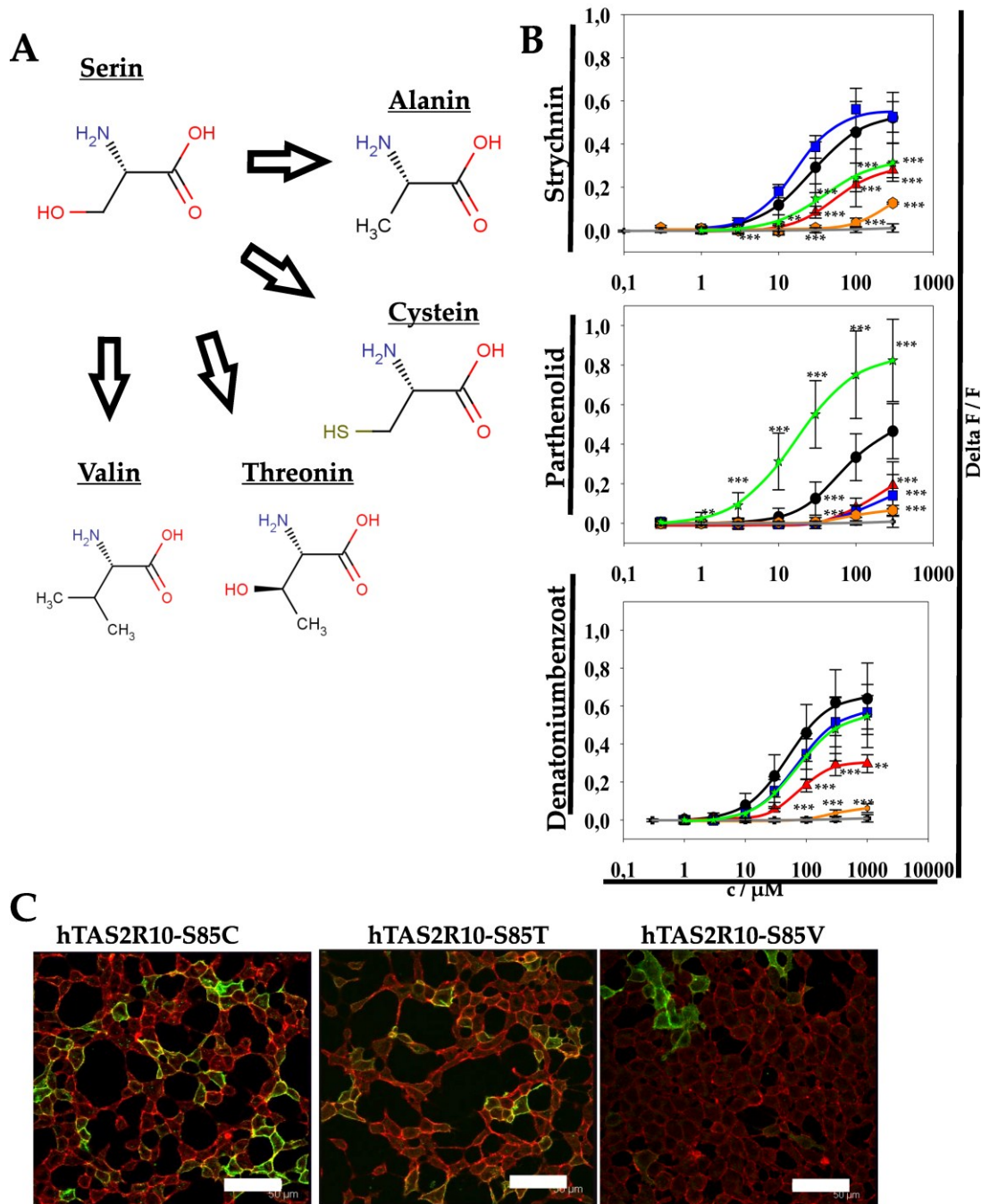


Abb. 18: S85^{3,29}-Mutagenese

(A) Die Position S85^{3,29} wurde zu A, C, T und V mutiert. (B) Zellen, die den Rezeptorwildtyp (WT, schwarz), sowie hTAS2R10-S85^{3,29}A (grün), -C (rot), -T (blau), -V (orange) und MOCK (grau) exprimieren, wurden mit Strychnin (0,3-300 μM), Parthenolid (0,3-300 μM) und Denatoniumbenzoat (1-1000 μM) stimuliert und die resultierenden $\Delta F/F$ -Werte (Y-Achse) gegen die Agonistenkonzentration (X-Achse) aufgetragen. Die Graphen stellen die Ergebnisse wiederholter Experimente dar. Die statistische Auswertung erfolgte als *One-way-ANOVA* und *Tukey post-hoc-Test* bei 95 % Konfidenzintervall (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) stets im Vergleich zum WT-Rezeptor. (C) Zellen, die Rezeptormutanten exprimieren, wurden fixiert und der C-terminale HSV-Epitop (grün), sowie die Zellmembran (rot) wurden nachgewiesen. Die Auswertung der Färbung erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Abgebildet sind nur exemplarische Bilder der Überlagerung der Rezeptormutanten. Die Bilder wurden mit folgenden Parametern aufgenommen: 40fach Objektiv, 1,5facher digitale Vergrößerung, Maßstab (weißer Balken): 50 μm .

Eine weitere interessante Fragestellung war die Untersuchung, inwieweit strukturelle Veränderungen, wie z.B. weitere Seitenketten oder funktionellen Gruppen, am Agonisten eine Änderung in der Rezeptoraktivierung hervorrufen. Dank der Arbeitsgruppe von Giovanni Appendino aus Novara Italien, standen für die Analyse Parthenolid-Derivate (Epoxy-Parthenolid EPA 0,3-300 μM und Parthenolid-Aldehyd PLD 0,3-300 μM), sowie strukturverwandte Sesquiterpenlactone (Telekin TEL 0,03-30 μM und Dihydrocostunolid DHC 0,03-10 μM) und monocyclische Terpenlactone (Menthofurolacton MFL 0,3-300 μM , Dehydromentholacton DHM 0,3-300 μM , und AM91A 0,3-300 μM) (entsprechend Abb. 19) zur Verfügung. Zusätzlich wurde getestet, ob bereits ein einfaches Lacton (Gamma-Valerolacton GVL 0,3-300 μM , Sigma-Aldrich, Abb. 19) für die Aktivierung des Rezeptors ausreichend ist. Zellen, die den Rezeptorwildtyp und die Rezeptormutanten exprimieren – hTAS2R10-S85^{3,29}A und -T – wurden mit den Parthenolid-Derivaten und -strukturanaloga stimuliert und die Reaktion mittels *Ca-Imaging*-Analyse gemessen (Abschnitt 2.4). Das korrigierte $\Delta F/F$ -Signal wurde gegen die Agonistenkonzentration als Dosis-Wirkungs-Kurve aufgetragen (Abb. 19). Die Schwellenwerte (SW), maximalen Amplituden und die gemittelten EC_{50} -Werte dieser Substanzen im Vergleich zu Parthenolid sind in Tab. 8 aufgelistet. Die Messungen zeigten, dass ein einfaches Lacton (GVL) nicht ausreichend ist, um den Rezeptor zu aktivieren (Abb. 19 und Tab. 8). Veränderungen in Form einer Einführung weiterer funktioneller Gruppen am ersten und zweiten Terpen-Ring (A-Ring und B-Ring entsprechend der Nomenklatur Abb. 6 und Abb. 14, EPA und PLD), führten zu einer Verschlechterung in der Rezeptoraktivierung. So betrugen die maximalen Amplituden für die Messungen der Parthenolid-Aldehyd- und Epoxy-Parthenolid-Stimuli, sowohl für die Rezeptormutanten als auch für den Wildtyprezeptor, lediglich die Hälfte als im Vergleich zu den Amplituden beim Parthenolidstimulus. Auch die Sensitivität für die Stimulation mit den Parthenolidanaloga war in einen höheren Konzentrationsbereich verschoben, was sich durch die größeren Schwellenwerten widerspiegelte. Dieser Effekt wurde mit zunehmender Aminosäuregröße von Alanin < Serin < Threonin (entsprechend Abb. 19 und Tab. 8) an Position 85^{3,29} verstärkt. Die Verkleinerung der Seitenketten am ersten und zweiten Terpen-Ring (Ring A und B, DHC, entsprechend Abb. 19 und Tab. 8) hingegen führte zu einer verbesserten Rezeptoraktivierung, bei höherer Sensitivität. Auch hier verhält sich die Rezeptoraktivierung antiparallel zur Größe der Aminosäure an Position 85^{3,29} (bessere Aktivierung A<S<T schlechtere Aktivierung).

Telekin ist ein Sesquiterpenlacton mit einem unflexiblen Terpen-Ring-System (Ring A und B geschlossen, Abb. 19 und Tab. 8). Bei der Messung des Wildtyprezeptors und der S85-

Rezeptormutanten konnte ein größerer Schwellenwert als bei der Messung mit Parthenolid beobachtet werden. Der Unterschied in der Aktivierung zwischen der Alanin-Mutante, dem Wildtyp und der Threonin-Mutante im Vergleich zum Parthenolid-Stimulus verkleinerte sich. Bei der Messung der Monoterpenlacton-Stimuli (MFL, DHM und AM91A) zeigte sich, dass durch den Verlust der Carbonylgruppe am Lacton-Ring im Vergleich zum Parthenolid-Stimulus die Rezeptoraktivierung kleiner wurde (AM91A im Vergleich zu MFL und DHM, Abb. 19, sowie maximale Amplituden in Tab. 8). Der Unterschied zwischen dem Wildtyp und der Threonin-Mutante – im Vergleich zur Alanin-Mutante – nahm bei der Messung mit Monoterpenlactonen im Vergleich zur Messung mit Parthenolid ab.

Tab. 8: Auflistung der pharmakologischen Parameter der Parthenolid-Derivate und -strukturanaloga

Aufgelistet sind die S85^{3,29}-Mutanten A und T und der hTAS2R10-Wildtyp (WT) mit ihren Schwellenwerten (SW) in μM , ihren maximalen Amplituden (Max. Ampl.) und dem Mittelwert der EC₅₀-Werte in μM , inklusive der Standardabweichung für die entsprechenden Agonisten. Die Anzahl der Messungen wird mit „n“ angegeben. Die in grau dargestellten maximalen Amplituden waren nicht signifikant höher als die der MOCK-Kontrolle. Die statistische Auswertung der maximalen Amplituden erfolgte als *One-way*-ANOVA und *Tukey post-hoc*-Test bei 95 % Konfidenzintervall, stets im Vergleich zum WT-Rezeptor (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Die statistische Auswertung der EC₅₀-Werte erfolgte als Kruskal-Wallis-Test im Vergleich zum Wildtyprezeptor.

hTAS2R10 Mutante	Parthenolid				Parthenolid-Aldehyd				Epoxy-Parthenolid			
	SW / $[\mu\text{M}]$	Max. Ampl.	EC50 / $[\mu\text{M}]$	n	SW / $[\mu\text{M}]$	Max. Ampl.	EC50 / $[\mu\text{M}]$	n	SW / $[\mu\text{M}]$	Max. Ampl.	EC50 / $[\mu\text{M}]$	n
WT	10	0,466 (+/-0,140) ***	69 (+/-26)	54	-	0,138 (0,055)	-	3	300	0,150 (+/-0,049)	-	4
-S85A	1	0,824 (+/-0,208)	20 (+/-9) ***	15	100	0,351 (+/-0,133)	-	3	100	0,255 (+/-0,090)	-	4
-S85T	-	0,141 (+/-0,106) ***	-	4	-	-	-	2	-	0,104 (+/-0,052)	-	2
hTAS2R10 Mutante	Dihydrocostunolid				Telekin				Menthofuroolacton			
	SW / $[\mu\text{M}]$	Max. Ampl.	EC50 / $[\mu\text{M}]$	n	SW / $[\mu\text{M}]$	Max. Ampl.	EC50 / $[\mu\text{M}]$	n	SW / $[\mu\text{M}]$	Max. Ampl.	EC50 / $[\mu\text{M}]$	n
WT	1	0,418 (+/-0,043)	-	2	30	0,375 (+/-0,090)	-	2	30	0,407 (+/-0,028)	16 (+/-7)	2
-S85A	0,3	1,062 (+/-0,074)	1,9 (+/-0,6)	2	10	0,882 (+/-0,071) *	-	2	10	0,695 (+/-0,023) **	8 (+/-3)	2
-S85T	-	-	-	2	-	0,130 (+/-0,068)	-	2	100	0,172 (+/-0,022) **	16 (+/-5)	2
	AM91A				Dehydromentholacton				Gamma-Valerolacton			
	SW / $[\mu\text{M}]$	Max. Ampl.	EC50 / $[\mu\text{M}]$	n	SW / $[\mu\text{M}]$	Max. Ampl.	EC50 / $[\mu\text{M}]$	n	SW / $[\mu\text{M}]$	Max. Ampl.	EC50 / $[\mu\text{M}]$	n
WT	-	0,175 (+/-0,037)	-	2	30	0,546 (+/-0,089)	75 (+/-10)	2	-	-	-	2
-S85A	100	0,395 (+/-0,070) *	-	2	30	0,731 (+/-0,036)	36 (+/-5)	2	-	-	-	2
-S85T	-	0,109 (+/-0,040)	-	2	100	0,321 (+/-0,005)	-	2	-	-	-	2

Bei der Aktivierung mit Menthofuroolacton zeigten der gemessene Wildtyprezeptor, sowie die Alanin- und Threonin-Mutanten den größten Unterschied im Kurvenverlauf für Monoterpenlactone. Dieser Unterschied war jedoch geringer als der für die Aktivierung mit Parthenolid. Für die Aktivierung mit Dehydromentholacton war der kleinste Unterschied zwischen dem Wildtyprezeptor, der Threonin- und Alanin-Mutante im Vergleich zur Aktivierung mit Parthenolid ersichtlich. Das spiegelte sich auch in den maximalen

Amplituden für die Messung des Wildtyprezeptors und der Rezeptormutanten mit Dehydromentholacton wieder. Sie unterscheiden sich nicht signifikant.

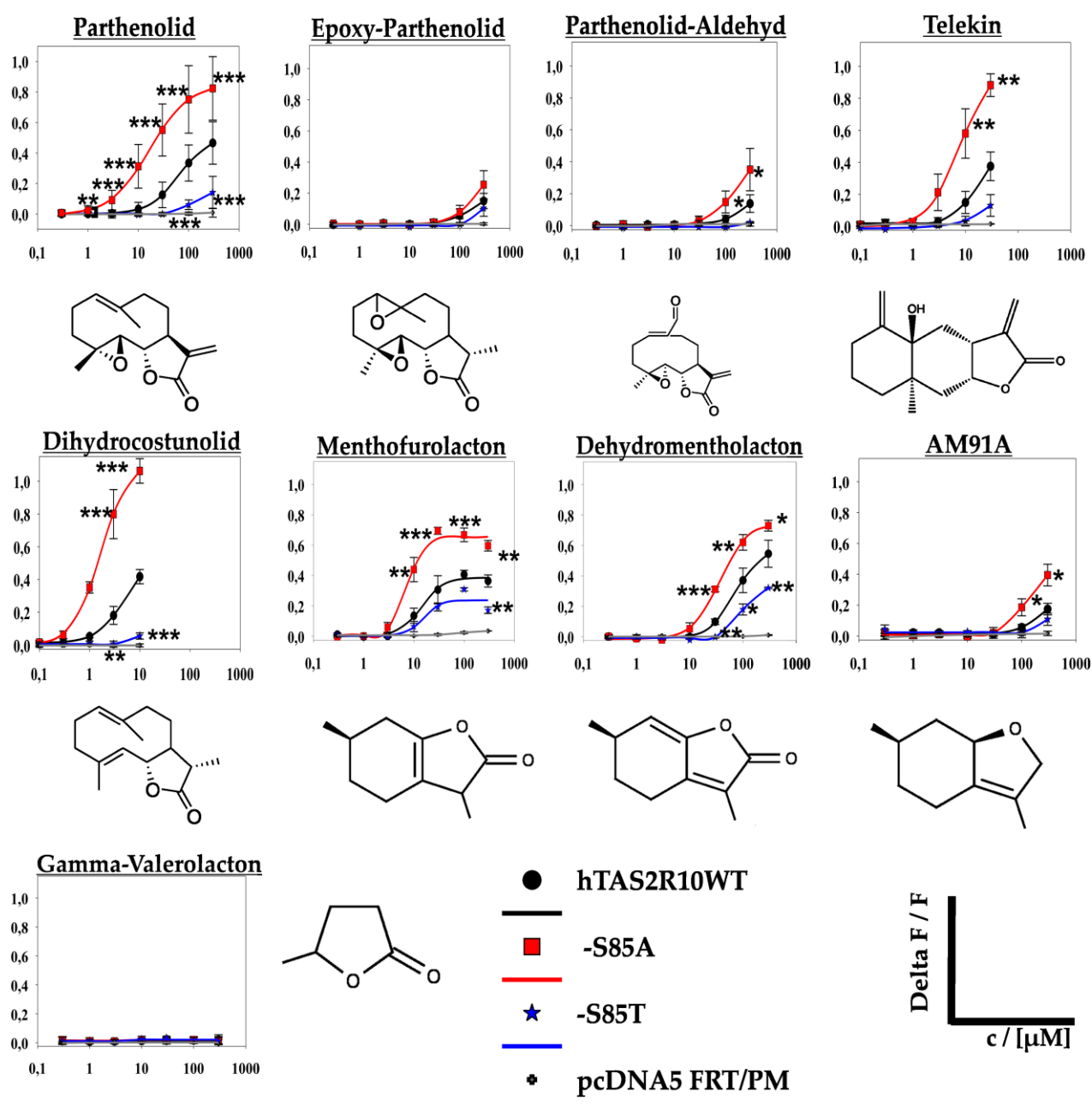


Abb. 19: Dosis-Wirkungs-Kurven der gemessenen Parthenolid-Derivate und -Strukturanaloga

Zellen, die den hTAS2R10 Wildtyp (WT), sowie die Mutanten S85^{3,29}A und -T und MOCK transient exprimieren, wurden mit Parthenolid, unterschiedlichen Parthenolid-Derivaten (Epoxy-Parthenolid 0,3-300 μM, Parthenolid-Aldehyd 0,3-300 μM) und Strukturanaloga (Telekin 0,03-30 μM, Dihydrocostunolid 0,03-10 μM, Menthofuroolacton 0,3-300 μM, Dehydromentholacton 0,3-300 μM, AM91A 0,3-300 μM, Gamma-Valerolacton 0,3-300 μM) stimuliert und die resultierenden $\Delta F/F$ -Werte (Y-Achse) gegen die Agonisten-Konzentration (X-Achse) aufgetragen. Die Graphen stellen die Ergebnisse wiederholter Experimente dar. Die statistische Auswertung erfolgte als *One-way*-ANOVA und *Tukey post-hoc*-Test bei 95 % Konfidenzintervall (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) stets im Vergleich zum WT-Rezeptor.

3.1.5 Positionierung von Parthenolid in das hTAS2R10-3D-Modell

Die Mutagenese in Abschnitt 3.1.4 deutet an, dass die funktionellen Gruppen am Terpen-Ring A mit S85^{3.29} in Wechselwirkungen stehen. So lässt sich vermuten, dass die Carbonylgruppe am Parthenolid für die Aktivierung notwendig ist, während die funktionellen Gruppen am Terpen-Ring A sich als störend gezeigt haben (entsprechend Abb. 19). Auf Grundlage dieser Vermutung wurde Parthenolid in das hTAS2R10-3D-Modell eingepasst (Abb. 20). Dabei wurde Parthenolid so im Rezeptor ausgerichtet, dass die OH-Gruppe der Position S85^{3.29} in einer räumlichen Nähe zur Methylgruppe und Epoxygruppe am ersten Terpen-Ringe (Ring A, entsprechend Abb. 6) liegt. Die Carbonylgruppe des Lactonringes wurde dann so eingepasst, dass sie mit Wasserstoffbrückendonatoren (N92^{3.35} und Q93^{3.26}) im Zentrum des Rezeptors interagieren kann (Abb. 20A). Die Ausrichtung des Agonisten in dieser Form ermöglichte eine Vorstellung über die räumliche Ausrichtung von Parthenolid im hTAS2R10 und die Identifizierung von weiteren Positionen, die durch die initiale Alanin-Mutagenese nicht erfasst wurden. Die vielversprechendsten Kandidaten waren die Positionen K174^{5.39}, Q175^{5.40} und L178^{5.43} (Abb. 20B). Diese Positionen werden im folgenden Abschnitt genauer analysiert. Mittels Analyse dieser Positionen sollte auch die Positionierung des Parthenolids im hTAS2R10 bestätigt werden.

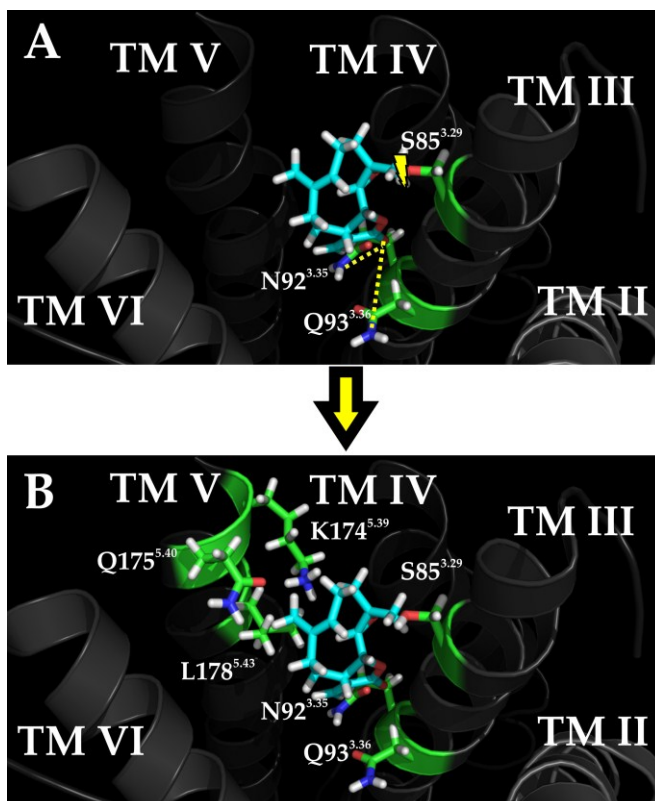


Abb. 20: Docking von Parthenolid in das hTAS2R10-3D-Modell

(A) Parthenolid wurde so in das hTAS2R10-3D-Modell eingepasst, dass es durch die Epoxy- und die Methylseitenketten am Terpen-Ring A und der OH-Gruppe der S85^{3.29}-Position zu einer sterischen Hinderung kommen kann (Blitz). Die Carbonylgruppe am Lactonring wurde so positioniert, dass sie mit Wasserstoffbrückendonatoren (N92^{3.35} und Q93^{3.36}) im Zentrum der Bindungstasche interagieren kann (gelbe gepunktete Linie). (B) Die Aminosäuren K174^{5.39}, Q175^{5.40} und L178^{5.43} befinden sich in direkter Nachbarschaft zum Agonisten. Die Wasserstoffatome sind in weiß, Sauerstoffatome in rot, Stickstoff in dunkelblau und Kohlenstoff in grün (Aminosäure) bzw. hellblau (Agonist) dargestellt.

3.1.6 Detaillierte Analyse der Positionen K174^{5.39}, Q175^{5.40} und L178^{5.43}

Die Aminosäuren der Positionen 174^{5.39}, 175^{5.40} und 178^{5.43} wurden mittels zielgerichteter, ortsspezifischer Mutagenese zu Alanin mutiert (entsprechend Abschnitt 2.2.4). Mit diesen Mutanten wurden HEK293T_{Gα16Gust44}-Zellen transient transfiziert und ihre Reaktion auf Strychnin (STR 0,3-300 μM), Parthenolid (PAR 0,3-300 μM) und Denatoniumbenzoat (DTB 0,3-1000 μM) mittels *Calcium-Imaging*-Analyse (Abschnitt 2.4) gemessen. Die Dosis-Wirkungs-Kurven dieser Messungen im Vergleich zu den Messungen des Wildtyprezeptors sind in Abb. 21A dargestellt. Die zu den Dosis-Wirkungs-Kurven zugehörigen EC₅₀-Mittelwerte (soweit vorhanden), maximalen Amplituden und Schwellenwerte sind in Tab. 9 aufgelistet. Für die K174^{5.39}A-Mutante war im Vergleich zum Wildtyp eine nicht agonistenselektive Verschlechterung der Aktivierung unterschiedlichen Ausmaßes nach Stimulation mit STR, PAR und DTB zu sehen (Abb. 21A rote Kurve und Tab. 9). Die L178^{5.43}A-Mutante zeigte im Vergleich zum Wildtyprezeptor hingegen eine nicht agonistenselektive, gesteigerte Aktivierung nach Mutation zu Alanin (Abb. 21A grüne Kurve und Tab. 9) für die Stimulation mit den drei Agonisten STR, PAR und DTB. Die Q175^{5.40}A-Mutante zeigte eine höhere Amplitude (Abb. 21A, blaue Kurve und Tab. 9) und einen kleineren EC₅₀-Mittelwert auf dem Strychninstimulus als die Messung des Wildtyprezeptors. Die Aktivierung nach Denatoniumbenzoatstimulus fiel für das Alaninkonstrukt geringer aus, als die des Wildtyprezeptors. Dies ist ersichtlich am Kurvenverlauf (Abb. 21A), als auch im größeren EC₅₀-Mittelwert (entsprechend Tab. 9). Die Messung mit Parthenolid zeigte eine Verschiebung der Sensitivität in einen höheren Konzentrationsbereich; ersichtlich am größeren Schwellenwert der gemessenen Alaninrezeptormutante (Tab. 9). Die Mutanten wurden auch immunzytochemisch charakterisiert (HSV-Epitop- und Zellmembranfärbung, entsprechend Abschnitt 2.5). Die Ergebnisse der immunzytochemischen Charakterisierung sind exemplarisch in Abb. 21B abgebildet. Auf die Abbildung der Wildtyp- und Negativkontrolle wurde verzichtet. Sie entsprachen den in Abb. 17 dargestellten Kontrollen. Die Expressionsraten der Mutanten sind in Tab. 9 aufgelistet. Sowohl Lokalisation als auch Expressionsrate unterschieden sich nicht signifikant von der des Wildtyps.

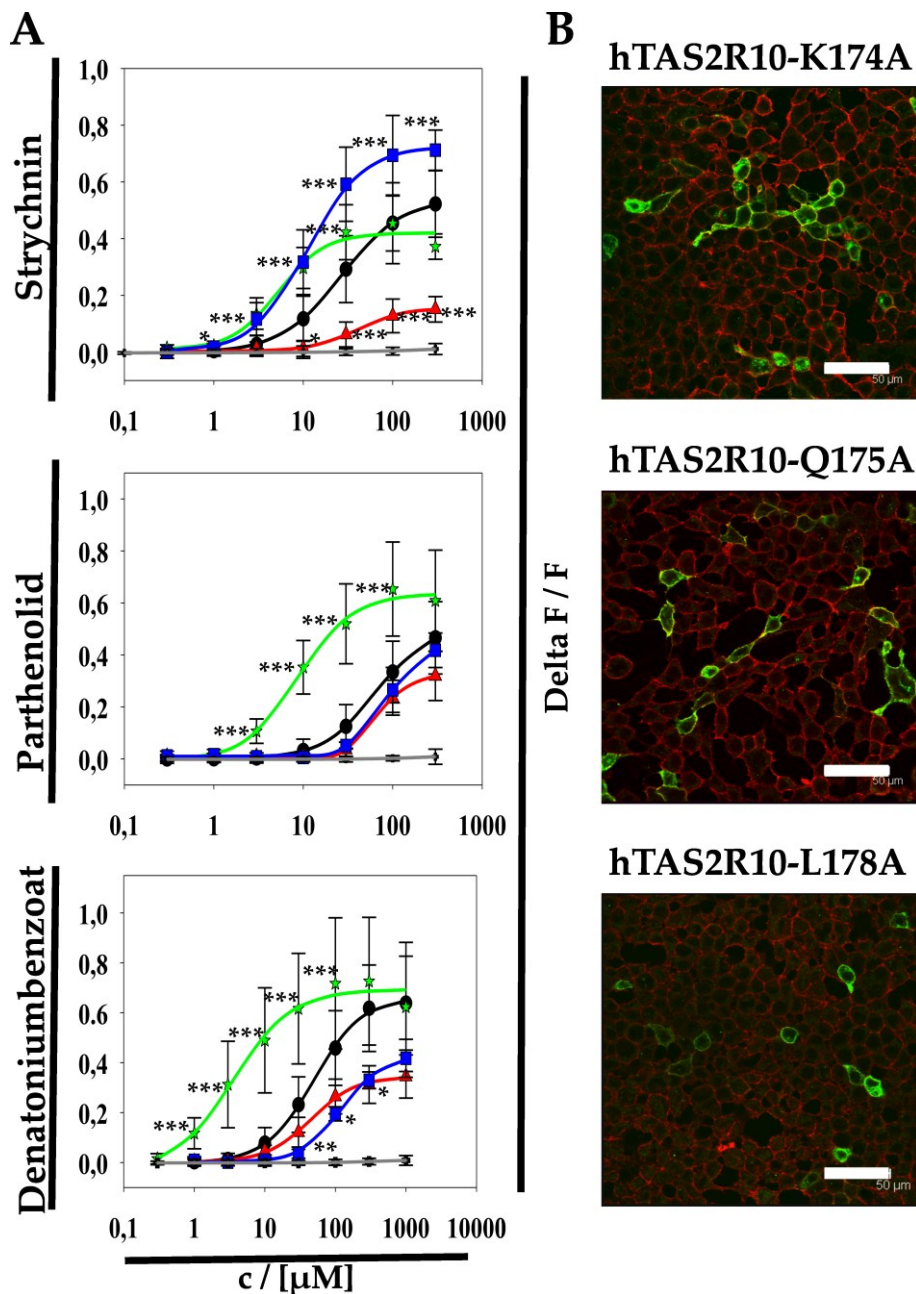
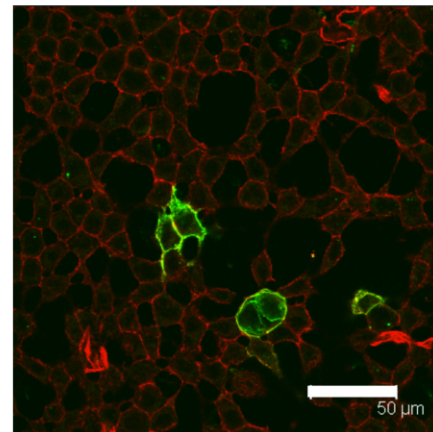
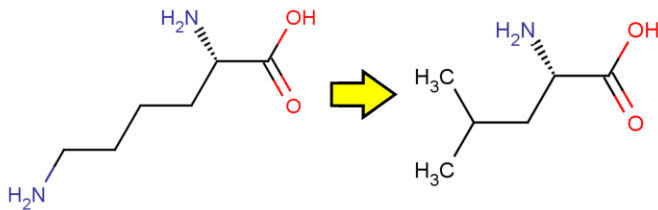


Abb. 21: Charakterisierung der K174^{5.39}A, Q175^{5.40}A und L178^{5.43}A-Mutanten
 (A) Zellen, die den Rezeptorwildtyp (WT, schwarz, Kreis) sowie die K174^{5.39}A- (rot), Q175^{5.40}A- (blau), L178^{5.43}A-Mutante (grün) und MOCK (grau) exprimieren, wurden mit Strychnin (0,3-300 μM), Parthenolid (0,3-300 μM) und Denatoniumbenzoat (0,3-1000 μM) stimuliert und die resultierenden $\Delta\text{F}/\text{F}$ -Werte (Y-Achse) gegen die Agonistenkonzentration (X-Achse) aufgetragen. Die Graphen stellen die Ergebnisse wiederholter Experimente dar. Die statistische Auswertung erfolgte als *One-way-ANOVA* und *Tukey post-hoc-Test* bei 95 % Konfidenzintervall (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) stets im Vergleich zum WT-Rezeptor. (B) Zellen, die Rezeptormutanten exprimieren wurden fixiert und der C-terminale HSV-Epitop (grün), sowie die Zellmembran (rot) nachgewiesen. Die Auswertung der Färbung erfolgte mittels inversem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Abgebildet sind nur exemplarische Bilder der Überlagerung der Mutanten. Die Bilder wurden mit folgenden Parametern aufgenommen: 40fach Objektiv, 1,5facher digitale Vergrößerung, Maßstab (weißer Balken): 50 μm .

Der Aminosäureaustausch von K174^{5.39} zu Alanin führte zu einer nicht agonistenselektiven verringerten Aktivierung. Die Vermutung war, dass diese Position unspezifisch über intermolekulare Wechselwirkungen mit den untersuchten Agonisten interagiert. Bei einer solchen intermolekularen Wechselwirkung würde die basische Aminogruppe für die Interaktion nicht von Bedeutung sein. Der Aminosäureaustausch zu einer Aminosäure mit ähnlicher Größe ohne funktionelle Gruppe, sollte zu keiner Änderung führen. Im Falle der Rezeptoraktivierung sollte ein Verlust der basischen Aminogruppe zu einer nicht agonistenselektiven Änderung der Aktivierung führen. K174^{5.39} wurde daher zu Leucin, eine große unpolare Aminosäure ohne funktionelle Gruppe, mutiert (Abb. 22A). Zellen, die den Rezeptorwildtyp und –mutante exprimierten, wurden mit den drei Agonisten STR, PAR und DTB stimuliert und auf ihre Reaktion hin gemessen (abgebildet in Abb. 22B blaue Kurve). Die Messungen zeigten, ähnlich des hTAs2R10-K174^{5.39}A-Konstrukts (Abb. 22 B, rote Kurve), eine nicht agonistenselektive Reduzierung der Aktivität nach Stimulation. Die immunzytochemische Charakterisierung von HSV-Epitop-(grün) und Zellmembran(rot) nachgewiesenen Zellen, die die K174^{5.29}L-Rezeptormutante exprimieren (Abb. 22C), zeigten weder in der Lokalisation noch in der Expressionsrate einen Unterschied im Vergleich zum Wildtyprezeptor (Abb. 17 und Tab. 9).

Auf Grund der Ergebnisse für die L178^{5.43}A-Mutante (gesteigerte Reaktion auf STR, PAR und DTB, Abb. 21A und Tab. 9) kann man vermuten, dass zwischen den Agonisten und der Position L178^{5.43} eine Interaktion in Form einer sterischen Hinderung besteht. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurde das Leucin zu einer größeren unpolaren Aminosäure (Phenylalanin) mutiert (Abb. 23A). Die Erwartung war, dass durch die größere Aminosäure an dieser Position die sterische Hinderung verstärkt wird und die Aktivierung nach Stimulation mit den drei Agonisten STR, PAR und DTB, im Vergleich zum Wildtyp-hTAS2R10, deutlich reduziert wird. Wie in Abb. 23B und in Tab. 9 zu sehen ist, war die Reaktion der L178^{5.43}F-Mutante auf alle drei Agonisten – wie erwartet – nicht mehr vorhanden. In Lokalisation und Expressionsrate unterschieden sich die HSV-Epitop- und Zellmembran nachgewiesenen L178^{5.43}F-Mutante-exprimierenden-Zellen (Abb. 23C und Tab. 9) nicht von denen des Rezeptorwildtyps (Abb. 17 und Tab. 9).

A Lysin Leucin C hTAS2R10-K174L



B Strychnin Parthenolid Denatonium -benzoat

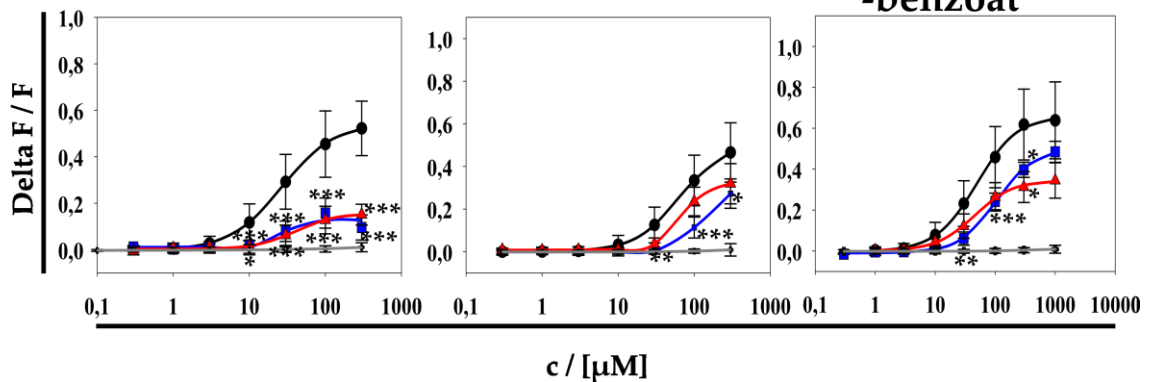


Abb. 22: K174^{5,39}-Mutagenese

(A) Die Position K174^{5,39} wurde zu Leucin mutiert. (B) Zellen, die den Rezeptorwildtyp (WT, schwarz) sowie die L-Mutante (blau) und MOCK (grau) exprimieren, wurden mit Strychnin (0,3-300 μM), Parthenolid (0,3-300 μM) und Denatoniumbenzoat (0,3-1000 μM) stimuliert und die resultierenden $\Delta F/F$ -Werte (Y-Achse) gegen die Agonistenkonzentration (X-Achse) aufgetragen. Zum Vergleich sind auch die Kurven der K174^{5,39}A-Mutante (rot) abgebildet. Die Graphen stellen die Ergebnisse wiederholter Experimente dar. Die statistische Auswertung erfolgte als *One-way*-ANOVA und *Tukey post-hoc*-Test bei 95 % Konfidenzintervall (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) stets im Vergleich zum WT-Rezeptor. (C) Zellen, die die Rezeptormutanten exprimieren, wurden fixiert und der C-terminale HSV-Epitop (grün), sowie die Zellmembran (rot) nachgewiesen. Die Auswertung der Färbung erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Abgebildet ist exemplarisch nur ein Bild der Überlagerung für die Leucin-Mutante. Das Bild wurde mit folgenden Parametern aufgenommen: 40fach Objektiv, 1,5facher digitale Vergrößerung, Maßstab (weißer Balken): 50 μm .

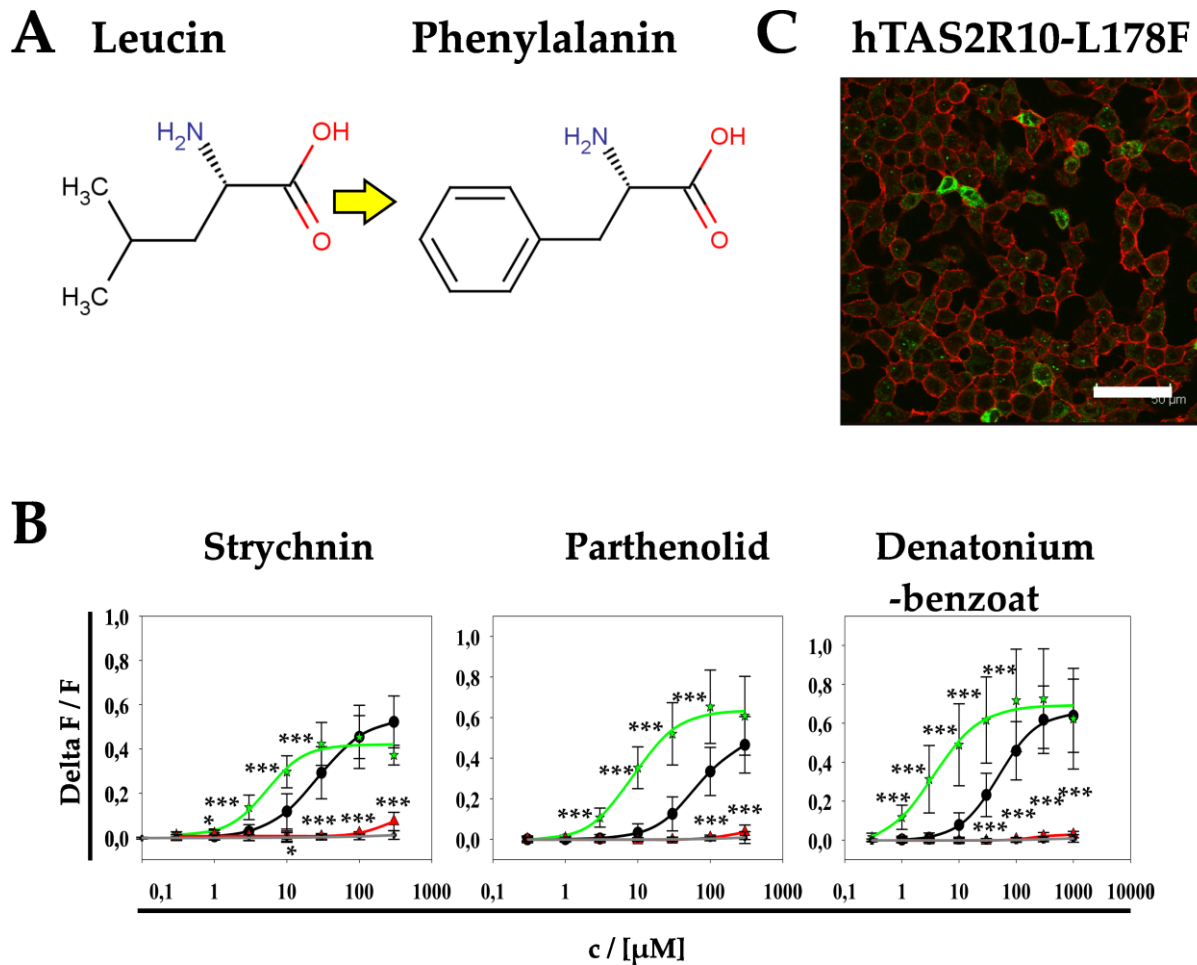


Abb. 23: L178^{5,43}-Mutagenese

(A) Die Position L178^{5,43} wurde zu Phenylalanin mutiert. (B) Zellen, die den Rezeptorwildtyp (WT, schwarz) sowie die F-Mutante (rot) und MOCK (grau) exprimieren, wurden mit Strychnin (0,3-300 μM), Parthenolid (0,3-300 μM) und Denatoniumbenzoat (0,3-1000 μM) stimuliert und die resultierenden $\Delta F/F$ -Werte (Y-Achse) gegen die Agonistenkonzentration (X-Achse) aufgetragen. Zum Vergleich sind auch die Kurven der L178^{5,43}A-Mutante (grün) abgebildet. Die Graphen stellen die Ergebnisse wiederholter Experimente dar. Die statistische Auswertung erfolgte als *One-way-ANOVA* und *Tukey post-hoc*-Test bei 95 % Konfidenzintervall (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) stets im Vergleich zum WT-Rezeptor. (C) Zellen, die die entsprechenden Rezeptormutanten exprimieren wurden fixiert und der C-terminale HSV-Epitop (grün), sowie die Zellmembran (rot) nachgewiesen. Die Auswertung der Färbung erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Abgebildet ist exemplarisch nur ein Bild der Überlagerung der Phenylalanin-Mutante. Das Bild wurde mit folgenden Parametern aufgenommen: 40fach Objektiv, 1,5facher digitale Vergrößerung, Maßstab (weißer Balken): 50 μm .

Tab. 9: Pharmakologische Parameter und Expressionsrate der K174^{5.39}-, Q175^{5.40}- und L178^{5.43}-Mutanten
 Aufgelistet sind K174^{5.39}-, Q175^{5.40}- und L178^{5.43}-Mutanten, sowie der hTAS2R10-Wildtyp (WT) mit ihren Schwellenwerten (SW) in μM , ihren maximalen Amplituden (Max. Ampl.) und dem Mittelwert der EC₅₀-Werte in μM , inklusive der Standardabweichung für die entsprechenden Agonisten. Die Anzahl der Messungen wird mit „n“ angegeben. Die in grau dargestellten maximalen Amplituden waren nicht signifikant höher als die der MOCK-Kontrolle. Die statistische Auswertung der maximalen Amplituden erfolgte als *One-way*-ANOVA und *Tukey post-hoc*-Test bei 95 % Konfidenzintervall stets im Vergleich zum WT-Rezeptor (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001). Die statistische Auswertung der EC₅₀-Werte erfolgte als Kruskal-Wallis-Test im Vergleich zum WT-Rezeptor. Zusätzlich sind die Expressionsraten in % aufgelistet. Die statistische Auswertung der Expressionsraten erfolgte ebenfalls als *One-way*-ANOVA und *Tukey post-hoc*-Test bei 95 % Konfidenzintervall im Vergleich zum jeweiligen WT-Rezeptor.

hTAS2R10-	Strychnin				Parthenolid			
	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC50 / [μM]	n	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC50 / [μM]	n
WT	3	0,522 (+/-0,118)	33 (+/-24)	60	10	0,466 (+/-0,140)	69 (+/-26)	54
-K174A	-	0,151 (+/-0,045) ***	-	3	100	0,319 (+/-0,094)	56 (+/-32)	3
-K174L	100	0,158 (+/-0,065) ***	43 (+/-22)	7	300	0,273 (+/-0,069)	-	6
-Q175A	3	0,712 (+/-0,071) *	14 (+/-8)	4	100	0,418 (+/-0,066)	-	3
-Q175L	30	0,185 (+/-0,009) ***	17 (+/-6)	6	-	-	-	5
-Q175N	10	0,485 (+/-0,179)	22 (+/-4)	5	-	0,164 (+/-0,114) **	-	4
-L178A	1.0	0,454 (+/-0,097)	6 (+/-1) **	10	3	0,654 (+/-0,181)	9 (+/-3) ***	7
-L178F	-	0,072 (+/-0,041) ***	-	3	-	-	-	4
hTAS2R10-	Denatoniumbenzoat				Expressionsrate			
	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC50 / [μM]	n	MW / [%]	n		
WT	10	0,639 (+/-0,188)	59 (+/-30)	58	13 (+/-7,9)	12		
-K174A	100	0,345 (+/-0,086)	53 (+/-15)	3	14 (+/-6,8)	2		
-K174L	100	0,485 (+/-0,052)	104 (+/-14)	6	6 (+/-2,3)	2		
-Q175A	300	0,418 (+/-0,076)	126 (+/-39)	3	15 (+/-3,2)	2		
-Q175L	-	0,078 (+/-0,044) ***	-	6	5 (+/-2,3)	2		
-Q175N	300	0,580 (+/-0,263)	-	4	7 (+/-1,9)	2		
-L178A	1	0,726 (+/-0,256)	4 (+/-2)	10	4 (+/-0,5)	2		
-L178F	-	-	-	4	6 (+/-1,7)	2		

Zur Überprüfung der Hypothese der Agonistenselektivität von Position Q175^{5.40}, welche sich aus der besseren Aktivierung mittels des Strychnin-Stimulus, einer geringeren Sensitivität auf Parthenolid und einer deutlich schlechteren Aktivierung mittels Denatoniumbenzoat nach Mutation zu Alanin (entsprechend Abb. 21A und Tab. 9) ableitet, wurde diese zu Leucin, einer großen, unpolaren Aminosäure mutiert (entsprechend Abb. 24A). Der Unterschied zwischen Glutamin und Leucin ist in erster Linie das Fehlen einer funktionellen Gruppe im Leucin, bei vergleichbarer Größe. Die Erwartung war daher, dass der Verlust der

funktionellen Gruppe bei agonistenselektiven Wechselwirkungen – wie Wasserstoffbrückenbindungen – in einer Funktionsreduzierung resultieren würde. Es zeigte sich, dass die Mutation zu Leucin generell eine deutliche Reduzierung der Aktivierung durch die Agonisten STR, PAR und DTB bewirkte (Abb. 24B, rote Kurve und Tab. 9). Der EC_{50} -Wert der gemessenen Leucinrezeptormutante war kleiner als der Wert für die Wildtyprezeptormessung, jedoch nicht signifikant (Tab. 9). Daneben wurde Glutamin zu Asparagin mutiert. Asparagin ist eine, um ein C-Atom kürzere Aminosäure jedoch mit der gleichen funktionellen Amidgruppe wie Glutamin. Mit ihr sollte getestet werden, ob die Amidgruppe in einem bestimmten Abstand zum Agonisten liegen muss, um mit den Agonisten zu interagieren. Der größere Abstand vom Agonisten sollte zu einer verschlechterten Rezeptorreaktion auf die drei Agonisten STR, PAR und DTB führen, wenn diese mit der Amidgruppe interagieren. Sollte eine Interaktion in Form einer sterischen Hinderung vorliegen, so würde nach der Mutation zu Asparagin eine verbesserte Reaktion nach Stimulation erwartet werden. Wie in Abb. 24B zu sehen, war die Rezeptorreaktion für das Q175^{5.40}N-Konstrukt (grüne Kurve) gemessen mit DTB, wie für eine Interaktion zwischen der Amidgruppe und Denatonium erwartet, reduziert. Die Rezeptoraktivierung auf die Stimulation mit PAR hingegen war deutlich reduziert für die Asparaginmutante im Vergleich zur Messung des Wildtyprezeptors (Abb. 24A, schwarze Kurve). Die Aktivierung der Rezeptormutante nach Stimulation mit STR unterschied sich nicht von der Aktivierung des Wildtyprezeptors. Dies entsprach nicht der Erwartung, dass die Amidgruppe von Glutamin in einer bestimmten Entfernung zu STR liegen muss, um mit STR interagieren zu können. Dies würde aber für eine sterische Hinderung zwischen der Amidgruppe und Strychnin sprechen. Der EC_{50} -Wert der Q175^{5.40}N-Mutante war nicht signifikant kleiner als der des WT-Rezeptors (entsprechend Tab. 9) In Lokalisation und Expressionsrate unterschieden sich die Zellen, die Q175^{5.40}-Rezeptormutanten exprimieren (Abb. 24C und Tab. 9) nicht von denen des Rezeptorwildtyps (Abb. 17 und Tab. 9).

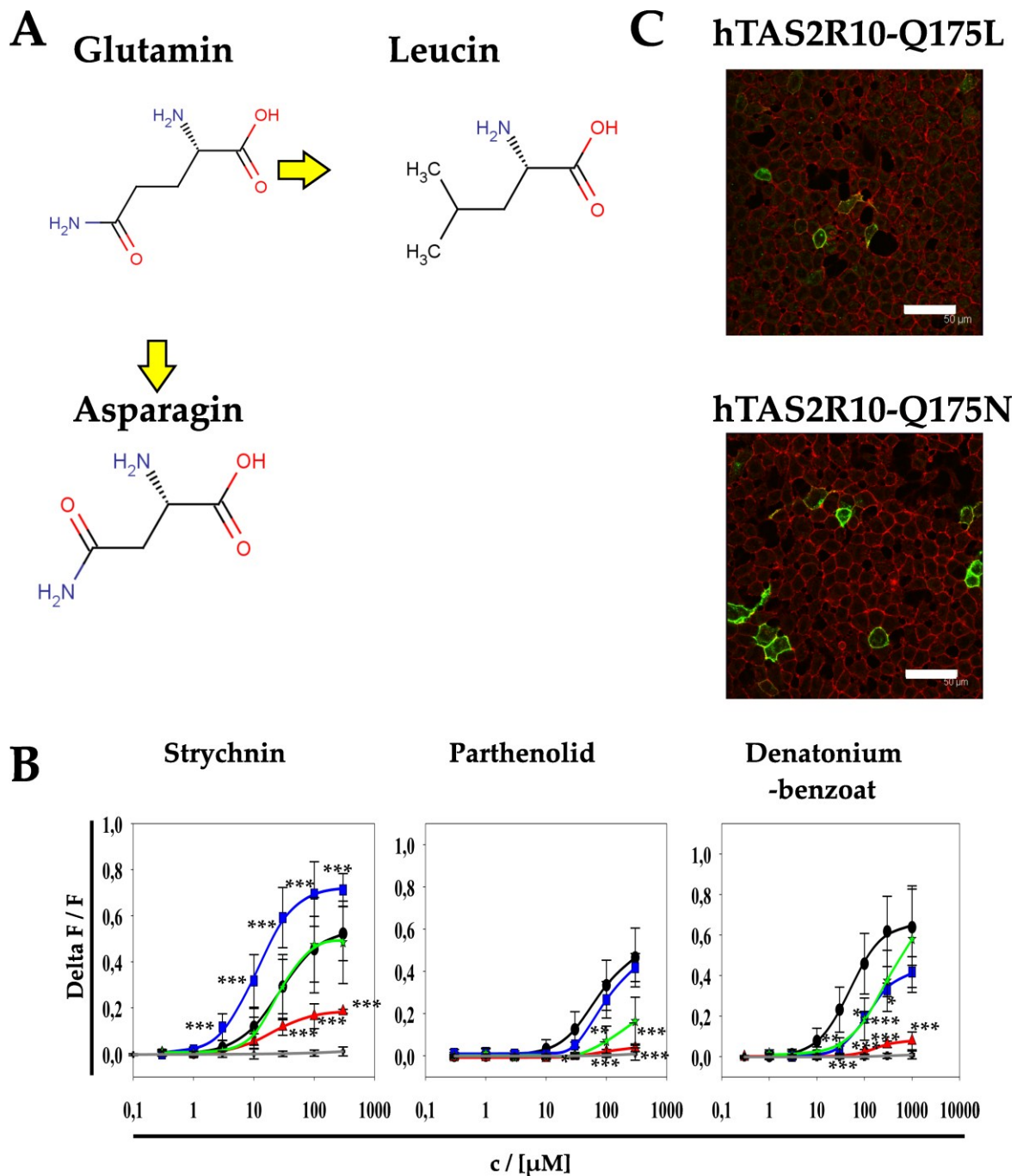


Abb. 24: Q175^{5,40}-Mutagenese

(A) Die Position Q175^{5,40} wurde zu Leucin und zu Asparagin mutiert. (B) Zellen, die den Rezeptorwildtyp (WT, schwarz) sowie die L-Mutante (rot), die N-Mutante (grün) und MOCK (grau) exprimieren, wurden mit Strychnin (0,3-300 μM), Parthenolid (0,3-300 μM) und Denatoniumbenzoat (1-1000 μM) stimuliert und die resultierenden $\Delta F/F$ -Werte (Y-Achse) gegen die Agonistenkonzentration (X-Achse) aufgetragen. Zum Vergleich sind auch die Kurven der Q175^{5,40}A-Mutante (blau) abgebildet. Die Graphen stellen die Ergebnisse wiederholter Experimente dar. Die statistische Auswertung erfolgte als *One-way*-ANOVA und *Tukey post-hoc*-Test bei 95 % Konfidenzintervall (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) stets im Vergleich zum WT-Rezeptor. (C) Zellen, die die entsprechenden Rezeptormutanten exprimieren, wurden fixiert und der C-terminale HSV-Epitop (grün), sowie die Zellmembran (rot) nachgewiesen. Die Auswertung der Färbung erfolgte mittels inversem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Abgebildet ist exemplarisch nur ein Bild der Überlagerung der Leucin- und der Asparaginmutante. Die Bilder wurden mit folgenden Parametern aufgenommen: 40fach Objektiv, 1,5facher digitale Vergrößerung, Maßstab (weißer Balken): 50 μm .

3.1.7 *In-silico*-Agonisten-Docking in das hTAS2R10-Modell

Zur Modellierung der Interaktion zwischen Rezeptor und Agonisten wurden die drei Agonisten Strychnin, Parthenolid und Denatonium (als der interagierende Teil von Denatoniumbenzoat) in das 3D-Modell des hTAS2R10 gedockt. Das Agonisten-Docking wurde von Anat Levit (*The Hebrew University of Jerusalem*) als *Flexible-Docking*-Algorithmus mittels Discovery-Studio-3.1-Software (Accelrys Inc.) durchgeführt. Die folgenden Positionen wurden als flexibel definiert: S85^{3.29}, W88^{3.32}, V89^{3.33}, N92^{3.36}, Q93^{3.37}, K174^{5.39}, Q175^{5.40}, L178^{5.43}, I183^{5.48}, F236^{6.48}, Y239^{6.51}, M263^{7.39} und T266^{7.42}. Das Agonisten-Docking stand in Übereinstimmung mit den experimentellen Daten für die Positionen S85^{3.29}, W88^{3.32}, V89^{3.33}, N92^{3.36}, Q93^{3.37}, Y239^{6.51}, M263^{7.39} und T266^{7.42}. Es kann jedoch nicht vollständig die Interaktionen von Positionen aus der Transmembrandomäne (TM) 5 und den Agonisten erklären. Insbesondere die aus den experimentellen Daten ersichtliche Interaktion zwischen Q175^{5.40} und Denatoniumbenzoat (Abb. 24B und Tab. 9) konnte nicht mit Hilfe dieses Modells erklärt werden, da der Rest Q175^{5.40} bzw. die TM 5 in diesem Modell zu weit von den Agonisten entfernt liegt. Das Modell wurde daher verworfen und durch ein neues ersetzt. Die Modellierung des hTAS2R10 auf Basis des β 2-adrenergen Rezeptors (DOI:10.2210/pdb3sn6/pdb) (Rasmussen *et al.* 2011), sowie das anschließende Agonisten-Docking als *Flexible-Docking* wurden von Anat Levit (*The Hebrew University of Jerusalem*) mittels Discovery-Studio 3.1-Software (Accelrys Inc.; San Diego; USA) durchgeführt. Die folgenden Positionen wurden als flexibel definiert: S85^{3.29}, W88^{3.32}, V89^{3.33}, N92^{3.36}, Q93^{3.37}, K174^{5.39}, Q175^{5.40}, L178^{5.43}, I183^{5.48}, F236^{6.48}, Y239^{6.51}, M263^{7.39} und T266^{7.42}. Das Modell mit den gedockten Agonisten ist in Abb. 25A-D dargestellt. Für die Interaktion mit Strychnin (Abb. 25B) ist nach dem Modell eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen S85^{3.29} und dem Carbonylsauerstoff des Strychnins möglich. Nach diesem Modell liegt eine π -Kation-Interaktion zwischen dem protonierten N19 (siehe Nummerierung Abb. 14) des Strychnins und W88^{3.32} vor, sowie eine Wasserstoffbrückeninteraktion zwischen dem N19 und Y239^{6.51}. Die TM 5 in diesem Modell befindet sich in räumlicher Nähe zu den gedockten Agonisten, sodass Seitenketten der Aminosäurepositionen aus dieser TM mit Strychnin bzw. anderen Agonisten interagieren können. Die Aminosäureposition Q175^{5.40} aus TM 5 befindet sich in einem Abstand von 3,6 Å, sodass, in Übereinstimmung mit den experimentellen Daten (Abb. 24 und Tab. 9), eine sterische Hinderung möglich ist. Die Interaktion zwischen Parthenolid und dem Rezeptor (Abb. 25C) ist – laut dem Modell – über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Carbonylsauerstoff des Lacton-Ringes und den

Positionen W88^{3.32} und N92^{3.36} möglich. Weitere Wasserstoffbrückenbindungen können sich nach dem Modell zwischen dem Lacton-Ringsauerstoff und W88^{3.32}, sowie der Aminosäurehauptkette an Position V89^{3.33} ausbilden. In Übereinstimmung mit den experimentellen Daten für die Position S85^{3.29} (Abb. 18 und Tab. 7) befindet sich die OH-Gruppe des Serins in einem Abstand von 3,76 Å, was eine sterische Hinderung ermöglicht. Für die Interaktion mit Denatonium (Abb. 25D) ist nach diesem Modell eine π -Kation-Interaktion zwischen der Position W88^{3.32} und dem Stickstoff des quartärenamins vorhanden. Für den Carbonylsauerstoff im Denatonium und Position Q175^{5.40}, sowie für das sekundäre Aminstickstoffatom im Denatonium und Position Y239^{6.51}, werden Wasserstoffbrückenbindungen vorhergesagt.

Daneben zeigt das Modell Positionen an, die in räumlicher Nähe zu den Agonisten liegen (nicht abgebildet) und dementsprechend über Van-der-Waals-, hydrophobe- und andere intermolekulare Wechselwirkungen interagieren können. Eine Übersicht der entsprechenden Positionen für die einzelnen Agonisten ist in Tab. 10 aufgelistet.

Tab. 10: Positionen im hTAS2R10-Agonisten-Docking-Modell in räumlicher Nähe zu den Agonisten

Aufgelistet sind die Positionen die sich nach dem Modell in räumlicher Nähe zu dem jeweiligen Agonisten befinden, aber bei denen keine konkrete Wechselwirkung vorhergesagt wird.

Agonist	Positionen
Strychnin	V89 ^{3.33} ; Q93 ^{3.37} ; I147 ^{4.62} ; Q175 ^{5.40} ; L178 ^{5.43} ; N179 ^{5.44} ; V182 ^{5.47} ; F240 ^{6.52} ; M243 ^{6.55} ; M263 ^{7.39}
Parthenolid	S85 ^{3.29} ; Q93 ^{3.37} ; I147 ^{4.62} ; Q175 ^{5.40} ; L178 ^{5.43} ; N179 ^{5.44} ; V182 ^{5.47} ; Y239 ^{6.51} ; F240 ^{6.52} ; M243 ^{6.55} ; M263 ^{7.39}
Denatonium	S85 ^{3.29} ; V89 ^{3.33} ; L178 ^{5.43} ; N179 ^{5.44} ; V182 ^{5.47} ; F240 ^{6.52} ; M243 ^{6.55} ; L259 ^{7.35} ; M263 ^{7.39}

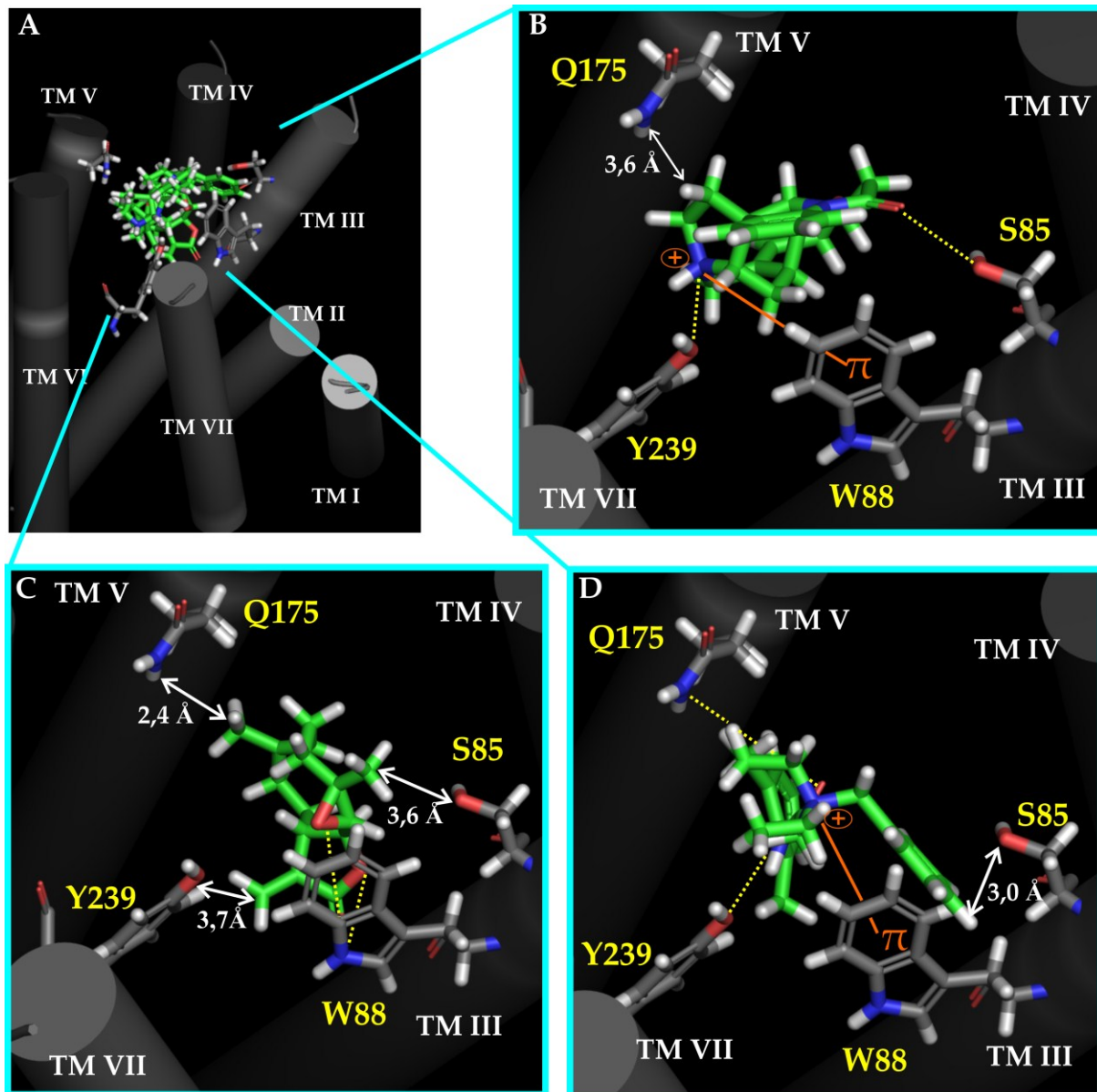


Abb. 25: Agonisten-Docking im hTAS2R10

Das 3D-Modell des hTAS2R10 basierend auf dem den β 2-adrenergen Rezeptor in einer leicht angewinkelten Aufsicht (A-D) zunächst als Überblick (A). Die Transmembrandomänen (TM) sind in unterschiedlichen Grautönen als Zylinder dargestellt und mit römischen Zahlen nummeriert. Wasserstoffbrückenbindungen wurden in Form von gelb gestrichelten Linien und π -Interaktionen in Form von orangefarbenen Linien dargestellt. Abgebildet sind die gedockten Agonisten Strychnin (B), Parthenolid (C) und Denatoniumbenzoat (D) mit Kohlenstoffatomen in grün, mit Sauerstoffatomen in rot, mit Stickstoffatomen in blau und mit Wasserstoffatomen in weiß. Die für die Agonisten-Interaktion als besonders wichtig identifizierten Aminosäurepositionen sind wie folgt dargestellt: C-Atome: grau, H-Atome: weiß, O-Atome: rot, N-Atome: blau. Die eingezeichneten Pfeile zeigen lediglich die Punkte an, von denen aus der Abstand gemessen wurde und sind nicht maßstabsgetreu. Der tatsächlich gemessene Abstand steht jeweils daneben.

3.1.8 Experimentelle Überprüfung des *In-silico*-Agonisten-Dockings

Die Kontrolle des Agonisten-Dockings erfolgte über Mutagenese von W88^{3.32} und Y239^{6.51} für die im Docking-Modell spezielle Wechselwirkungen vorhergesagt wurden (π -Kation-Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen). Diese Aminosäurepositionen wurden noch nicht im Detail untersucht. Die Mutagenese dieser Positionen zu Alanin (Abschnitt 3.1.3) zeigt bereits, dass die Seitenketten dieser Aminosäurepositionen einen Einfluss auf die Agonisteninteraktion besitzen. Im folgenden Abschnitt wird die detaillierte Analyse dieser Positionen beschrieben. Für die Untersuchung der Interaktionen von W88^{3.32} standen, auf Grund der natürlichen Begrenzung auf 20 proteinogene Aminosäuren, keine Aminosäuren zur Verfügung, die nur eine Eigenschaft des Tryptophans (Möglichkeit für Wasserstoffbrückeninteraktion und π -Interaktion) besitzt, um die vorhergesagten Interaktionen präzise nachweisen zu können. W88^{3.32} wurde zunächst zu Phenylalanin mutiert (Abb. 26A). Phenylalanin kann, wie Tryptophan, π -Interaktionen über das delokalisierte π -Elektronensystem des Benzolrings eingehen. Diese Fähigkeit ist jedoch schwächer ausgebildet als bei Tryptophan (Dougherty 1996). Phenylalanin ist außerdem kleiner als Tryptophan und unpolar. Es geht somit keine Wasserstoffbrückenbindungen ein. Es wurde dementsprechend erwartet, dass mit der Mutation zu Phenylalanin die Rezeptormutante nicht mehr auf Parthenolid reagiert (auf Grund fehlender Wasserstoffbrückenbindung) und die Reaktion auf Strychnin und Denatoniumbenzoat deutlich eingeschränkt ist (schwächere π -Interaktion). Abb. 26B und Tab. 11 zeigt, dass die W88^{3.32}F-Mutante (rote Kurve) nicht mehr auf Parthenolid reagierte. Dasselbe traf auch auf die Stimulation mit Strychnin zu. Für die Stimulation mit Denatoniumbenzoat konnte eine äußerst schwache Aktivierung festgestellt werden (Abb. 26C, linke Kurve). Diese Aktivierung war jedoch nicht signifikant höher als die der MOCK-Kontrolle (Tab. 11). Daneben wurde W88^{3.32} auch zu Histidin mutiert (Abb. 26A). Histidin hat eine deutlich schwächere Neigung zur Ausbildung von π -Interaktionen (Mecozzi *et al.* 1996), besitzt jedoch wie Tryptophan ein heterocyclisches aromatisches, wenn auch kleineres Ringsystem und hat die Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Des Weiteren ist der im Histidin enthaltene Imidazolring relativ basisch, da bei der Protonierung eine resonanzstabilisierte Spezies entsteht (Vollhardt *et al.* 2005). Diese basischen und polaren Eigenschaften von Histidin, im Gegensatz zum ungeladenen Tryptophan, ließen die Erwartung zu, dass die Mutation zu Histidin nicht nur auf Grund der geringeren Größe – und damit verbundenen größeren Abstand zum Agonisten – zu einer verschlechterten Aktivierung führt, sondern zu einem totalen Funktionsverlust. Wie in

Abb. 26B (blaue Kurve) und in Tab. 11 ersichtlich, traf das auch für die Stimulation mit den Agonisten Parthenolid und Denatoniumbenzoat zu. Für die Aktivierung mit Strychnin im hohen Konzentrationsbereich ($>100 \mu\text{M}$) konnte eine leichte, jedoch im Vergleich zur Leerkontrolle nicht signifikante Aktivierung beobachtet werden (Abb. 26C rechts und Tab. 11). Der Funktionsverlust nach dem Aminosäureaustausch zeigte, dass die Interaktionen zwischen W88^{3,32} und den Agonisten über π -Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen demnach möglich sind. Auf Grund der oben beschriebenen Begrenzung in der Auswahl der Aminosäuren, konnten diese Interaktionen nicht zweifelsfrei bewiesen werden.

Tab. 11: Pharmakologische Parameter und Expressionsraten der W88^{3,32}- und Y239^{6,51} Konstrukte im Vergleich

Aufgelistet sind die Phenylalanin- und Histidin-Rezeptormutanten der Position W88^{3,32}, die Phenyl-Rezeptormutante der Position Y239^{6,51}, sowie der hTAS2R10-Wildtyp (WT) mit ihren Schwellenwerten (SW) in μM , ihren maximalen Amplituden (Max. Ampl.) und dem Mittelwert der EC₅₀-Werte in μM , inklusive der Standardabweichung für die entsprechenden Agonisten. Die Anzahl der Messungen wird mit „n“ angegeben. Die in grau dargestellten maximalen Amplituden waren nicht signifikant höher als die der MOCK-Kontrolle. Die statistische Auswertung der maximalen Amplituden erfolgte als *One-way*-ANOVA und *Tukey post-hoc*-Test bei 95 % Konfidenzintervall stets im Vergleich zum WT-Rezeptor (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Die statistische Auswertung der EC₅₀-Werte erfolgte als Kruskal-Wallis-Test im Vergleich zum jeweiligen WT-Rezeptor. Zusätzlich sind die Expressionsraten in % aufgelistet. Die statistische Auswertung der Expressionsraten erfolgte ebenfalls als *One-way*-ANOVA und *Tukey post-hoc*-Test bei 95 % Konfidenzintervall stets im Vergleich zum jeweiligen WT-Rezeptor.

hTAS2R10-	Strychnin				Parthenolid			
	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC50 / [μM]	n	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC50 / [μM]	n
WT	3	0,522 (+/-0,118)	33 (+/-24)	60	10	0,466 (+/-0,140)	69 (+/-26)	54
-W88F	-	-	-	5	-	-	-	4
-W88H	-	0,092 (+/-0,030) ***	-	3	-	-	-	3
-Y239F	-	-	-	6	-	-	-	5
hTAS2R10-	Denatoniumbenzoat				Expressionsrate			
	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC50 / [μM]	n	MW / [%]	n		
WT	10	0,639 (+/-0,188)	59 (+/-30)	58	13 (+/-7,9)	12		
-W88F	-	0,095 (+/-0,039) ***	-	4	5 (+/-1,5)	2		
-W88H	-	-	-	3	4 (+/-1,5)	6		
-Y239F	-	0,112 (+/-0,040) ***	-	5	7 (+/-5,0)	4		

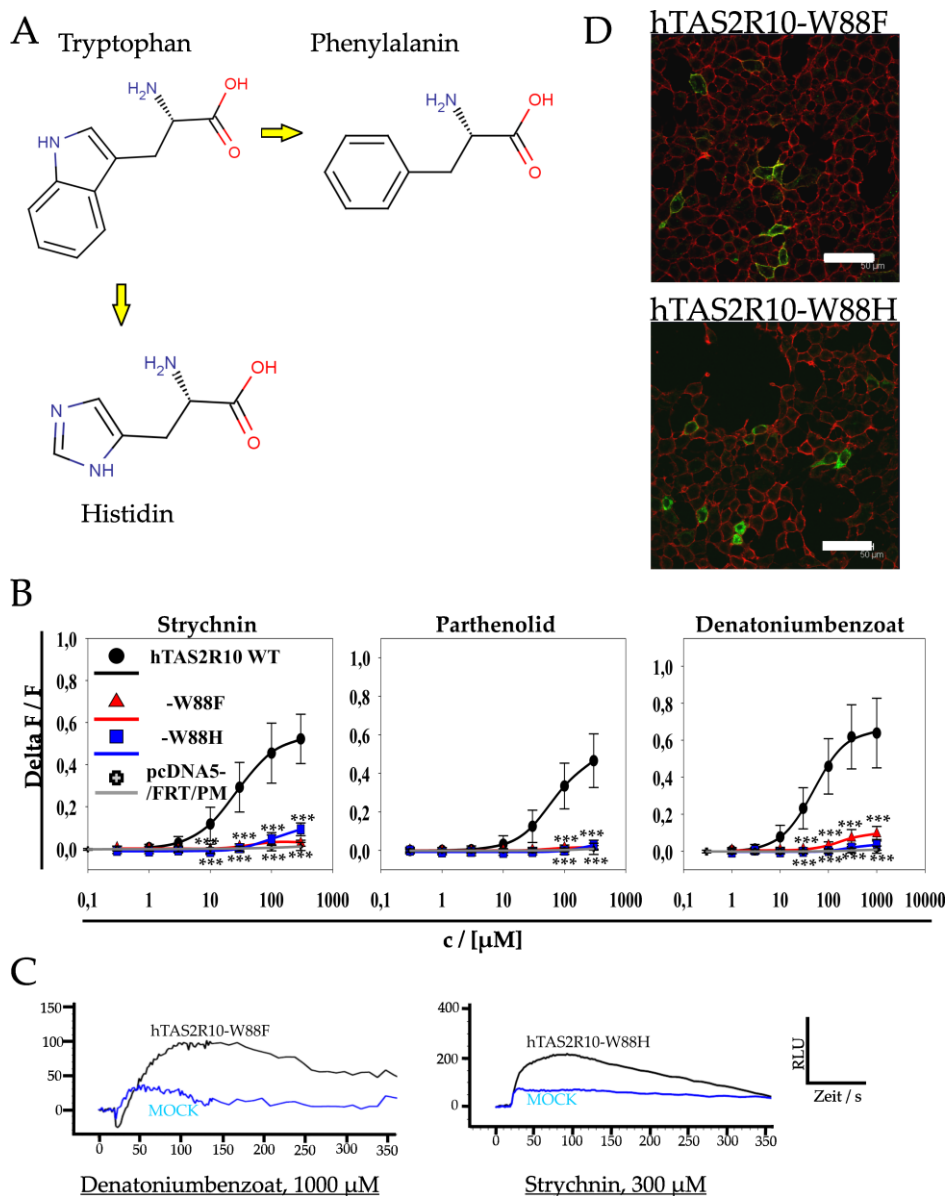


Abb. 26: W88^{3,32}-Mutagenese

(A) Die Position W88^{3,32} wurde zu Phenylalanin und zu Histidin mutiert. (B) Die Rezeptorwildtyp, Mutanten und MOCK exprimierenden Zellen wurden mit Strychnin (0,3-300 μ M), Parthenolid (0,3-300 μ M) und Denatoniumbenzoat (1-1000 μ M) stimuliert und die resultierenden $\Delta F/F$ -Werte (Y-Achse) gegen die Agonistenkonzentration (X-Achse) aufgetragen. Die Graphen stellen die Ergebnisse wiederholter Experimente dar. Die statistische Auswertung erfolgte als *One-way-ANOVA* und *Tukey post-hoc-Test* bei 95 % Konfidenzintervall (***) $p < 0,001$) stets im Vergleich zum WT-Rezeptor. (C) *Calcium-Imaging*-Signale von der W88^{3,32}F-Rezeptormutante mit Denatoniumbenzoat mit MOCK-Korrektur (links) und das W88^{3,32}H-Konstrukt, stimuliert mit Strychnin ohne MOCK-Korrektur (rechts). (D) Zellen, die die entsprechenden Rezeptormutanten exprimieren wurden fixiert und der C-terminale HSV-Epitop (grün), sowie die Zellmembran (rot) nachgewiesen. Die Auswertung der Färbung erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Abgebildet ist exemplarisch nur ein Bild der Überlagerung der F- und H-Mutante. Die Bilder wurden mit folgenden Parametern aufgenommen: 40fach Objektiv, 1,5facher digitale Vergrößerung, Maßstab (weißer Balken): 50 μ m.

Zusätzlich wurden die W88^{3.32}-Konstrukte auch immunzytochemisch charakterisiert (Abb. 26D und Tab. 11). Es konnte kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp (Abb. 17 und Tab. 11) in Lokalisation und Expressionsrate festgestellt werden.

Eine weitere zu untersuchende Position war Y239^{6.51}, für die das *Docking*-Modell eine Wasserstoffbrückeninteraktion mit Strychnin und Denatoniumbenzoat (Abb. 25B und D) prognostiziert hat. Diese wurde zu Phenylalanin mutiert (Abb. 27A), welches keine Wasserstoffbrückenbindungen eingehen kann (keine OH-Gruppe im Vergleich zum Tyrosin). Es wurde daher erwartet, dass die Reaktion der Mutante nach Stimulation mit diesen beiden Agonisten reduziert ist. Wie in Abb. 27B zu sehen, war keine Reaktion auf Strychnin für die Y239^{6.51}-Mutante (rote Kurve) messbar. Die Reaktion auf Denatoniumbenzoat war stark reduziert und nicht mehr signifikant höher als die der Leerkontrolle (Abb. 27B und Tab. 11), jedoch noch schwach vorhanden wie in Abb. 27C ersichtlich. Wider erwarten war auch die Reaktion auf Parthenolid nicht mehr messbar (Abb. 27B und Tab. 11). Für die Interaktion zwischen Y239^{6.51} und den Agonisten Strychnin und Denatoniumbenzoat konnte demnach gezeigt werden, dass die prognostizierte Interaktion möglich ist. Die Y239F-Rezeptormutante wurde ebenfalls immunzytochemisch charakterisiert (Abb. 27D und Tab. 11). Es konnte weder in Lokalisation, noch in Expressionsrate ein signifikanter Unterschied zum Wildtyprezeptor (Abb. 17 und Tab. 11) beobachtet werden.

Der nicht erwartete Verlust der Rezeptorreaktion auf den Parthenolidstimulus könnte unterschiedliche Ursachen haben. Verschiedene Möglichkeiten werden im nächsten Kapitel diskutiert. Alle dort diskutierten Möglichkeiten bestätigen, dass das Modell plausibel ist.

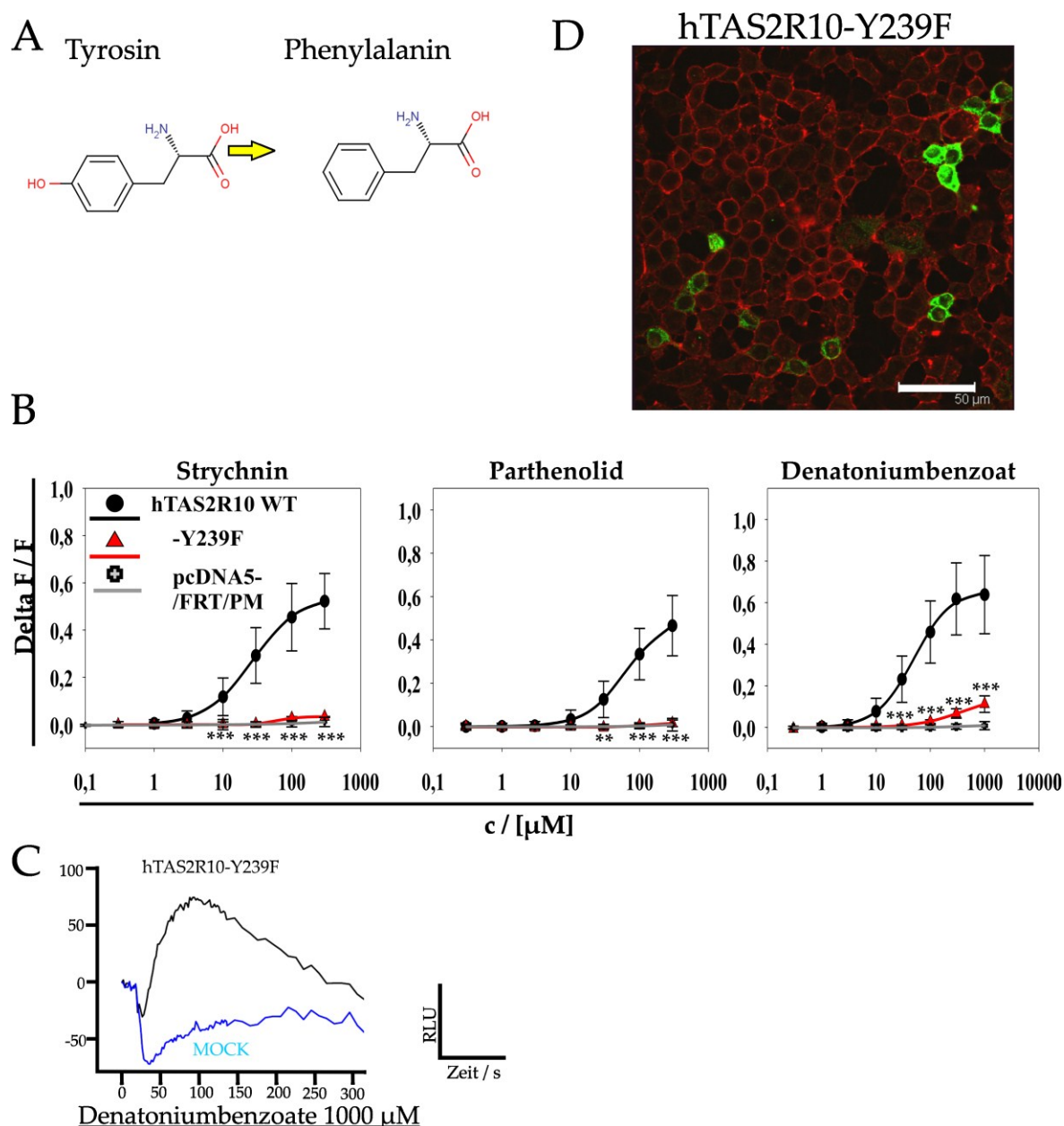


Abb. 27: Charakterisierung der hTAS2R10-Y239^{6.51}F-Mutante

(A) Die Position Y239^{6.51} wurde zu Phenylalanin mutiert. (B) Die Rezeptorwildtyp, Rezeptormutante und MOCK exprimierenden Zellen wurden mit Strychnin (0,3-300 μM), Parthenolid (0,3-300 μM) und Denatoniumbenzoat (1-1000 μM) stimuliert und die resultierenden $\Delta F/F$ -Werte (Y-Achse) gegen die Agonistenkonzentration (X-Achse) aufgetragen. Die Graphen stellen die Ergebnisse wiederholter Experimente dar. Die statistische Auswertung erfolgte als *One-way-ANOVA* und *Tukey post-hoc-Test* bei 95 % Konfidenzintervall (***) $p < 0,001$) stets im Vergleich zum WT-Rezeptor. (C) *Calcium-Imaging*-Signale von der Y239F-Mutante stimuliert mit Denatoniumbenzoat. Dargestellt ist das Rezeptormutantensignal nach MOCK-Korrektur. (D) Zellen, die die entsprechenden Rezeptormutanten exprimieren wurden fixiert und der C-terminale HSV-Epitop (grün), sowie die Zellmembran (rot) nachgewiesen. Die Auswertung der Färbung erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Abgebildet ist exemplarisch nur ein Bild der Überlagerung der Phenylalaninrezeptormutante. Das Bild wurde mit folgenden Parametern aufgenommen: 40fach Objektiv, 1,5facher digitale Vergrößerung, Maßstab (weißer Balken): 50 μm .

3.2 Vergleichende Betrachtung der Agonisteninteraktion zwischen hTAS2R10 und mTas2r105

Die in Abschnitt 3.1 gewonnenen Erkenntnisse zur Interaktion des hTAS2R10 mit der kleinen Auswahl an untersuchten Agonisten, sollte anhand eines möglichst homologen Bittergeschmacksrezeptors überprüft werden, der deorphanisiert ist und sich nur in der Aktivierung durch einen der untersuchten Agonisten unterscheidet. Ein Rezeptor der diese Kriterien erfüllte ließ sich jedoch nicht unter den humanen Bittergeschmacksrezeptoren finden. Die am meisten homologen humanen Bittergeschmacksrezeptoren zum hTAS2R10 (hTAS2R7, -R8 und -R9) besitzen lediglich eine Sequenzhomologie von ~40 % auf der Aminosäureebene (entsprechend Abb. 28). Ein deorphanisierter Rezeptor mit einer Aminosäuresequenzhomologie von 53 % (entsprechend Abb. 28) ist jedoch der murine Bittergeschmacksrezeptor mTas2r105.

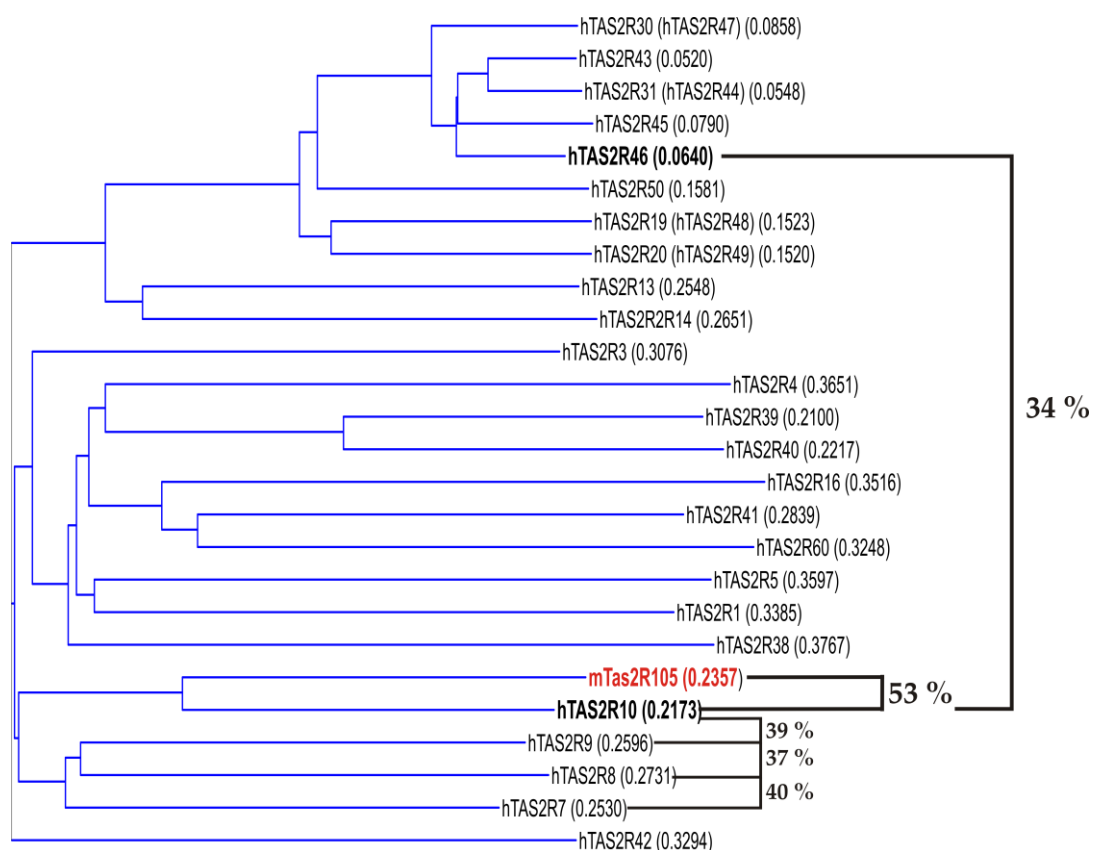


Abb. 28: Dendrogramm der humanen Bittergeschmacksrezeptoren und des mTas2r105

Dendrogramm auf Grundlage eines Homologievergleichs der Aminosäuresequenz humaner Bittergeschmacksrezeptoren und des murinen Bittergeschmacksrezeptors mTas2r105

Dieser Rezeptor reagiert auf Cycloheximid (Struktur befindet sich im Anhang Tab. 18), lässt sich jedoch nicht durch Strychnin aktivieren ((Chandrashekar *et al.* 2000; Bufe *et al.* 2002), sowie eigene Messungen entsprechend Abb. 29). Des Weiteren reagiert dieser Rezeptor auf Parthenolid und Denatoniumbenzoat (eigene Messungen, entsprechend Abb. 29).

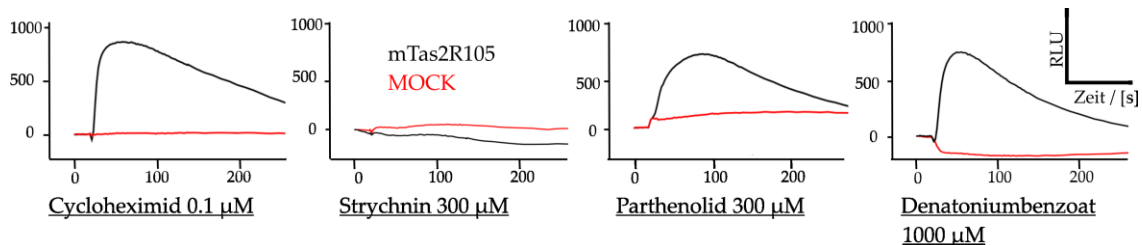


Abb. 29: Reaktion des mTas2r105 auf Cycloheximid, Strychnin, Parthenolid und Denatoniumbenzoat

Transient mTas2r105 (schwarz) und pcDNA5/FRT/PM (MOCK, rot) exprimierende Zellen wurden mit Cycloheximid (0.1 µM), Strychnin (300 µM), Parthenolid (300 µM) oder Denatoniumbenzoat (1000 µM) stimuliert und die resultierende intrazelluläre Ca^{2+} Freisetzung als Spur von Fluoreszenzsignalen gemessen. RLU = relative Lichteinheiten

3.2.1 Bittergeschmacksrezeptorchimären zwischen hTAS2R10 und mTas2r105

Um zu ermitteln welche Transmembrandomänen (TM) wichtig für die Strychnininteraktion sind, wurden Rezeptorchimären bestehend aus Teilen des humanen Bittergeschmacksrezeptor hTAS2R10 und des murinen Bittergeschmacksrezeptors mTas2r105 konstruiert (Abb. 30). Dabei wurde u.a. der Bereich ab der unteren Hälfte von TM 3 des hTAS2R10 gegen den korrespondierenden Bereich des mTas2r105 ausgetauscht (Chimäre R10-105 CH1.1 in Abb. 30). Eine weitere Chimäre bestand aus dem hTAS2R10 bis zur Hälfte der 3. intrazellulären Schleife und dem folgenden Bereich des mTas2r105 (Chimäre R10-105 CH1.2 in Abb. 30). Umgekehrt wurden diese Bereiche im mTas2r105 auch gegen die des hTAS2R10 ausgetauscht (Chimäre R105-10 CH2.1 und Chimäre R105-R10 CH2.2 in Abb. 30). Eine weitere Chimäre bestand aus der TM 4 und 5 des hTAS2R10 und den TM 1 bis 3 und 6 bis 7 des mTas2r105 (Chimäre CH3 in Abb. 30). Umgekehrt wurden diese TM im hTAS2R10 auch gegen die des mTas2r105 ausgetauscht (Chimäre CH4 in Abb. 30). Mit diesen Chimären, sowie den entsprechenden Wildtyprezeptoren, wurden HEK293T_{Gα16Gust44}-Zellen in 96-Loch-Platten transient transfiziert (Abschnitt 2.3.5). Diese Zellen wurden nach Stimulation mit Strychnin (0,3-300 µM), sowie den Substanzen Parthenolid (0,3-300 µM), Denatoniumbenzoat (1-1000 µM) und Cycloheximid (0,0003-1000 µM) mittels *Ca-Imaging*-

Analyse in einem 96-Loch-Platten-Lesegerät (Abschnitt 2.4) auf ihre Reaktion hin gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 31 und Tab. 12 abgebildet.

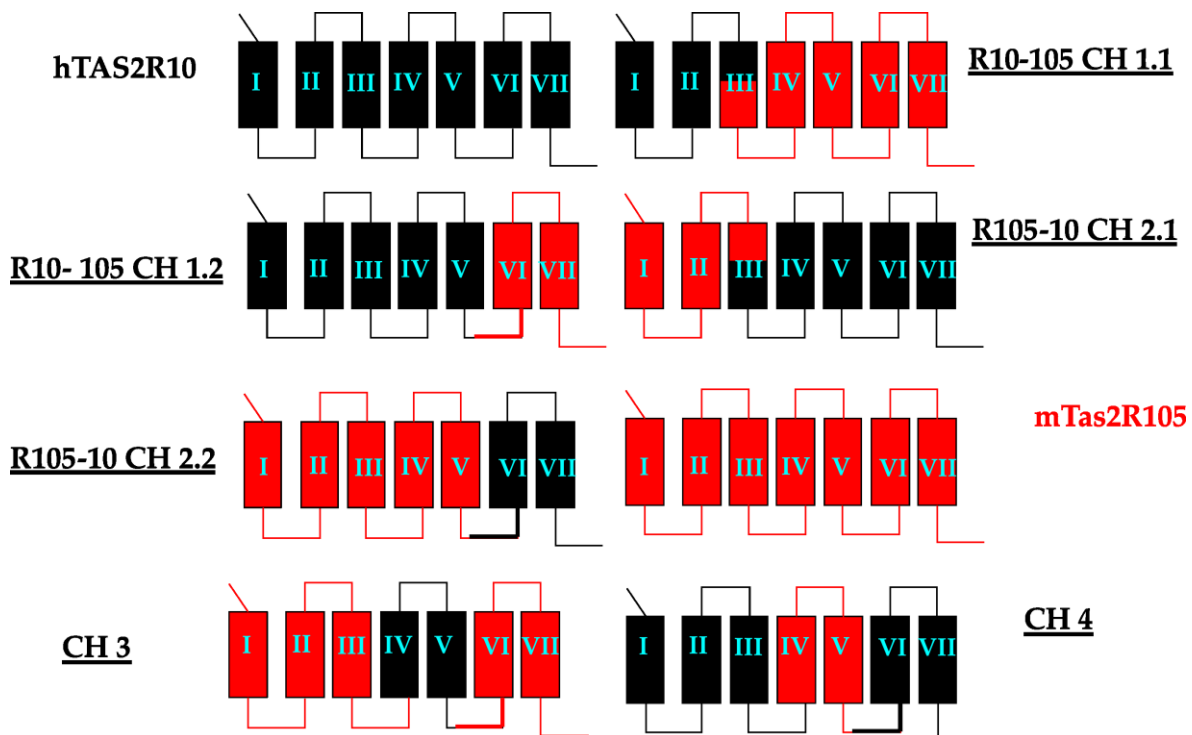


Abb. 30: Bittergeschmacksrezeptorchimären zwischen dem hTAS2R10 und mTas2r105

Die schwarzen Bereiche zeigen die des hTAS2R10 und die roten Bereiche, die des mTas2r105. Die Transmembrandomänen sind mit römischen Zahlen nummeriert.

Wie in Abb. 31A und in Tab. 12 abgebildet, zeigten keiner der Rezeptorchimären eine Reaktion auf die Stimulation mit den Agonisten Strychnin, Parthenolid und Denatoniumbenzoat. Die Chimären R10-R105 CH1.1, -CH1.2, R105-R10 CH2.1, -CH2.2 und CH4 zeigten außerdem auch keine Reaktion auf die Stimulation mit Cycloheximid. Der EC_{50} -Wert für die Chimäre CH3 war mit $68 (+/-21) \mu\text{M}$ 1000fach größer als der des mTas2r105 Wildtyps ($0.062 +/-0.048 \mu\text{M}$). Auch die Aktivierung durch Cycloheximid (Abb. 31A) war deutlich verringert im Vergleich zum mTas2r105 Wildtyp. Auch die maximale Amplitude der Chimäre war im Vergleich zur Amplitude des mTas2R105-WT-Rezeptors verringert.

Neben der pharmakologischen Charakterisierung wurden die Chimären auch immunzytochemisch charakterisiert. Dazu wurden die Chimären, sowie die Wildtyprezeptoren (mTasR105 und hTAS2R10) und MOCK transient exprimierende Zellen fixiert und der C-terminale HSV-Epitop (grün), sowie die Zellmembran (rot) nachgewiesen. Die Auswertung der Färbung erfolgte mittels inversem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Abgebildet sind exemplarisch nur die Bilder der Überlagerung von HSV-Epitop-

und Zellmembranfärbung der Chimären, des mTas2r105-Wildtyps und der Leerkontrolle (MOCK) (Abb. 31B). Der hTAS2R10 ist in Abb. 17 als auch in Abb. 34 abgebildet. In Tab. 12 sind die Mittelwerte der Expressionsraten im Vergleich zu den Wildtyprezeptoren aufgelistet. Die Expression, in Hinblick auf Expressionsmuster und -rate, unterschied sich sowohl zwischen den einzelnen Rezeptorchimären, als auch zwischen Rezeptorchimären und Wildtyprezeptoren hTAS2R10 und mTas2r105 stark. Sie reichten von 2 % der Expressionsrate für die Rezeptorchimäre R10-R105 CH1.2 bis hin zu 64 % für die Rezeptorchimäre CH4. Wie in Abb. 31B ersichtlich, unterscheidet sich auch die Lokalisation der Expression. So zeigten die Rezeptorchimären eine Lokalisation des Rezeptors, die sich gleichmäßig auf das Cytosol und die Membran zu verteilen scheint (CH1.1; CH2.1; CH2.2; CH3 und CH4, entsprechend Abb. 31B). Im Gegensatz dazu scheint die Lokalisation an der Membran bei den Wildtyprezeptoren mTas2r105 (Abb. 31B) und hTAS2R10 (Abb. 17 und Abb. 34) zu dominieren.

Demnach war es demnach nicht möglich die Rezeptoreigenschaften des hTAS2R10 und des mTas2R105 durch die Konstruktion von Chimären zu kombinieren bzw. auf den anderen Rezeptor zu übertragen. Durch die Konstruktion der Chimären wurden nicht nur die Rezeptoreigenschaften in Hinblick auf Agonisteninteraktion, sondern auch auf Rezeptortransport, -stabilität und -faltung beeinflusst, was die Unterschiede in der immunzytochemischen Charakterisierung zeigten. Zur weiteren Analyse der unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften des hTAS2R10 und des mTas2R105 sind Punktmutationen nötig.

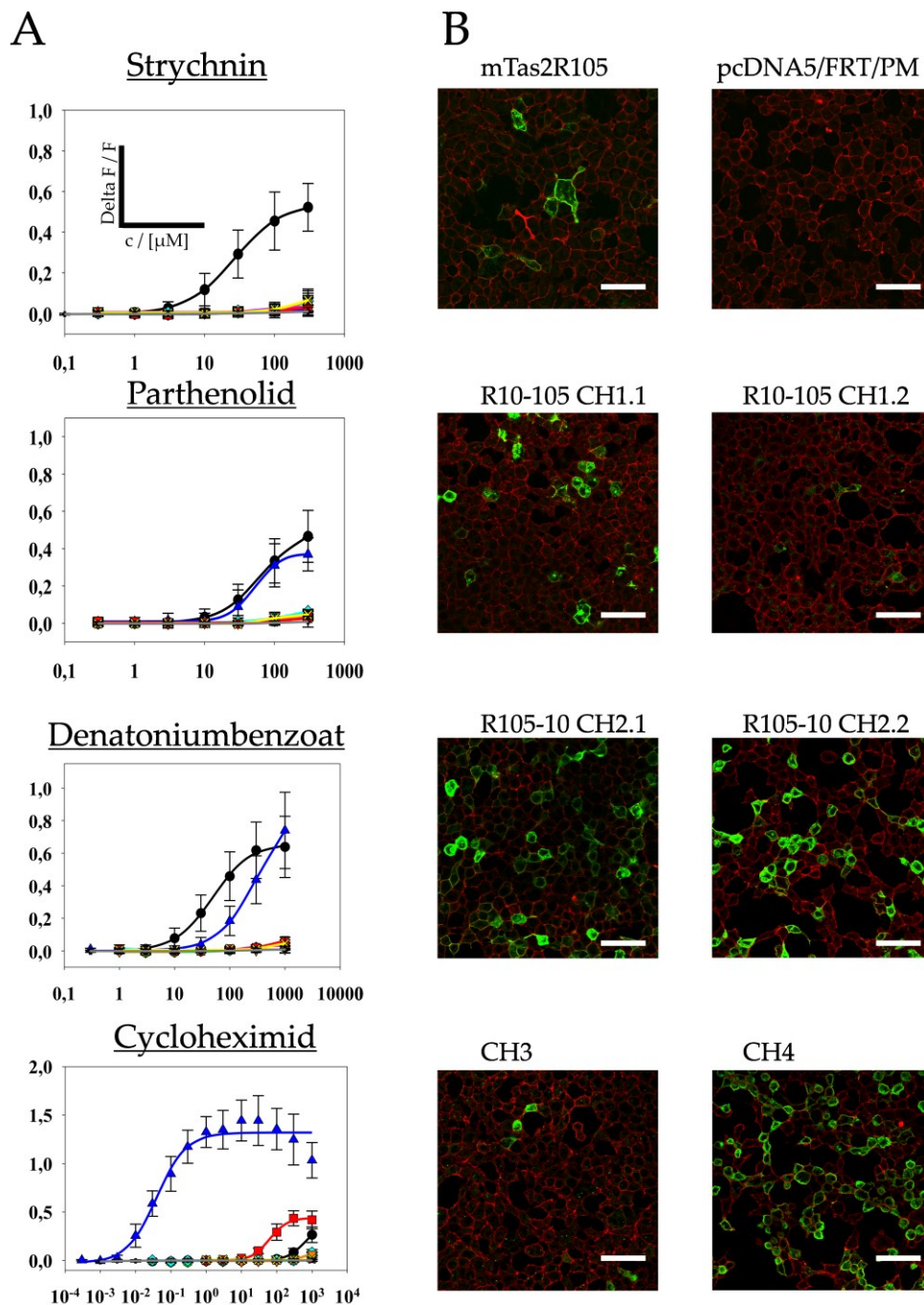


Abb. 31: Charakterisierung der hTAS2R10-mTas2r105-Chimären

(A) Die Rezeptorwildtyp (hTAS2R10 schwarz und mTas2r105 blau), Chimären (CH1.1: grün; CH1.2: pink; CH2.1: orange; CH2.2: cyan; CH3: rot und CH 4: gelb) und MOCK (grau) exprimierenden Zellen wurden mit Strychnin (0,3-300 μM), Parthenolid (0,3-300 μM), Denatoniumbenzoat (1-1000 μM) und Cycloheximid (0,0003-1000 μM) stimuliert und die resultierenden $\Delta F/F$ -Werte (Y-Achse) gegen die Agonistenkonzentration (X-Achse) aufgetragen. Die Graphen stellen die Ergebnisse wiederholter Experimente dar.

(B) mTas2r105-Wildtyp, Rezeptorchimären und MOCK transient exprimierende Zellen wurden fixiert und der C-terminale HSV-Epitop (grün), sowie die Zellmembran (rot) nachgewiesen. Die Auswertung der Färbung erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Abgebildet sind exemplarisch nur die Überlagerungen. Die Bilder wurden mit folgenden Parametern aufgenommen: 40fach Objektiv, 1,5facher digitale Vergrößerung, Maßstab (weißer Balken): 50 μm .

Tab. 12: Pharmakologische Parameter und Expressionsraten der Rezeptorchimären

Aufgelistet sind die Rezeptorchimären, sowie der hTAS2R10- und der mTas2r105-Wildtyp (WT) mit ihren Schwellenwerten (SW) in μM , ihren maximalen Amplituden (Max. Ampl.) und dem Mittelwert der EC_{50} -Werte in μM , inklusive der Standardabweichung für die entsprechenden Agonisten. Die Anzahl der Messungen wird mit „n“ angegeben. Zusätzlich sind die Expressionsraten der Chimären und der Wildtyprezeptoren in % aufgelistet.

Rezeptor-Wildtyp / Chimäre	Strychnin				Parthenolid				Expressionsrate	
	SW / $[\mu\text{M}]$	Max. Ampl.	EC_{50} / $[\mu\text{M}]$	n	SW / $[\mu\text{M}]$	Max. Ampl.	EC_{50} / $[\mu\text{M}]$	n	MW / [%]	n
hTAS2R10-WT	3	0,522 (+/-0,118)	33 (+/-24)	60	10	0,466 (+/-0,140)	69 (+/-26)	54	13 (+/-7,9)	12
mTas2R105-WT	-	-	-	23	30	0,369 (+/-0,089)	48 (+/-26)	23	7 (+/-4,4)	8
R10-R105-CH1.1	-	-	-	6	-	-	-	3	12 (+/-4,0)	2
R10-R105-CH1.2	-	-	-	6	-	-	-	3	2 (+/-0,9)	4
R105-R10-CH2.1	-	-	-	6	-	-	-	3	42 (+/-1,2)	2
R105-R10-CH2.2	-	-	-	6	-	-	-	3	21 (+/-5,5)	2
CH3	-	-	-	6	-	-	-	3	5 (+/-1,2)	2
CH4	-	-	-	6	-	-	-	3	64 (+/-5,3)	2
Rezeptor-Wildtyp / Chimäre	Denatoniumbenzoat				Cycloheximid					
	SW / $[\mu\text{M}]$	Max. Ampl.	EC_{50} / $[\mu\text{M}]$	n	SW / $[\mu\text{M}]$	Max. Ampl.	EC_{50} / $[\mu\text{M}]$	n		
hTAS2R10-WT	10	0,639 (+/-0,188)	59 (+/-30)	58	1000	0,266 (+/-0,080)	-	14		
mTas2R105-WT	100	0,740 (+/-0,234)	-	24	0,003	1,444 (+/-0,211)	0,062 (+/-)	14		
R10-R105-CH1.1	-	-	-	3	-	-	-	3		
R10-R105-CH1.2	-	-	-	3	-	-	-	3		
R105-R10-CH2.1	-	-	-	3	-	-	-	3		
R105-R10-CH2.2	-	-	-	3	-	-	-	3		
CH3	-	-	-	3	100	0,436 (+/-0,077)	68 (+/-21)	3		
CH4	-	-	-	3	-	-	-	4		

3.2.2 Vergleich von Positionen mit unterschiedlichen Aminosäuren zwischen hTAS2R10 und mTas2r105

Da die Konstruktion der Chimären keine weitere Information zur Interaktion zwischen Strychnin und den Rezeptoren ergab und auch nicht ermittelt werden konnte, worin der Grund im unterschiedlichen pharmakologischen Verhalten von hTAS2R10 und mTas2r105 liegt, wurden nun einzelne Positionen mit unterschiedlichen Aminosäuren verglichen. Dazu wurde zunächst als Hilfsmittel ein einfaches 3D-Homologiemodell des mTas2r105 auf Grundlage des hTAS2R10-3D-Modells (basierend auf dem β 2-adrenergen Rezeptor (Rasmussen *et al.* 2011), entsprechend Abschnitt 2.6) ohne weitere Energieminimierung berechnet. Das zu Grunde liegende *Alignment* ist im Anhang in Abb. 49 abgebildet. Anschließend wurde mittels Pymol (Schrödinger) die 3D-Struktur des hTAS2R10 inklusive gedocktem Strychnin über die 3D-Struktur des mTas2r105 gelegt und offensichtlich unterschiedliche Aminosäuren identifiziert, die das unterschiedliche Verhalten in Bezug auf die Interaktion mit Strychnin verursachen könnten (entsprechend Abb. 32).

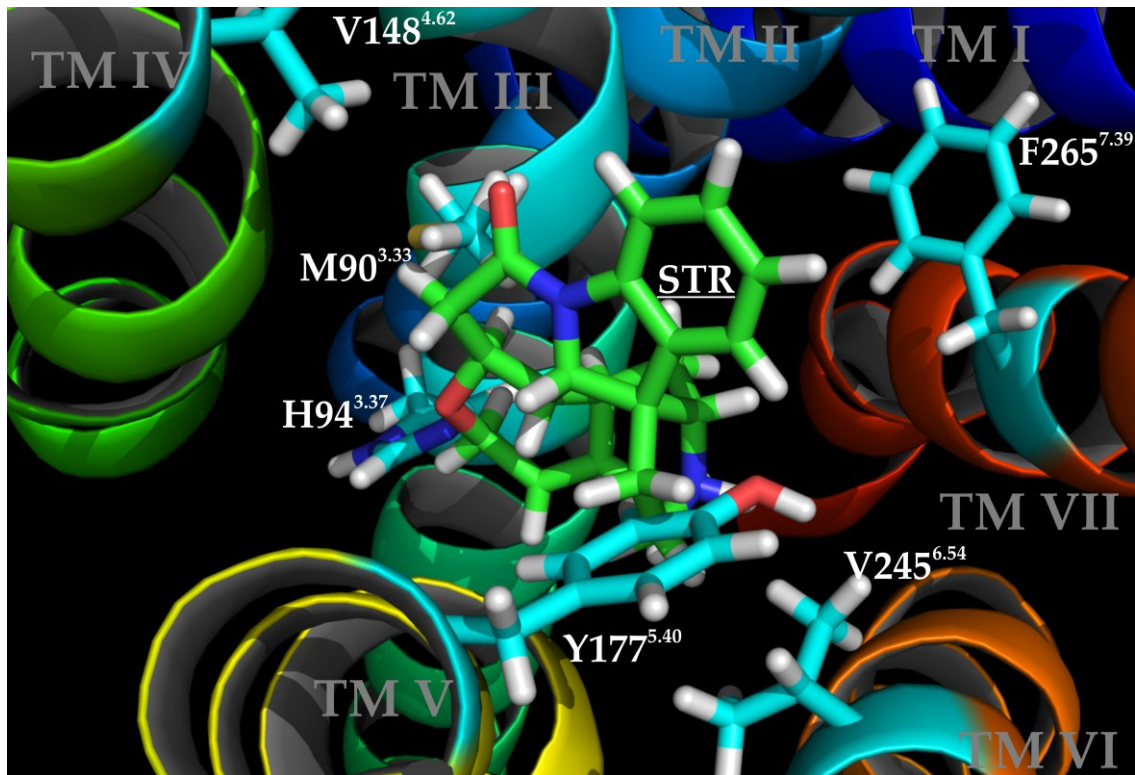


Abb. 32: Überlagerung der mTas2r105- und hTAS2R10-3D-Homologiemodelle

Das 3D-Homologiemodell des hTAS2R10 inklusive des gedockten Strychnins (STR) wurde mittels Pymol (Schrödinger) mit dem 3D-Homologiemodell des mTas2r105 überlagert. Abgebildet sind die zum hTAS2R10 unterschiedlichen Aminosäurepositionen in der Umgebung des Strychnins im mTas2r105-Modell. Die einzelnen Transmembrandomänen (TM I-VII) sind grau beschriftet und als Regenbogenfarbschema abgebildet. Die C-Atome sind in grün (Agonist) und cyan (Aminosäure), Wasserstoffatome in weiß, Sauerstoff in rot und Stickstoff in blau dargestellt.

Es wurden hierbei im mTas2r105 die zum hTASR10 korrespondierenden Positionen betrachtet, die nach Abb. 25B und Tab. 10 im hTAS2R10 mit der Strychnininteraktion in Zusammenhang stehen. Die zum hTAS2R10 unterschiedlichen Positionen sind: M90^{3.33}, H94^{3.37}, V148^{4.62}, Y177^{5.40}, V245^{6.55}, F265^{7.39} und A268^{7.42} (nicht abgebildet). Die Positionen mit dem vermuteten größten Einfluss auf die Strychninaktivierung waren dabei H94^{3.37}, Y177^{5.40} und F265^{7.39} (Störung der Interaktion). Diese wurden zu den entsprechenden Aminosäuren des hTAS2R10 (Q93^{3.37}, Q175^{5.40} und M263^{7.39}) mutiert. Im Gegenzug wurden diese Positionen im hTAS2R10 ebenfalls zu den entsprechenden Aminosäuren des mTas2r105 mutiert. Mit diesen Mutanten, sowie den entsprechenden Wildtyprezeptoren, wurden HEK293T_{Gal6Gust44}-Zellen in 96-Loch-Platten transient transfiziert (Abschnitt 2.3.5). Diese Zellen wurden nach Stimulation mit Strychnin (0,3-300 μ M), Parthenolid (0,3-300 μ M), Denatoniumbenzoat (1-1000 μ M) und Cycloheximid (0,0003-1000 μ M) mittels *Ca-Imaging*-Analyse in einem 96-Loch-Platten-Lesegerät (Abschnitt 2.4) auf ihre Änderungen im intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel hin gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 33 und Tab. 13

abgebildet. Wie in Abb. 33 und in Tab. 13 ersichtlich, konnte der Austausch von H94^{3.37} (\rightarrow Q Abb. 33 links), Y177^{5.40} (\rightarrow Q Abb. 33 Mitte) und F265^{7.39} (\rightarrow M Abb. 33 rechts) zu der entsprechenden Aminosäure im hTAS2R10 (an diesen Positionen) keine messbare Aktivierung durch Strychnin erzielen. Im Gegenzug führte der Austausch dieser Positionen im hTAS2R10 zu den Aminosäuren des mTas2r105 (an den entsprechenden Positionen) zu einer stark reduzierten Aktivierung (Q175^{5.40}Y Mitte) bzw. zu keiner Aktivierung durch Strychnin (Q93^{3.37}H links und M263^{7.39}F rechts) mehr. Der Austausch der Aminosäuren zu den jeweils entgegengesetzten Aminosäuren der entsprechenden Positionen, führte auch für die Stimulation mit Parthenolid zu einer Reduzierung in der Aktivierung (Abb. 33 links: hTAS2R10-Q93^{3.37}H und mTas2r105-H94^{3.37}Q) bzw. zu einem Verlust der Aktivierung durch Parthenolid (Abb. 33 Mitte und rechts: hTAS2R10-Q175^{5.40}Y und -M263^{7.39}F und mTas2r105-Y177^{5.40}Q und -F265^{7.39}M und Tab. 13). Für die Aktivierung mit Denatoniumbenzoat unterschied sich die mTas2r105-H94^{3.37}Q-Mutante nicht vom Wildtyp (Abb. 33 links, jedoch leicht verschlechterter Schwellenwert Tab. 13). Für alle anderen Austauschmutanten konnte entweder eine Reduktion der Aktivierung (hTAS2R10-Q93^{3.37}H und mTas2r105-Y177^{5.40}Q) oder keine Aktivierung mehr beobachtet werden (hTAS2R10-Q175^{5.40}Y und -M263^{7.39}F und mTas2r105-F265^{7.39}M). Der Aminosäureaustausch führte bei den hTAS2R10-Mutanten für die Stimulation mit Cycloheximid zu einem Funktionsverlust (entsprechend Abb. 33 und Tab. 13). Der hTAS2R10 Wildtyp reagierte auf Cycloheximid erst in einem hohen Konzentrationsbereich (Schwellenwert: 1000 μ M). Für die mTas2r105-H94^{3.37}Q-Mutante und die Aktivierung mit Cycloheximid konnte eine leichte signifikante Verschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve in einen höheren Konzentrationsbereich (Abb. 33 links) und zu einem höheren, jedoch nicht signifikant unterschiedlichen EC₅₀-Wert (0,134 +/- 0,068 μ M) im Vergleich, zum mTas2r105-Wildtyprezeptor (0,062 +/- 0,048 μ M), beobachtet werden. Für die mTas2r105-Y177^{5.40}Q-Mutante zeigte sich eine deutliche signifikante Verschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve in einen höheren Konzentrationsbereich (Abb. 33 Mitte) und zu einem höheren, jedoch nicht signifikant unterschiedlichen EC₅₀-Wert (2.68 +/- 0.52 μ M) im Vergleich zum Wildtyprezeptor. Die Position Y177^{5.40} im mTas2R105 ist demnach eine wichtige Position für die Interaktion mit Cycloheximid. Die Dosis-Wirkungs-Kurve für die mTas2r105-F265^{7.39}M-Mutante und die Aktivierung mit Cycloheximid war ebenfalls deutlich und signifikant in einen höheren Konzentrationsbereich im Vergleich zum Wildtyprezeptor verschoben (Abb. 33 rechts). Außerdem konnte eine geringere Aktivierung (kleinere Amplitude im Vergleich zum WT) beobachtet werden. Der EC₅₀-Wert der F265^{7.39}M-Mutante war mit 2,12 +/- 0,69 μ M höher als der des mTas2r105-

Wildtyprezeptors (0.062 +/-0.048 μM). Die Position F265^{7,39} ist demnach ebenfalls wichtig für die Interaktion mit Cycloheximid

Tab. 13: Pharmakologische Parameter und Expressionsrate der hTAS2R10- und mTas2r105-Konstrukte

Aufgelistet sind die Rezeptormutanten und der hTAS2R10-WT, sowie der mTas2r105-WT mit ihren Schwellenwerten (SW) in μM , ihren maximalen Amplituden (Max. Ampl.) und dem Mittelwert der EC₅₀-Werte in μM , inklusive der Standardabweichung für die entsprechenden Agonisten. Die Anzahl der Messungen wird mit „n“ angegeben. Die in grau dargestellten maximalen Amplituden waren nicht signifikant höher als die der MOCK-Kontrolle. Die statistische Auswertung der maximalen Amplituden erfolgte als *One-way*-ANOVA und *Tukey post-hoc*-Test bei 95 % Konfidenzintervall stets im Vergleich zum WT-Rezeptor (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001). Die statistische Auswertung der EC₅₀-Werte erfolgte als Kruskal-Wallis-Test im Vergleich zum jeweiligen WT-Rezeptor. Zusätzlich sind die Expressionsraten in % aufgelistet. Die statistische Auswertung der Expressionsraten erfolgte ebenfalls als *One-way*-ANOVA und *Tukey post-hoc*-Test bei 95 % Konfidenzintervall stets im Vergleich zum jeweiligen WT-Rezeptor.

Rezeptor-Wildtyp / -Mutante	Strychnin				Parthenolid			
	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC50 / [μM]	n	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC50 / [μM]	n
hTAS2R10-WT	3	0,522 (+/-0,118)	33 (+/-24)	60	10	0,466 (+/-0,140)	69 (+/-26)	54
-Q93H	-	-	-	4	300	0,310 (+/-0,074)	-	4
-Q175Y	300	0,170 (+/-0,035) ***	-	3	-	0,060 (+/-0,024) ***	-	3
-M263F	-	0,085 (+/-0,027) ***	-	6	-	0,078 (+/-0,041) ***	-	6
mTas2R105-WT	-	-	-	23	30	0,369 (+/-0,089)	48 (+/-26)	23
-H94Q	-	-	-	4	300	0,300 (+/-0,185)	-	4
-Y177Q	-	-	-	3	-	0,188 (+/-0,017)	-	3
-F265M	-	-	-	4	-	-	-	4
-M90V-H94Q-Y177Q-F265M-A268T	-	-	-	4	-	-	-	4
Rezeptor-Wildtyp / -Mutante	Cycloheximid				Denatoniumbenzoat			
	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC50 / [μM]	n	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC50 / [μM]	n
hTAS2R10-WT	1000	0,266 (+/-0,080)	-	14	10	0,639 (+/-0,188)	59 (+/-30)	58
-Q93H	-	-	-	3	1000	0,332 (+/-0,065)	-	4
-Q175Y	-	-	-	3	-	0,080 (+/-0,013) ***	-	3
-M263F	-	-	-	2	-	-	-	5
mTas2R105-WT	0.003	1,444 (+/-0,211)	0,062 (+/-0,048)	14	100	0,740 (+/-0,234)	-	24
-H94Q	0.01	1,601 (+/-0,189)	0,1344 (+/-)	4	300	0,726 (+/-0,289)	-	4
-Y177Q	1.00	1,576 (+/-0,097)	2,68 (+/-0,52)	4	1000	0,351 (+/-0,069)	-	3
-F265M	1.00	1,149 (+/-0,368) *	2,12 (+/-0,69)	5	-	0,066 (+/-0,052) ***	-	4
-M90V-H94Q-Y177Q-F265M-A268T	-	-	-	4	-	-	-	4
Rezeptor-Wildtyp / -Mutante	Expressionsrate							
	MW / [%]	n						
hTAS2R10-WT	13 (+/-7,9)	12						
-Q93H	20 (+/-8,2)	2						
-Q175Y	6 (+/-2,2)	4						
-M263F	9 (+/-2,1)	2						
mTas2R105-WT	7 (+/-4,4)	8						
-H94Q	6 (+/-3,7)	2						
-Y177Q	6 (+/-3,5)	3						
-F265M	4 (+/-2,8)	4						
-M90V-H94Q-Y177Q-F265M-A268T	2 (+/-0,2)	1						

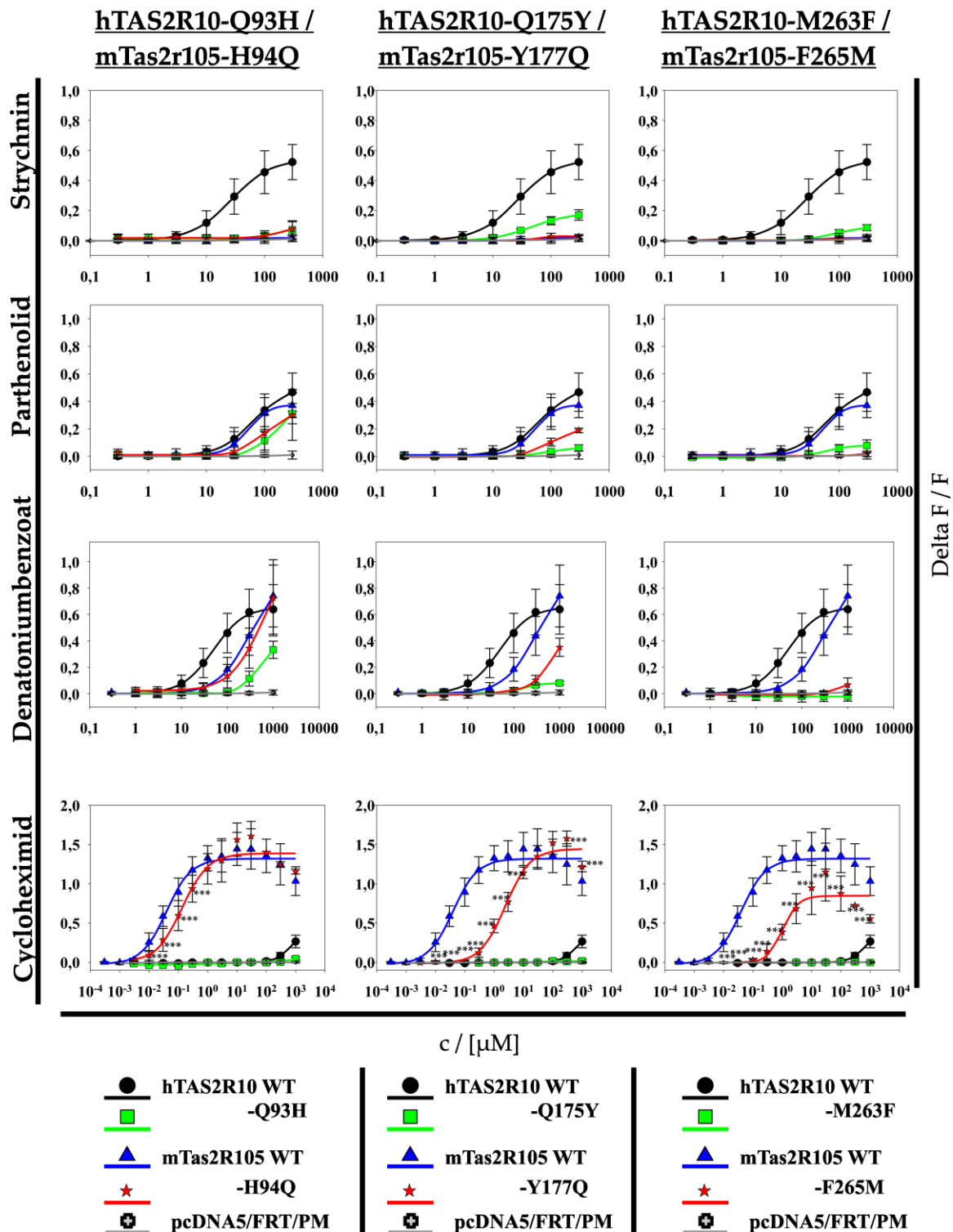


Abb. 33: Pharmakologische Charakterisierung der hTAS2R10- und mTas2r105-Mutanten

Die Rezeptorwildtyp (hTAS2R10 und mTas2r105), Rezeptormutanten (hTAS2R10-Q93^{3.37}H, -Q175^{5.40}Y, -M263^{7.39}F und mTas2r105-H94^{3.37}Q, -Y177^{5.40}Q, -F265^{7.39}M) und MOCK exprimierenden Zellen wurden mit Strychnin (0,3-300 μM), Parthenolid (0,3-300 μM), Denatoniumbenzoat (1-1000 μM) und Cycloheximid (0,0003-1000 μM) stimuliert und die resultierenden $\Delta F/F$ -Werte (Y-Achse) gegen die Agonistenkonzentration (X-Achse) aufgetragen. Die Graphen stellen die Ergebnisse wiederholter Experimente dar. Die statistische Auswertung für Cycloheximid und die mTas2r105-Mutanten erfolgte als *One-way-ANOVA* und *Tukey post-hoc-Test* bei 95 % Konfidenzintervall (***) $p < 0,001$) stets im Vergleich zum mTas2r105-WT-Rezeptor.

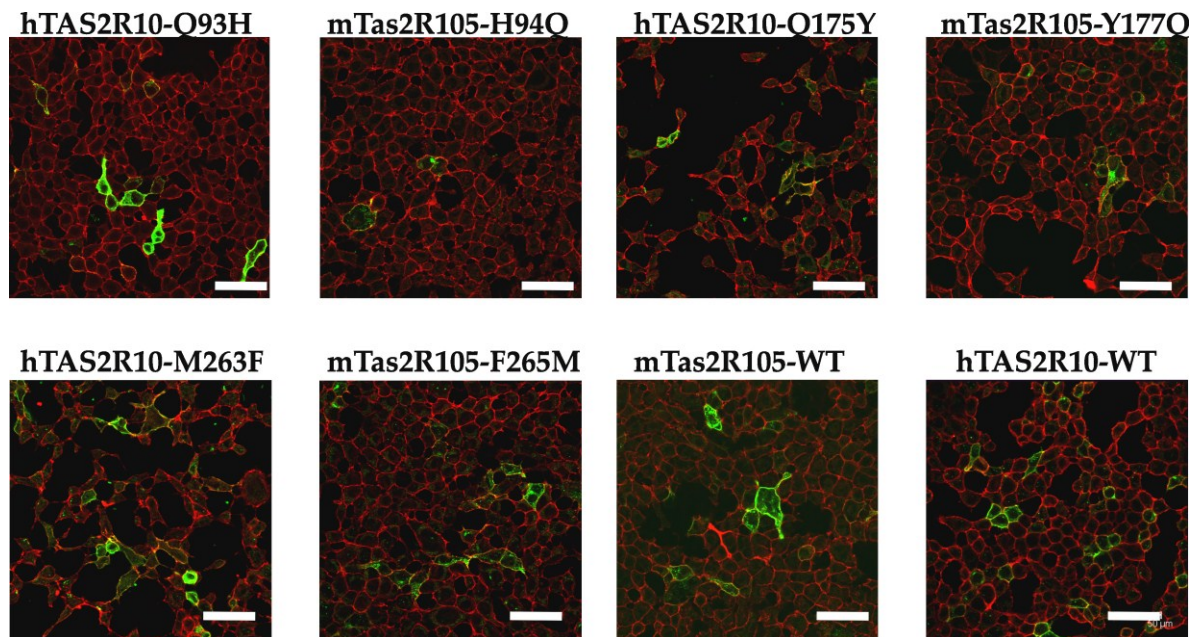


Abb. 34: Immunzytochemische Charakterisierung der hTAS2R10- und mTas2r105-Konstrukte

Zellen, die die Rezeptormutanten und die Rezeptorwildtypen exprimieren, wurden fixiert und der C-terminale HSV-Epitop (grün), sowie die Zellmembran (rot) nachgewiesen. Die Auswertung der Färbung erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Abgebildet sind exemplarisch nur Bilder der Überlagerung der Rezeptormutanten und der WT-Rezeptoren. Die Bilder wurden mit folgenden Parametern aufgenommen: 40fach Objektiv, 1,5facher digitale Vergrößerung, Maßstab (weißer Balken): 50 µm.

Zusätzlich zur pharmakologischen Charakterisierung wurden die Mutanten immunzytochemisch charakterisiert. Dazu wurden hTAS2R10- und mTas2r105-Mutanten, sowie den Wildtyprezeptoren und MOCK transient exprimierende Zellen fixiert und der C-terminale HSV-Epitop (grün), sowie die Zellmembran (rot) nachgewiesen. Abgebildet sind exemplarisch nur die Bilder der Überlagerung von HSV-Epitop- und Zellmembranfärbung der Mutanten im Vergleich zu den Wildtyprezeptoren (Abb. 34). In Tab. 13 sind die Mittelwerte der Expressionsraten im Vergleich zu den Wildtyprezeptoren aufgelistet. Die Wildtyprezeptoren und die Mutanten unterschieden sich weder in Expression (Abb. 34) noch in Expressionsrate (Tab. 13) signifikant voneinander.

Mit dem Austausch einzelner Positionen zwischen dem hTAS2R10 und dem mTas2r105 war es nicht möglich die Pharmakologie der Rezeptoren in Richtung des jeweils anderen Rezeptors zu verschieben. Da jeweils nur einzelne unterschiedliche Aminosäurepositionen ausgetauscht wurden, ist es möglich dass wichtige Aminosäuren für die Interaktion mit Strychnin fehlten. Es wurden daher alle für die Interaktion mit Strychnin potentiell wichtigen oder störenden Aminosäurepositionen im mTas2r105 gegen die des hTAS2R10 getauscht (M90^{3.33}→V, H94^{3.37}→Q, Y177^{5.40}→Q, F265^{7.39}→M, A268^{7.42}→T). Zellen, die die Mutante sowie die entsprechenden Wildtyprezeptoren exprimieren, wurden nach Stimulation mit

Strychnin (0,3-300 μM), Parthenolid (0,3-300 μM), Denatoniumbenzoat (1-1000 μM) und Cycloheximid (0,0003-1000 μM) mittels *Ca-Imaging-Analyse* (Abschnitt 2.4) auf ihre Änderung im intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel hin gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 35 und Tab. 13 abgebildet. Wie in Abb. 35A ersichtlich, zeigte die Rezeptormutante keinerlei Reaktion auf die Stimulation mit den Agonisten Strychnin, Parthenolid, Denatoniumbenzoat und Cycloheximid. Die immunzytochemische Charakterisierung der Rezeptormutante (Abb. 35B und Tab. 13) zeigte im Vergleich zum mTas2r105 Wildtyp (Abb. 34 und Tab. 13) eine geringere Expressionsrate, sowie eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation.

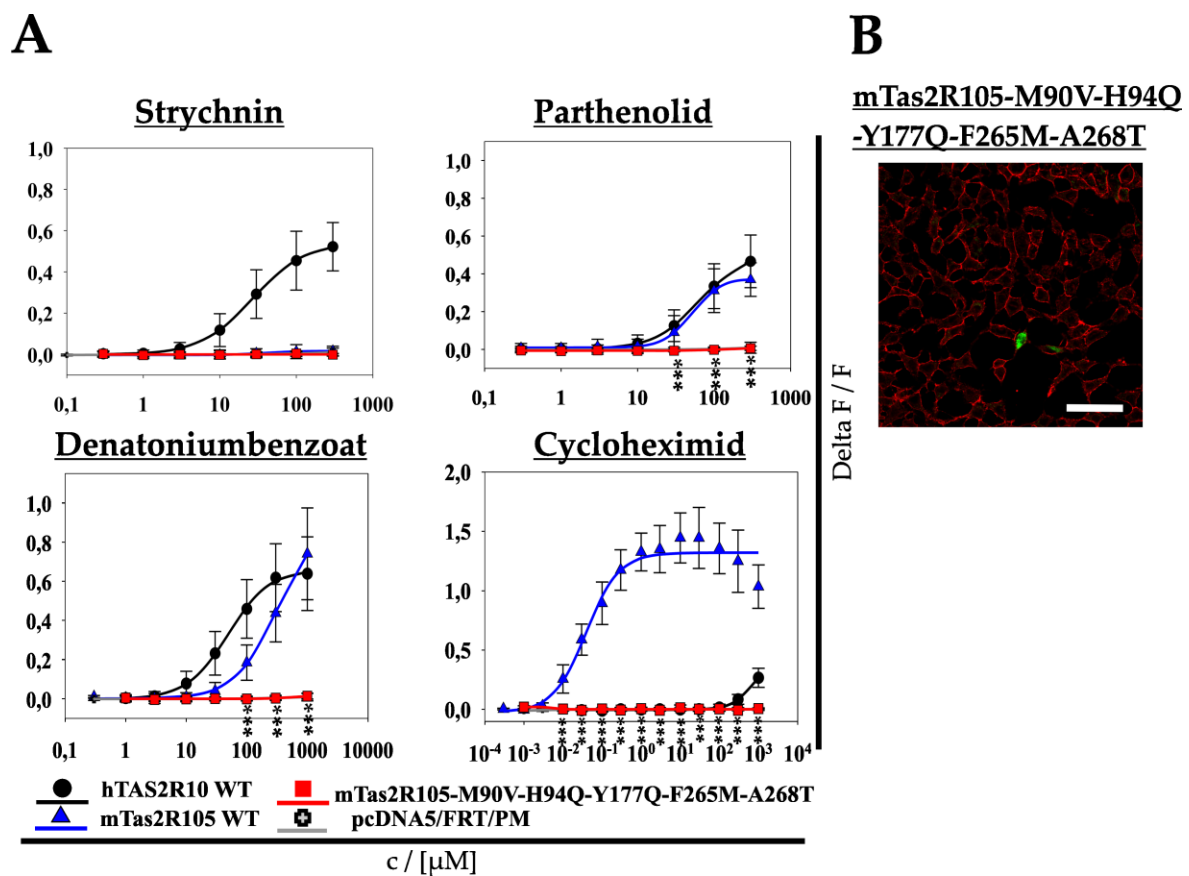


Abb. 35: Charakterisierung der mTas2r105-M90^{3.33}V-H94^{3.37}Q-Y177^{5.40}Q-F265^{7.39}M-A268^{7.42}T Rezeptormutante

(A) Die Rezeptorwildtyp (hTAS2R10 und mTas2r105), Rezeptormutanten und MOCK exprimierenden Zellen wurden mit Strychnin (0,3-300 μM), Parthenolid (0,3-300 μM), Denatoniumbenzoat (1-1000 μM) und Cycloheximid (0,0003-1000 μM) stimuliert und die resultierenden $\Delta\text{F}/\text{F}$ -Werte (Y-Achse) gegen die Agonistenkonzentration (X-Achse) aufgetragen. Die Graphen stellen die Ergebnisse wiederholter Experimente dar. Die statistische Auswertung für Cycloheximid und die mTas2r105-Mutanten erfolgte als *One-way-ANOVA* und *Tukey post-hoc-Test* bei 95 % Konfidenzintervall (***) $p < 0,001$) stets im Vergleich zum mTas2r105-WT-Rezeptor. (B) Zellen, die die Rezeptormutante exprimieren, wurden fixiert und der C-terminale HSV-Epitop (grün), sowie die Zellmembran (rot) nachgewiesen. Die Auswertung der Färbung erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Abgebildet sind exemplarisch nur Bilder der Überlagerung der Rezeptormutante. Die Bilder wurden mit folgenden Parametern aufgenommen: 40fach Objektiv, 1,5facher digitale Vergrößerung, Maßstab (weißer Balken): 50 μm .

Es war demnach nicht möglich, durch den mehrfachen Austausch von Positionen im mTasR105 die Pharmakologie in Richtung des hTASR10 zu verschieben. Der Funktionsverlust der Mutante, sowie die zum mTas2r105 Wildtyp reduzierte Expressionsrate der Rezeptormutante und die überwiegend zytoplasmatische Lokalisation zeigen, dass Rezeptoreigenschaften wie Aktivierung, Faltung und Transport negativ beeinflusst wurden.

3.2.3 Vergleich von Positionen mit gleichen Aminosäuren bei hTAS2R10 und mTas2r105

In Abschnitt 3.2.2 war es nicht möglich durch den Aminosäureaustausch eine Strychnininteraktion im mTas2r105 zu etablieren. Es zeigte sich außerdem, dass der Aminosäureaustausch an den entsprechenden Positionen im mTas2r105 und hTAS2R10 nicht im selben Maße zu einer veränderten Aktivierung führte. So zeigte der Austausch von H94^{3.37} zu Q keinen signifikanten Effekt auf die Aktivierung mit Denatoniumbenzoat (Abb. 33 links), im Gegensatz zum Austausch von hTAS2R10-Q93^{3.37} zu Histidin. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Bindungsmodi für die Agonisten im hTAS2R10 und mTas2r105 unterschiedlich sein könnten. Um diese Annahme zu testen wurden zwei Positionen ausgewählt, bei denen die Aminosäure an der entsprechenden Position in beiden Rezeptoren übereinstimmt und die durch die Mutagenese im hTAS2R10 gut charakterisiert wurden. Diese Positionen waren S85^{3.29}, für die eine agonistenselektive Interaktion nachgewiesen werden konnte (Abschnitt 3.1.4), und L178^{5.43}, die eine sterische nicht agonistenselektive Interaktion zeigte (Abschnitt 3.1.6). Die entsprechenden Positionen im mTas2r105 (S86^{3.29} und L180^{5.43}) wurden dann zu den Aminosäuren mutiert, die auch bei der hTAS2R10 Charakterisierung dieser Positionen benutzt wurden (S86^{3.29} → A und T und L180^{5.43} → A). Es wurde erwartet, dass sich bei gleichem Bindungsmodus für die einzelnen Agonisten die Aktivierung des mTas2r105 nach Mutation in ähnlichem Maße ändern sollte wie bereits im hTAS2R10. Sollten die Bindungsmodi für die Agonisten unterschiedlich sein, müsste sich auch die Aktivierung nach der Mutation unterschiedlich zu den hTAS2R10-Mutanten verhalten. Nach Stimulation mit Strychnin (0,3-300 µM), Parthenolid (0,3-300 µM), Denatoniumbenzoat (1-1000 µM) und Cycloheximid (0.0003-1000 µM) wurde die intrazelluläre Änderung des Ca²⁺-Spiegels der Rezeptormutanten und der Wildtyprezeptoren mittels *Ca-Imaging*-Analyse analysiert (Abschnitt 2.4).

In Abb. 37 und in Tab. 14 sind die Ergebnisse der Messungen abgebildet. Die hTAS2R10-Mutanten wurden bereits in Abschnitt 3.1.4 (hTAS2R10-S85^{3,29}-Mutagenese) und Abschnitt 3.1.6 (hTAS2R10-L178^{5,43}-Mutagenese) charakterisiert. Zum Vergleich sind die Dosis-Wirkungs-Kurven dieser hTAS2R10-Mutanten ebenfalls in Abb. 37 abgebildet. Wie in Abb. 37 ersichtlich, zeigten die drei mTas2r105-Mutanten keine Aktivierung durch Strychnin. Auf den Parthenolidstimulus zeigten die mTas2r105-S86^{3,29}-Mutanten (Abb. 37 links und Mitte) keine signifikante Änderung zum Wildtyp, bis auf einen größeren Schwellenwert. Im Gegensatz dazu ergab die Mutagenese der Aminosäureposition S85^{3,29} im hTAS2R10, dass diese eine agonistenselektive Interaktion mit Parthenolid zeigt (entsprechend Abschnitt 3.1.4 und Abb. 37). Die mTas2r105-L180^{5,43}A-Mutante konnte, im Gegensatz zur hTAS2R10-L178^{5,43}A-Mutante, nicht mit Parthenolid aktiviert werden (Abb. 37 links). Die Aktivierung mit Denatoniumbenzoat zeigte für die mTas2r105-S86^{3,39}-Mutanten, bis auf den größeren Schwellenwert (Tab. 14), keine Änderung zum Wildtyprezeptor (Abb. 36 links und Mitte). Das Gleiche konnte auch für die Aktivierung der hTAS2R10-S85^{3,29}-Mutanten mit Denatoniumbenzoat beobachtet werden (Abb. 33 links und Mitte sowie Tab. 14). Die Messung der mTas2r105-L180^{5,43}A-Mutante mit Denatoniumbenzoat zeigte eine geringe, jedoch signifikante Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve in einen niedrigeren Konzentrationsbereich, was dementsprechend eine höhere Sensitivität für Denatoniumbenzoat entspricht. Bei der Messung der hTAS2R10-L178^{5,43}A-Mutante mit Denatoniumbenzoat konnte hingegen eine deutliche Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve in einen niedrigeren Konzentrationsbereich beobachtet werden (Abb. 37 rechts und Tab. 14). Für die Aktivierung mit Cycloheximid zeigte die mTas2r105-S86^{3,29}A-Mutante eine signifikante Verschiebung der Sensitivität des Rezeptors in einen höheren Konzentrationsbereich (Abb. 37 links und Tab. 14). Der EC₅₀-Wert der S86^{3,29}A-Mutante (0,120 +/-0,053 µM) war ebenfalls größer als der des mTas2r105-WT (0,062 +/-0,048 µM), jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Für die S86^{3,39}T-Mutante konnte nach Stimulation mit Cycloheximid lediglich eine geringere Aktivierung (kleinere Amplitude Abb. 37 Mitte) im Vergleich zu den Amplituden des Wildtyprezeptors beobachtet werden. Für die mTas2r105-L180^{5,43}A-Mutante konnte, bis auf einen größeren Schwellenwert, keine Änderung zum Wildtyp gezeigt werden (Abb. 33 und Tab. 14). Die Messungen der hTAS2R10-Mutanten mit Cycloheximid zeigten keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyprezeptor (Abb. 37 und Tab. 14).

Tab. 14: Pharmakologische Parameter und Expressionsrate der Rezeptormutanten von Position 3.29 und 5.43

Aufgelistet sind die Rezeptormutanten und der hTAS2R10-WT, sowie der mTas2r105-WT mit ihren Schwellenwerten (SW) in μM , ihren maximalen Amplituden (Max. Ampl.) und dem Mittelwert der EC_{50} -Werte in μM , inklusive der Standardabweichung für die entsprechenden Agonisten. Die Anzahl der Messungen wird mit „n“ angegeben. Die in grau dargestellten maximalen Amplituden waren nicht signifikant höher als die der MOCK-Kontrolle. Die statistische Auswertung der maximalen Amplituden erfolgte als *One-way*-ANOVA und *Tukey post-hoc*-Test bei 95 % Konfidenzintervall stets im Vergleich zum WT-Rezeptor (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Die statistische Auswertung der EC_{50} -Werte erfolgte als Kruskal-Wallis-Test im Vergleich zum jeweiligen WT-Rezeptor. Zusätzlich sind die Expressionsraten in % aufgelistet. Die statistische Auswertung dieser erfolgte ebenfalls als *One-way*-ANOVA und *Tukey post-hoc*-Test bei 95 % Konfidenzintervall stets im Vergleich zum WT-Rezeptor.

Rezeptor-Wildtyp / -Mutante	Strychnin				Parthenolid			
	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC_{50} / [μM]	n	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC_{50} / [μM]	n
hTAS2R10-WT	3	0,522 (+/-0,118)	33 (+/-24)	60	10	0,466 (+/-0,140)	69 (+/-26)	54
-S85A	30	0,315 (+/-0,088) ***	45 (+/-39)	13	1	0,824 (+/-0,208) ***	20 (+/-9) ***	15
-S85T	10	0,561 (+/-0,097)	17 (+/-3)	4	-	0,141 (+/-0,106) ***	-	4
-L178A	1	0,454 (+/-0,097)	6 (+/-1) **	10	3	0,654 (+/-0,181)	9 (+/-3) ***	7
mTas2R105-WT	-	-	-	23	30	0,369 (+/-0,089)	48 (+/-26)	23
-S86A	-	-	-	5	100	0,396 (+/-0,129)	63 (+/-15)	6
-S86T	-	-	-	6	100	0,303 (+/-0,082)	65 (+/-18)	6
-L180A	-	-	-	3	-	-	-	3
Rezeptor-Wildtyp / -Mutante	Denatoniumbenzoat				Cycloheximid			
	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC_{50} / [μM]	n	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC_{50} / [μM]	n
hTAS2R10-WT	10	0,639 (+/-0,188)	59 (+/-30)	58	1000	0,266 (+/-0,080)	-	14
-S85A	30	0,548 (+/-0,166)	93 (+/-41)	13	1000	0,317 (+/-0,007)	-	2
-S85T	30	0,567 (+/-0,088)	74 (+/-25)	4	1000	0,197 (+/-0,084)	-	2
-L178A	1	0,726 (+/-0,256)	4 (+/-2)	10	1000	0,188 (+/-0,075)	-	2
mTas2R105-WT	100	0,740 (+/-0,234)	-	24	0,003	1,444 (+/-0,211)	0,062 (+/-0,048)	14
-S86A	300	0,700 (+/-0,165)	-	5	0,01	1,388 (+/-0,101)	0,120 (+/-0,053)	4
-S86T	300	0,574 (+/-0,184)	-	6	0,003	1,353 (+/-0,122)	0,089 (+/-0,036)	6
-L180A	30	1,033 (+/-0,264)	-	4	0,01	1,359 (+/-0,226)	0,059 (+/-0,010)	3
Rezeptor-Wildtyp / -Mutante	Expressionsrate							
	MW / [%]	n						
hTAS2R10-WT	13 (+/-7,9)	7,9						
-S85A	12 (+/-6,2)	6,2						
-S85T	22 (+/-3,9)	3,9						
-L178A	4 (+/-0,5)	0,5						
mTas2R105-WT	7 (+/-4,4)	8						
-S86A	24 (+/-1,6) *	1,6						
-S86T	20 (+/-7,7)	7,7						
-L180A	24 (+/-6,9) *	6,9						

Neben der pharmakologischen Charakterisierung wurden die Mutanten auch immunzytochemisch untersucht. Dafür wurden die mTas2r105-Mutanten, sowie die Wildtyprezeptoren und MOCK transient exprimierenden Zellen fixiert und das C-terminale HSV-Epitop (grün), sowie die Zellmembran (rot) nachgewiesen. Abgebildet sind exemplarisch nur die Bilder der Überlagerung von HSV-Epitop- und Zellmembranfärbung der Mutanten (Abb. 36). In Tab. 14 sind die Mittelwerte der Expressionsraten im Vergleich zu den Wildtyprezeptoren aufgelistet. Die Expressionsraten für die S86^{3,29}A und L180^{5,43}A-Mutante sind signifikant höher als die des Wildtyps, die Expressionsrate der mTas2r105-S86^{3,29}T-Rezeptormutante ist ebenfalls höher als die des Wildtyps, jedoch nicht signifikant.

Die Expression hinsichtlich der Lokalisation war jedoch nicht unterschiedlich zum Wildtyprezeptor (Abb. 36 und Abb. 34).

Es konnte somit gezeigt werden, dass Cycloheximid im mTas2R105 zum Teil über gleiche Reste wie Strychnin im hTAS2R10 gebunden wird (5.40). Die Strychninbindungsstelle konnte jedoch nicht auf den mTas2r105 übertragen werden. Hinsichtlich der Position 3.29 und 5.43 konnte gezeigt werden, dass die Bedeutung an der Parthenolidinteraktion unterschiedlich in beiden Rezeptoren ist, somit unterscheiden sich die Bindungsmodi in beiden Rezeptoren für Parthenolid. Für Denatoniumbenzoat konnte gezeigt werden, dass sich die Bindungsmodi ebenfalls unterscheiden (3.37 und 5.43). Die Position 5.40 besitzt jedoch in beiden Rezeptoren einen ähnlichen Einfluss auf die Interaktion mit Parthenolid und Denatoniumbenzoat.

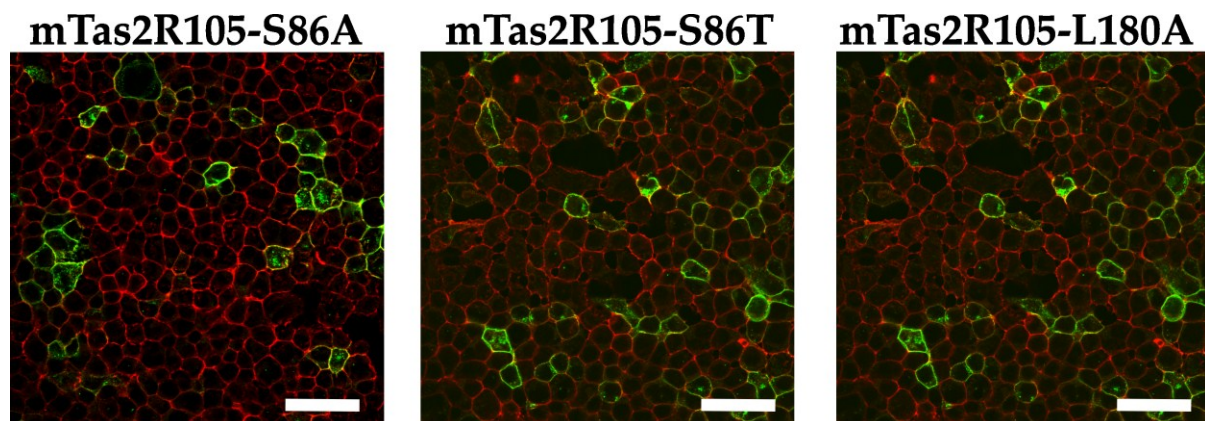


Abb. 36: Immunzytochemische Charakterisierung der Rezeptormutanten von Position 3.29 und 5.43

Zellen, die die entsprechenden Rezeptormutanten exprimieren, wurden fixiert und der C-terminale HSV-Epitop (grün), sowie die Zellmembran (rot) nachgewiesen. Die Auswertung der Färbung erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Abgebildet sind exemplarisch nur Bilder der Überlagerung der Mutanten. Die Bilder wurden mit folgenden Parametern aufgenommen: 40fach Objektiv, 1,5fache digitale Vergrößerung, Maßstab (weißer Balken): 50 μm .

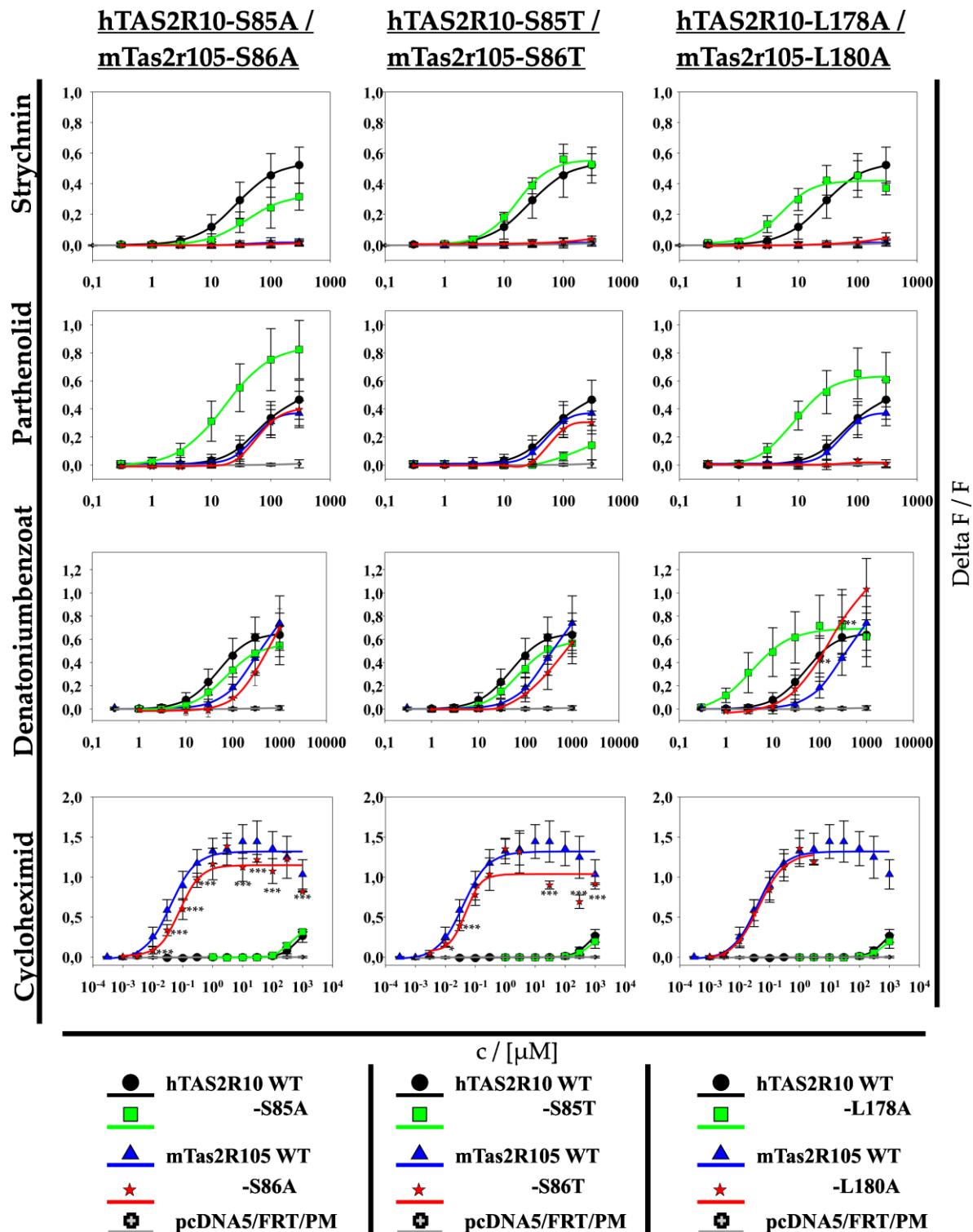


Abb. 37: Pharmakologische Charakterisierung der Rezeptormutanten von Position 3.29 und 5.43
 Zellen, die Rezeptorwildtyp (hTAS2R10 und mTas2r105), Rezeptormutanten (mTas2r105-S86^{3.29}A, -T, und -L180^{5.43}A und hTAS2R10-S85^{3.29}A, -T, und -L180^{5.43}A) und MOCK exprimieren, wurden mit Strychnin (0,3-300 μM), Parthenolid (0,3-300 μM), Denatoniumbenzoat (1-1000 μM) und Cycloheximid (0.0003-1000 μM) stimuliert und die resultierenden ΔF/F-Werte (Y-Achse) gegen die Agonistenkonzentration (X-Achse) aufgetragen. Die Graphen stellen die Ergebnisse wiederholter Experimente dar. Die statistische Auswertung für Denatoniumbenzoat und mTas2r105-L180^{5.43}A, sowie Cycloheximid und den mTas2r105-Mutanten erfolgte als *One-way-ANOVA* und *Tukey post-hoc-Test* bei 95 % Konfidenzintervall (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001) stets im Vergleich zum mTas2r105-WT-Rezeptor.

3.3 Gegenüberstellung der Strychnininteraktion von hTAS2R10 und hTAS2R46

Der sensitivste menschliche Strychninrezeptor ist der hTAS2R46 (Brockhoff *et al.* 2007; Brockhoff *et al.* 2010). Er reagiert wesentlich sensitiver auf Strychnin (Schwellenwert: 0,1 μM (Brockhoff *et al.* 2007) und EC_{50} -Wert: 0,43 \pm 0,02 μM (Brockhoff *et al.* 2010)) als der hTAS2R10-Rezeptor (Schwellenwert: 3 μM und EC_{50} -Wert: 33 \pm 24 μM). Das wirft die Frage auf, worin sich die beiden Rezeptoren unterscheiden. Besitzen der hTAS2R10 und der hTAS2R46 den gleichen Bindungsmodus in Bezug auf die Strychnininteraktion oder ist der Bindungsmodus zwischen den beiden Rezeptoren unterschiedlich? Sollten die beiden Rezeptoren den gleichen Bindungsmodus besitzen, wieso ist der hTAS2R10 insensitiver als der hTAS2R46? Sollten die beiden Rezeptoren den gleichen Bindungsmodus besitzen, stammen diese beiden Rezeptoren von einem gemeinsamen Ursprungsrezeptor ab? Es ist bereits bekannt, dass zwei Positionen für die Interaktion des hTAS2R46 mit Strychnin – die Positionen E265^{7.39} und A268^{7.42} (Brockhoff *et al.* 2010) – von Bedeutung sind. In der selben Publikation konnte außerdem gezeigt werden, dass das Einfügen dieser Aminosäuren an den entsprechenden Positionen in einen stark homologen Rezeptor (hTAS2R31) zu einer vorher nicht vorhandenen biologischen Antwort auf Strychnin führte. Eine daraus resultierende Fragestellung war, ob durch den Austausch der Aminosäuren an Position 7.39 und 7.42 im hTAS2R10 zu E und A (entsprechend hTAS2R46) die Reaktionen auf Strychnin verbessert werden, auch wenn die Homologie zwischen den beiden Rezeptoren nur 34 % beträgt (Abb. 28).

3.3.1 Austausch von M263^{7.39} und T266^{7.43} im hTAS2R10 zu E^{7.39} und A^{7.42}

Die Aminosäurepositionen M263^{7.39} und T266^{7.42} im hTAS2R10 wurden sowohl einzeln, als auch beide zu E^{7.39} und A^{7.42} ausgetauscht. Die Charakterisierung der hTAS2R10-T266^{7.42}A-Rezeptormutante erfolgte bereits im Abschnitt 3.1.3 (Abb. 16, Tab. 6). Mit den Rezeptorkonstrukten, dem hTAS2R10-Wildtyprezeptor und dem hTAS2R46-Wildtyprezeptor wurden HEK293T_{Gα16Gust44}-Zellen transient transfiziert (Abschnitt 2.3.5). Diese Zellen wurden nach Stimulation mit Strychnin (0,03-300 μM), Parthenolid (0,3-300 μM) und Denatoniumbenzoat (1-1000 μM) mittels *Ca-Imaging*-Analyse (Abschnitt 2.4) untersucht

(Abb. 38A und Tab. 15). Es war durch den Austausch der Aminosäuren zu denen des hTAS2R46 an den entsprechenden Positionen (7.39 und 7.42) nicht möglich die Pharmakologie des hTAS2R10 in Richtung des hTAS2R46 zu verschieben (Abb. 38, orangefarbene Kurve). Die M263^{7.39}E- und die Doppelrezeptormutante (M263^{7.39}E-T266^{7.42}A) zeigten keine Aktivierung mit Strychnin, Parthenolid und Denatoniumbenzoat (entsprechend Abb. 38A, grüne Kurve M263^{7.39}E und rote Kurve M263^{7.39}E-T266^{7.42}A, sowie Tab. 15). Die T266^{7.39}A-Rezeptormutante zeigte nur für Parthenolid (300 µM, Tab. 15) eine signifikant höhere Aktivierung als die MOCK-Kontrolle. Für die Agonisten Strychnin und Denatoniumbenzoat konnte eine Aktivierung, jedoch nicht signifikant höher als die MOCK-Kontrolle, ermittelt werden. Die Aktivität nach Stimulation mit den Agonisten war in allen drei Fällen (STR, PAR und DTB) im Vergleich zum Wildtyprezeptor signifikant reduziert. Die Rezeptormutanten wurden auch immunzytochemisch charakterisiert. Abgebildet sind exemplarisch nur die Bilder der Überlagerung von HSV-Epitop- (grün) und Zellmembranfärbung (rot) der Mutanten und des hTAS2R10-Wildtyps (Abb. 38B). In Tab. 15 sind die Mittelwerte der Expressionsraten im Vergleich zu den Wildtyprezeptoren aufgelistet. Die Expressionsraten für die Mutante und dem hTAS2R10-Wildtyp sind nicht signifikant unterschiedlich (Tab. 15). Die Expression war hinsichtlich der Lokalisation ebenfalls nicht unterschiedlich zum Wildtyprezeptor (Abb. 38B).

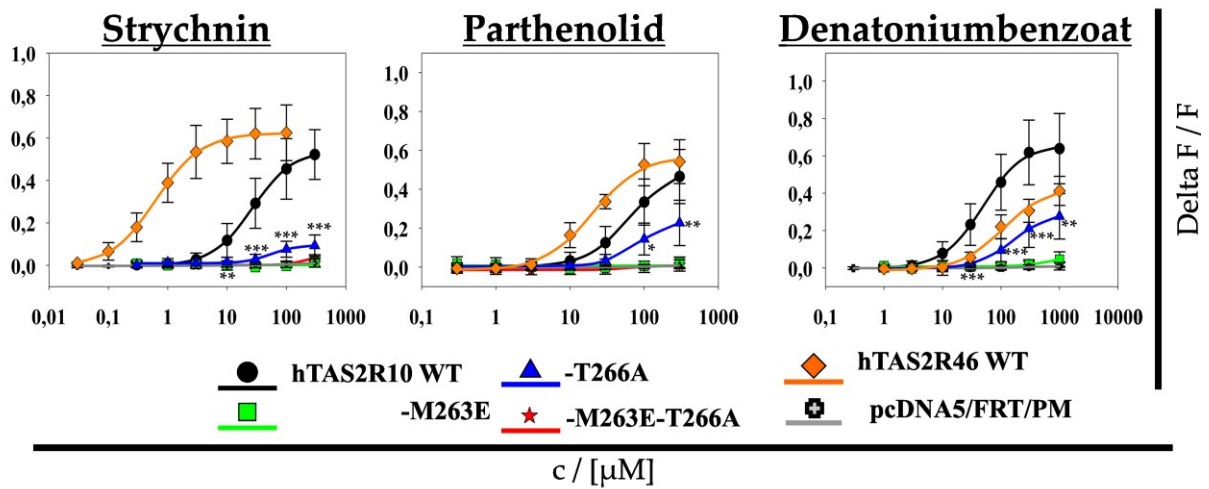
Der Funktionsverlust der Rezeptormutanten von Position M263^{7.39} sowohl zu Glutamat, als auch zu Alanin (Abschnitt 3.1.3) und zu Phenylalanin (Abschnitt 3.2.2) zeigte, dass diese Position neben einer möglichen Beteiligung an der Agonisteninteraktion in erster Linie an der Rezeptoraktivierung beteiligt ist. Die Position 7.39 ist, wie im hTAS2R46, trotzdem eine wichtige Position deren Mutation zu einem Funktionsverlust führt. Die Mutagenese der Position T266^{7.42} zeigte, dass diese an nicht agonistenselektiven Interaktionen und Rezeptoraktivierungen beteiligt ist. Es war demnach nicht möglich die Strychnindetektion durch den Aminosäureaustausch zu verbessern. Das zeigt, dass sich die Bindungsmodi zwischen dem hTAS2R10 und den hTAS2R46 für Strychnin unterscheiden.

Tab. 15: Pharmakologische Parameter und Expressionsraten der hTAS2R10-M^{7.29}E, -T266A^{7.42} und -M263^{7.39}E-T266^{7.42}A-Rezeptormutanten

Aufgelistet sind die Mutanten und der hTAS2R10-WT, sowie der hTAS2R46-WT mit ihren Schwellenwerten (SW) in μM , ihren maximalen Amplituden (Max. Ampl.) und dem Mittelwert der EC₅₀-Werte in μM , inklusive der Standardabweichung für die entsprechenden Agonisten. Die Anzahl der Messungen wird mit „n“ angegeben. Die in grau dargestellten maximalen Amplituden waren nicht signifikant höher als die der MOCK-Kontrolle. Die statistische Auswertung der maximalen Amplituden erfolgte als *One-way*-ANOVA und *Tukey post-hoc*-Test bei 95 % Konfidenzintervall stets im Vergleich zum WT-Rezeptor (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001). Die statistische Auswertung der EC₅₀-Werte erfolgte als Kruskal-Wallis-Test im Vergleich zum jeweiligen WT-Rezeptor. Zusätzlich sind die Expressionsraten in % aufgelistet. Die statistische Auswertung dieser erfolgte ebenfalls als *One-way*-ANOVA und *Tukey post-hoc*-Test bei 95 % Konfidenzintervall, stets im Vergleich zum jeweiligen WT-Rezeptor.

Mutante/Position	Strychnin				Parthenolid			
	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC50 / [μM]	n	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC50 / [μM]	n
hTAS2R10 -WT	3	0,522 (+/-0,118)	33 (+/-24)	60	10	0,466 (+/-0,140)	69 (+/-26)	54
-M263E	-	-	-	3	-	-	-	3
-T266A	-	0,093 (+/-0,050) ***	-	4	300	0,227 (+/-0,117) *	-	4
-M263E-T266A	-	-	-	4	-	-	-	4
hTAS2R46-WT	0,03	0,625 (+/-0,131)	0,67 (+/-0,18)	5	10	0,542 (+/-0,113)	22 (+/-3)	4
Mutante/Position	Denatoniumbenzoat				Expressionsrate			
	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC50 / [μM]	n	MW / [%]	n		
hTAS2R10 -WT	10	0,639 (+/-0,188)	59 (+/-30)	58	13 (+/-7,9)	12		
-M263E	-	-	-	3	4 (+/-2,7)	4		
-T266A	-	0,276 (+/-0,122) **	-	4	6 (+/-2,4)	2		
-M263E-T266A	-	-	-	3	10 (+/-3,7)	2		
hTAS2R46-WT	100	0,413 (+/-0,078)	119 (+/-28)	4	9 (+/-1,1)	3		

A



B

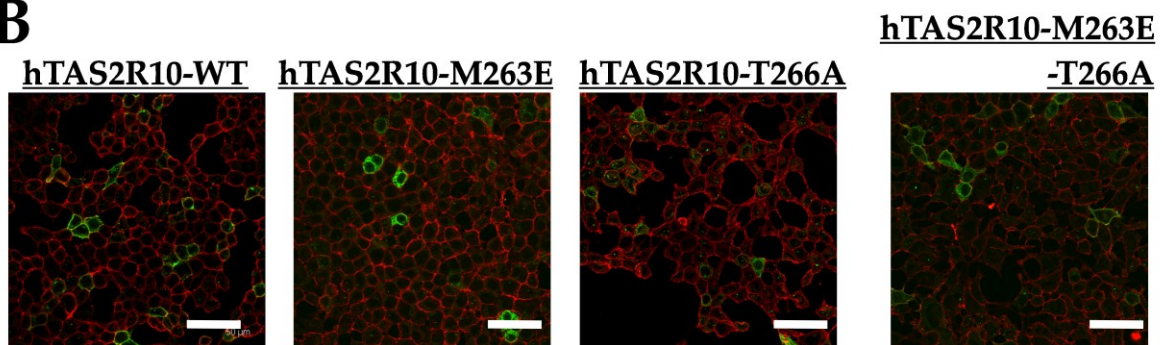


Abb. 38: Austausch von M263^{7.39} und T266^{7.43} zu E^{7.39} und A^{7.42}

(A) Die Rezeptorwildtyp (hTAS2R10 und hTAS2R46), Rezeptormutanten (hTAS2R10-M263^{7.39}E, -T266^{7.42}A und -M263^{7.39}A-T266^{7.42}A) und MOCK exprimierenden Zellen wurden mit Strychnin (0,03-300 µM), Parthenolid (0,3-300 µM) und Denatoniumbenzoat (1-1000 µM) stimuliert und die resultierenden $\Delta F/F$ -Werte (Y-Achse) gegen die Agonistenkonzentration (X-Achse) aufgetragen. Die Graphen stellen die Ergebnisse wiederholter Experimente dar. Die statistische Auswertung für die Agonisten und hTAS2R10-T266^{7.42}A erfolgte als *One-way-ANOVA* und *Tukey post-hoc-Test* bei 95 % Konfidenzintervall (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) stets im Vergleich zum hTAS2R10-WT-Rezeptor. (B) Zellen, die den Rezeptorwildtyp, Rezeptormutanten und MOCK exprimieren wurden fixiert und der C-terminale HSV-Epitop (grün), sowie die Zellmembran (rot) nachgewiesen. Die Auswertung der Färbung erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Abgebildet sind exemplarisch nur die Überlagerungen des hTAS2R10-WT und der Mutanten. Die Bilder wurden mit folgenden Parametern aufgenommen: 40fach Objektiv, 1,5facher digitale Vergrößerung, Maßstab (weißer Balken): 50 µm.

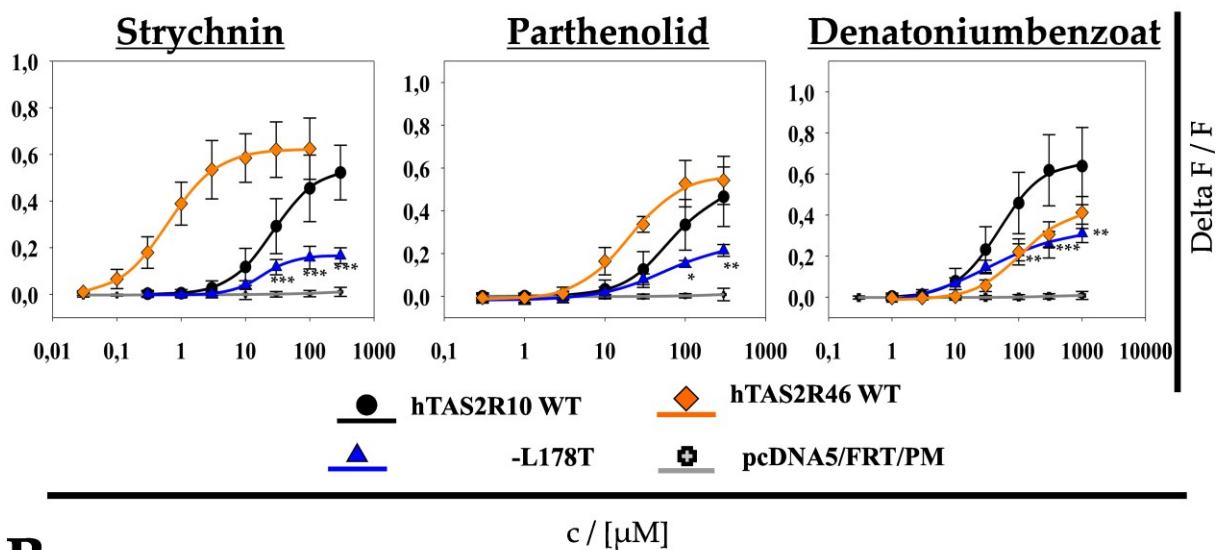
3.3.2 Vergleich der Position 5.43 zwischen hTAS2R10 und hTAS2R46

Die Einführung von potentiell wichtigen Aminosäuren des hTAS2R46 für die Strychnininteraktion (E7.39 und A7.42 (Brockhoff et al. 2010)) führte lediglich zu einer Reduzierung der Aktivität (T266^{7.42}A, entsprechend Abb. 38) bzw. zu einem Funktionsverlust (M263^{7.39}E und M263^{7.39}E-T266^{7.42}A, entsprechend Abb. 38). Als nächstes wurde die Position 5.43 zwischen den beiden Rezeptoren verglichen, die im hTAS2R10 (L178^{5.43}, Abschnitt 3.1.6) nach Mutation zu Alanin zu einer verbesserten nicht agonistenselektive Aktivierung für die untersuchten Agonisten führte. Der hTAS2R46 besitzt an beiden Positionen ein Threonin. Die daraus resultierende Frage ist, ob einer der Gründe für die Unterschiede in der Pharmakologie zwischen den beiden Rezeptoren aus der Tatsache herrührt, dass der hTAS2R46 an der Position 5.43 eine zum Leucin kleinere, polare Aminosäure besitzt. Die entsprechenden Positionen im hTAS2R10 wurden zu Threonin mutiert. HEK293T_{Gα16Gust44}-Zellen wurden mit den Rezeptormutanten, hTAS2R10-Wildtyprezeptor, hTAS2R46-Wildtyprezeptor und MOCK transfiziert (Abschnitt 2.3.5). Diese Zellen wurden nach Stimulation mit Strychnin (0,03-300 μM), Parthenolid (0,3-300 μM) und Denatoniumbenzoat (1-1000 μM) mittels *Ca-Imaging*-Analyse (Abschnitt 2.4) untersucht. Die Aktivierung für die hTAS2R10-L178^{5.43}T-Mutante war für alle drei Agonisten (STR, PAR und DTB) im Vergleich zum WT-Rezeptor signifikant reduziert (Abb. 39A, blaue Kurve und Tab. 16). Die EC₅₀-Werte für Strychnin (16 +/-9 μM) und Denatoniumbenzoat (33 +/-10 μM) waren kleiner, jedoch nicht signifikant, als die des WT-Rezeptors (STR: 33 +/-24 μM und DTB: 59 +/-30 μM). Die Kurven der hTAS2R10-L178^{5.43}T-Mutante (blaue Kurve) und des hTAS2R46-WT (orangefarbende Kurve) unterschieden sich nicht signifikant für die Stimulation mit Denatoniumbenzoat (Abb. 39A). Die Aktivierung der hTAS2R10-L178^{5.43}T-Mutante mit Denatoniumbenzoat wurde dementsprechend in Richtung des hTAS2R46 verschoben.

Es erfolgte neben der pharmakologischen Charakterisierung der Rezeptormutanten auch eine immunzytochemische Untersuchung (Abb. 39B). Abgebildet sind exemplarisch nur die Bilder der Überlagerung von HSV-Epitop-(grün) und Zellmembranfärbung (rot) der Rezeptormutanten. In Tab. 16 sind die Mittelwerte der Expressionsraten im Vergleich zu den Wildtyprezeptoren aufgelistet. Die Expressionsraten für die Konstrukte und den hTAS2R10-Wildtyp sind nicht signifikant unterschiedlich. Die Expression hinsichtlich der Lokalisation war ebenfalls nicht unterschiedlich zum hTAS2R10 Wildtyprezeptor (Abb. 38B).

Der Aminosäureaustausch zeigte ebenfalls, dass sich die Bindungsmodi zwischen dem hTAS2R10 und dem hTAS2R46 unterscheiden. Eine Aminosäure mit einer polaren OH-Gruppe führte zu einer Reduktion in der Aktivierung. Die reduzierten Amplituden bei der Messung der Rezeptormutante mit dem Stimulus durch die drei Agonisten zeigten, dass die Mutation des Rezeptors an dieser Position auch einen Einfluss auf die Rezeptoraktivierung hatte.

A



B

hTAS2R10-L178T

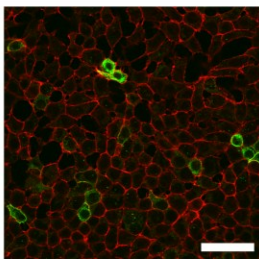


Abb. 39: Austausch von L178^{5.43} zu L178T^{5.43}

(A) Zellen, die die Rezeptorwildtypen (hTAS2R10 und hTAS2R46), Rezeptormutante (hTAS2R10-L178^{5.43}T) und MOCK exprimieren, wurden mit Strychnin (0,03-300 μM), Parthenolid (0,3-300 μM) und Denatoniumbenzoat (1-1000 μM) stimuliert und die resultierenden $\Delta F/F$ -Werte (Y-Achse) gegen die Agonistenkonzentration (X-Achse) aufgetragen. Die Graphen stellen die Ergebnisse wiederholter Experimente dar. Die statistische Auswertung erfolgte als *One-way-ANOVA* und *Tukey post-hoc-Test* bei 95 % Konfidenzintervall (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) stets im Vergleich zum hTAS2R10-WT-Rezeptor. (B) Zellen, die die Rezeptormutante und MOCK exprimieren, wurden fixiert und der C-terminale HSV-Tag (grün), sowie die Zellmembran (rot) nachgewiesen. Die Auswertung der Färbung erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Abgebildet sind exemplarisch nur die Überlagerungen der Rezeptormutanten. Die Bilder wurden mit folgenden Parametern aufgenommen: 40fach Objektiv, 1,5facher digitale Vergrößerung, Maßstab (weißer Balken): 50 μm.

Tab. 16: Pharmakologische Parameter und Expressionsraten des hTAS2R10-L178^{5,43}T-Konstruktes

Aufgelistet sind die hTAS2R10-L178^{5,43}T-Mutante und der hTAS2R10-WT, sowie der hTAS2R46-WT mit ihren Schwellenwerten (SW) in μM , ihren maximalen Amplituden (Max. Ampl.) und dem Mittelwert der EC_{50} -Werte in μM , inklusive der Standardabweichung für die entsprechenden Agonisten. Die Anzahl der Messungen wird mit „n“ angegeben. Die statistische Auswertung der maximalen Amplituden erfolgte als *One-way*-ANOVA und *Tukey post-hoc*-Test bei 95 % Konfidenzintervall stets im Vergleich zum WT-Rezeptor (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Die statistische Auswertung der EC_{50} -Werte erfolgte als Kruskal-Wallis-Test im Vergleich zum jeweiligen WT-Rezeptor. Zusätzlich sind die Expressionsraten in % aufgelistet. Die statistische Auswertung der Expressionsraten erfolgte ebenfalls als *One-way*-ANOVA und *Tukey post-hoc*-Test bei 95 % Konfidenzintervall stets im Vergleich zum jeweiligen WT-Rezeptor.

Mutante	Strychnin				Parthenolid			
	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC_{50} / [μM]	n	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC_{50} / [μM]	n
hTAS2R10 -WT	3	0,522 (+/-0,118)	33 (+/-24)	60	10	0,466 (+/-0,140)	69 (+/-26)	54
-L178T	100	0,166 (+/-0,034) ***	16 (+/-9)	4	300	0,214 (+/-0,028) *	-	4
hTAS2R46-WT	0,03	0,625 (+/-0,131)	0,67 (+/-0,18)	5	10	0,542 (+/-0,113)	22 (+/-3)	4
Mutante	Denatoniumbenzoat				Expressionsrate			
	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC_{50} / [μM]	n	MW / [%]	n		
hTAS2R10 -WT	10	0,639 (+/-0,188)	59 (+/-30)	58	13 (+/-7,9)	12		
-L178T	100	0,311 (+/-0,045) *	33 (+/-10)	4	11 (+/-3,1)	2		
hTAS2R46-WT	100	0,413 (+/-0,078)	119 (+/-28)	4	9 (+/-1,1)	3		

3.3.3 Vergleich der Position 3.39 zwischen hTAS2R10 und hTAS2R46

Eine für die Agonisteninteraktion wichtige Position des hTAS2R10 ist S85^{3,29} (entsprechend 3.1.4). Sie bildet höchstwahrscheinlich zum Strychnin eine Wasserstoffbrückenbindung aus. Zwischen Position S85^{3,39} und Parthenolid kommt es zu einer möglichen sterischen Hinderung. Der hTAS2R46 besitzt an Position 3.29 ein Tyrosin. Tyrosin kann sowohl Wasserstoffbrückenbindungen als auch π -Interaktionen mit Agonisten wie Strychnin eingehen. Daraus ergibt sich die Frage, ob die Position 3.29 im hTAS2R46 eine ähnliche Funktion für die Agonisteninteraktion wie im hTAS2R10 hat? Sollte der Beitrag dieser Position im hTAS2R46 zur Interaktion mit den Agonisten der gleiche sein wie im hTAS2R10, dann müsste eine Mutation der Position Y85^{3,29} im hTAS2R46 zu Alanin eine ähnliche Änderung der Rezeptorenaktivierung wie im hTAS2R10 führen (schlechtere Aktivierung mit Strychnin, bessere Aktivierung mit Parthenolid und unbeeinflusste Aktivierung mit

Denatoniumbenzoat). Die hTAS2R46-Y^{3.29}A-Mutante wurde von Maik Behrens (DIfE) zur Verfügung gestellt. HEK293T_{Gα16Gust44}-Zellen, die die hTAS2R46-Y85^{3.29}A-Mutante, dem hTAS2R10-Wildtyprezeptor und dem hTAS2R46-Wildtyprezeptor exprimieren, wurden nach Stimulation mit Strychnin (0,03-300 μM), Parthenolid (0,3-300 μM) und Denatoniumbenzoat (1-1000 μM) mittels *Ca-Imaging*-Analyse (Abschnitt 2.4) untersucht (Abb. 40A und Tab. 17). Die ausführliche Charakterisierung der hTAS2R10-S85^{3.29}A-Mutante erfolgte bereits im Abschnitt 3.1.4 (Abb. 18). Die Ergebnisse der Messungen von S85^{3.29}A wurden jedoch zum Vergleich auch in Abb. 40 (grüne Kurve) und Tab. 17 abgebildet. Wie in Abb. 40 ersichtlich, führte die Mutation von Y85^{3.29} im hTAS2R46 zu Alanin in erster Linie zu einer signifikanten Reduzierung der Aktivität nach Stimulation mit den drei Agonisten (Abb. 40, blaue Kurve) im Vergleich zum Wildtyprezeptor (Abb. 40, orangefarbene Kurve). Es konnte auch nicht die agonistenselektive Änderung der Aktivierung, wie bei der S85^{3.29}A-Mutante beobachtet werden. Die hTAS2R46-Y85^{3.29}A-Mutante zeigte für die Stimulation mit Strychnin eine verringerte Aktivierung (Amplitude) im Vergleich zum hTAS2R46-WT, ohne Änderung des EC₅₀-Werts (entsprechend Tab. 17). Auch der Schwellenwert unterschied sich nicht (Tab. 17). Die Aktivierung für Parthenolid und Denatoniumbenzoat war nicht signifikant höher als die Leerkontrolle. Die hTAS2R46Y85^{3.29}A-Mutante wurde ebenfalls immunzytochemisch charakterisiert (Abb. 40B). Abgebildet sind exemplarisch nur die Bilder der Überlagerung von HSV-Epitop-(grün) und Zellmembranfärbung (rot) der Rezeptormutante, des Wildtyprezeptors und der Negativkontrolle. In Tab. 17 sind die Mittelwerte der Expressionsraten im Vergleich zu dem hTAS2R46-Wildtyprezeptor aufgelistet. Die Expressionsraten für die Y85^{3.29}A-Mutante und dem hTAS2R46-Wildtyp sind nicht signifikant unterschiedlich (Tab. 17). Das Expressionsmuster der Rezeptormutante war ebenfalls nicht unterschiedlich zum Wildtyprezeptor (Abb. 40B).

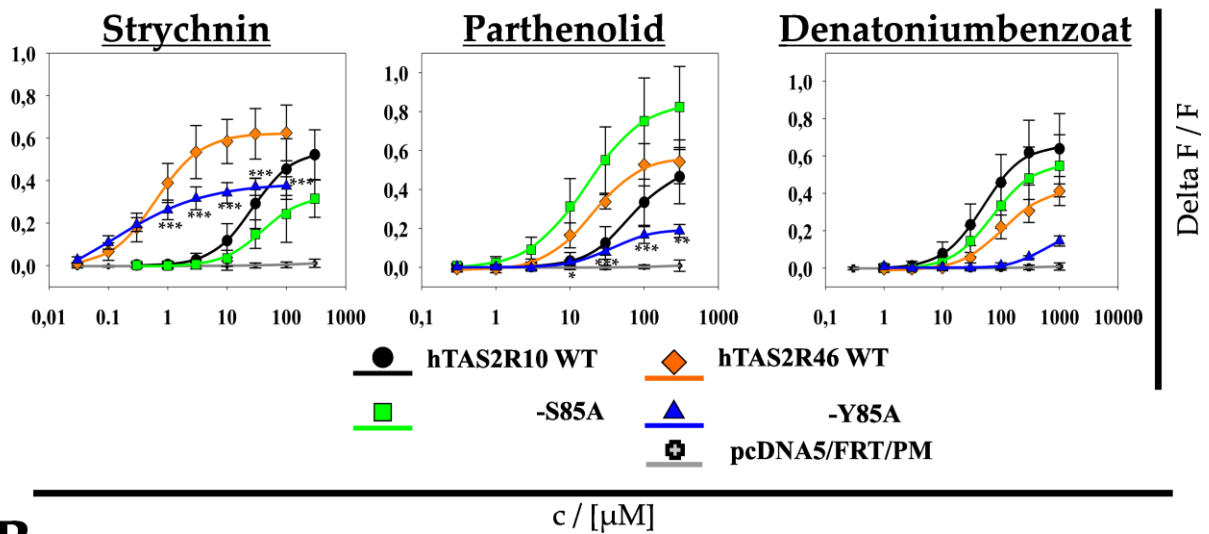
Die Reduzierung der Amplitude für die Aktivierung mit den drei Agonisten zeigte, dass die Position 3.29 im hTAS2R46 wohl in erster Linie an der Rezeptoraktivierung beteiligt ist. Der gleiche EC₅₀- und Schwellenwert der Rezeptormutante im Vergleich zum hTAS2R46 Wildtyp, sowie die reduzierte Amplitude bei der Stimulation mit Strychnin zeigten, dass die Seitenkette der Aminosäure in dieser Position wahrscheinlich nicht über eine Wasserstoffbrücke oder π -Interaktionen mit Strychnin interagiert. Es ist ein weiterer Beweis für die unterschiedlichen Bindungsmodi von hTAS2R10 und hTAS2R46.

Tab. 17: Pharmakologische Parameter und Expressionsrate von hTAS2R46-Y85^{3,29}A

Aufgelistet sind die Rezeptormutanten und der hTAS2R46-WT, mit ihren Schwellenwerten (SW) in μM , ihren maximalen Amplituden (Max. Ampl.) und dem Mittelwert der EC_{50} -Werte in μM , inklusive der Standardabweichung für die entsprechenden Agonisten. Die Anzahl der Messungen wird mit „n“ angegeben. Die in grau dargestellten maximalen Amplituden waren nicht signifikant höher als die der MOCK-Kontrolle. Die statistische Auswertung der maximalen Amplituden erfolgte als *One-way-ANOVA* und *Tukey post-hoc-Test* bei 95 % Konfidenzintervall stets im Vergleich zum WT-Rezeptor (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Die statistische Auswertung der EC_{50} -Werte erfolgte als Kruskal-Wallis-Test im Vergleich zum jeweiligen WT-Rezeptor. Zusätzlich sind die Expressionsraten in % aufgelistet. Die statistische Auswertung erfolgte als *One-way-ANOVA* und *Tukey post-hoc-Test* bei 95 % Konfidenzintervall stets im Vergleich zum jeweiligen WT-Rezeptor.

Mutanten	Strychnin				Parthenolid			
	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC_{50} / [μM]	n	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC_{50} / [μM]	n
hTAS2R10 -WT	3	0,522 (+/-0,118)	33 (+/-24)	60	10	0,466 (+/-0,140)	69 (+/-26)	54
-S85A	30	0,315 (+/-0,088) ***	45 (+/-39)	13	1	0,824 (+/-0,208) ***	20 (+/-9) ***	15
hTAS2R46-WT	0,03	0,625 (+/-0,131)	0,67 (+/-0,18)	5	10	0,542 (+/-0,113)	22 (+/-3)	4
-Y85A	0,03	0,374 (+/-0,044) *	0,55 (+/-0,61)	5	-	0,187 (+/-0,033)	-	3
Mutanten	Denatoniumbenzoat				Expressionsrate			
	SW / [μM]	Max. Ampl.	EC_{50} / [μM]	n	MW / [%]	n		
hTAS2R10 -WT	10	0,639 (+/-0,188)	59 (+/-30)	58	13 (+/-7,9)	12		
-S85A	30	0,548 (+/-0,166)	93 (+/-41)	13	12 (+/-6,2)	2		
hTAS2R46-WT	100	0,413 (+/-0,078)	119 (+/-28)	4	9 (+/-1,1)	3		
-Y85A	-	0,145 (+/-0,027)	-	3	7 (+/-1,3)	3		

A



B

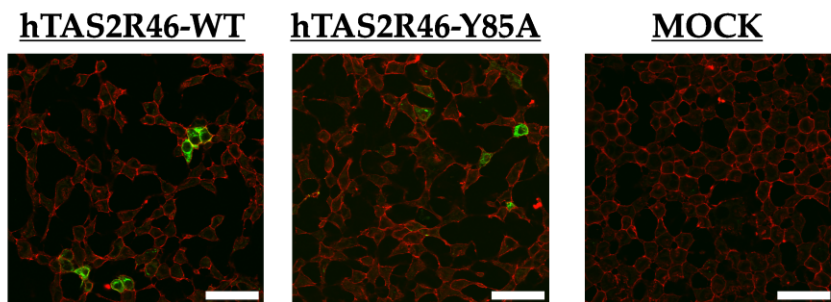


Abb. 40: Vergleich der Alanin-Mutanten der Position 3.29 im hTAS2R10 und im hTAS2R46

(A) Die Rezeptorwildtyp (hTAS2R10 und hTAS2R46), Rezeptor-Mutante-hTAS2R46^{Y3.29A} (sowie zum Vergleich hTAS2R10-S85^{3.29A}) und MOCK exprimierenden Zellen wurden mit Strychnin (0,03-300 μM), Parthenolid (0,3-300 μM) und Denatoniumbenzoat (1-1000 μM) stimuliert und die resultierenden ΔF/F-Werte (Y-Achse) gegen die Agonistenkonzentration (X-Achse) aufgetragen. Die Graphen stellen die Ergebnisse wiederholter Experimente dar. Die statistische Auswertung der hTAS2R46^{Y3.29A}-Mutante erfolgte als *One-way*-ANOVA und *Tukey post-hoc*-Test bei 95 % Konfidenzintervall (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001) stets im Vergleich zum hTAS2R46-WT-Rezeptor. (B) Zellen die den Rezeptorwildtyp, die Rezeptormutanten und MOCK exprimieren, wurden fixiert und der C-terminale HSV-Epitop (grün), sowie die Zellmembran (rot) nachgewiesen. Die Auswertung der Färbung erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Abgebildet sind exemplarisch nur die Überlagerungen des hTAS2R46-WT, der hTAS2R46-Y85^{3.29A}-Mutante und der Leerkontrolle (MOCK). Die Bilder wurden mit folgenden Parametern aufgenommen: 40fach Objektiv, 1,5fache digitale Vergrößerung, Maßstab (weißer Balken): 50 μm.

4. Diskussion

4.1 3D-Homologiemodellierung bei Bittergeschmacksrezeptoren

Der Nutzen von 3D-*in-silico*-Rezeptormodellierung als Hilfsmittel bei der Identifikation von möglichen Agonisten-Rezeptor-Interaktionen konnte für die Rezeptoren hTAS2R1 (Upadhyaya *et al.* 2010; Dai *et al.* 2011; Singh *et al.* 2011), -R16 (Sakurai *et al.* 2010a), -R38 (Biarnes *et al.* 2010) und -R46 (Brockhoff *et al.* 2010) bereits gezeigt werden. Auch in dieser Arbeit wurde die 3D-*in-silico*-Rezeptormodellierung als Hilfsmittel zur Identifizierung von möglichen Interaktionen zwischen dem hTAS2R10 und den untersuchten Agonisten benutzt. Das verwendete 3D-Modell des hTAS2R10 kann jedoch nicht mit absoluter Sicherheit die Realität widerspiegeln. Bei dem verwendeten Modell und dem ebenfalls durchgeführten Agonisten-*Docking* handelt es sich nicht um eine experimentell gewonnene Struktur, sondern um ein Homologiemodell des hTAS2R10, basierend auf der Struktur des β 2-adrenergen Rezeptors. Es ist bekannt, dass diese Homologiemodelle mit einer gewissen Ungenauigkeit behaftet sind (Congreve *et al.* 2011). Dieser Fehler wird umso größer, je kleiner die Homologie zwischen der Ausgangsstruktur und dem zu modellierenden Rezeptor ist (Congreve *et al.* 2011; Kolb *et al.* 2011). Es ist außerdem bekannt, dass die Homologiemodellierung von Rezeptoren nur so gut ist wie die Ausgangsstruktur, die zur Modellierung verwendet wurde (Congreve *et al.* 2011). Daneben zeigen Untersuchungen, dass die Homologiestrukturen, die vor 2007 erstellt wurden, teilweise mit den späteren Kristallstrukturen, insbesondere in Bezug auf Bindungstaschen und den gedockten Agonisten, nicht übereinstimmten (Kolb *et al.* 2011). Seit 2007 nahm die Anzahl der aufgeklärten GPCR-Kristallstrukturen stark zu, was unter anderem an den verbesserten Kristallisationstechniken lag (Kolb *et al.* 2011). Entsprechend nahm ebenfalls auch die Qualität der Homologiemodelle und deren Vorhersagekraft zu (Kolb *et al.* 2011).

Die Verifizierung des in dieser Arbeit verwendeten 3D-Homologiemodells erfolgte mittels experimenteller Untersuchungen. Die folgenden Ausführungen werden zeigen, dass die in dieser Arbeit ermittelten experimentellen Daten des verwendeten Homologiemodells des hTAS2R10 basierend auf den β 2-adrenergen Rezeptor bestätigen.

4.2 Kartierung der hTAS2R10-Bindungstasche

In dieser Arbeit konnte mittels computergestützter Modellierung (Abschnitt 3.1.1 und Abschnitt 3.1.2) und experimentellen Untersuchungen (Abschnitt 3.1.3) gezeigt werden, dass der hTAS2R10 nur eine Bindungstasche besitzt. Diese Aussage wird durch die Resultate zu den Untersuchungen der Aminosäurepositionen S85^{3,29} (Abschnitt 3.1.4) und Q175^{5,40} (Abschnitt 3.1.6) gestützt. Es konnte gezeigt werden, dass die Seitenketten dieser Aminosäurepositionen direkt an der Interaktion mit den untersuchten Agonisten beteiligt sind. Die Interaktionen mit den untersuchten Agonisten erfolgen dementsprechend nur in einer begrenzten Region des Rezeptors, somit in einer einzelnen Bindungstasche. Bei der hohen Anzahl an Agonisten des hTAS2R10 (Meyerhof *et al.* 2010) ist es möglich, dass auch noch andere Bindungsregionen innerhalb der Bindungstasche beteiligt sind. Die detaillierte Beschreibung der Interaktionsmechanismen der Positionen 3.29 und 5.40 erfolgt im Abschnitt 4.3.

Dass Bittergeschmacksrezeptoren nur eine Bindungstasche besitzen, konnte für die Rezeptoren hTAS2R1 (Upadhyaya *et al.* 2010), -R16 (Sakurai *et al.* 2010a; Sakurai *et al.* 2010b), und -R46 (Brockhoff *et al.* 2010) gezeigt werden. So belegen die Untersuchungen zum hTAS2R16, dass unterschiedliche Agonisten über die gleichen Aminosäurepositionen vermittelt werden. Auch die Untersuchungen am hTAS2R1 (Upadhyaya *et al.* 2010), sowie dem hTAS2R46 und dessen nahe verwandte Rezeptoren hTAS2R31 und -R43 (Brockhoff *et al.* 2010) zeigten, dass die Interaktion mit unterschiedlichen Agonisten über eine begrenzte Anzahl überlappender Aminosäuren abläuft (Brockhoff *et al.* 2010). Diese Resultate sprechen für eine Bindungstasche. Bei mehreren Bindungstaschen würden die Interaktionen mit unterschiedlichen Agonisten über eine größere Anzahl unterschiedlicher nicht überlappender Aminosäurepositionen vermittelt werden. Für den Rezeptor hTAS2R38 wird ebenfalls nur eine Bindungstasche vermutet (Biarnes *et al.* 2010). Die Ausformung nur einer Bindungstasche lässt sich auch in den zur Modellierung des hTAS2R10 verwendeten Kristallstrukturen des photoaktivierten Rinderrhodopsins (Salom *et al.* 2006) und des β 2-adrenergen Rezeptors (Rasmussen *et al.* 2011), sowie bei den anderen bisher gelösten GPCR-Kristallstrukturen (Kolb *et al.* 2011) beobachten. Dies lässt vermuten, dass alle Bittergeschmacksrezeptoren nur eine Bindungstasche besitzen. Jedoch wurden bisher nur 1/5 der bekannten Bittergeschmacksrezeptoren auf ihre Agonisteninteraktion hin im Detail charakterisiert. Es wäre also möglich, dass es Ausnahmen gibt, vor allem wenn man in Betracht zieht, dass die Bittergeschmacksrezeptoren eine sehr heterogene Gruppe von G-

Protein-gekoppelten Rezeptoren sind, die in ihrer Aminosäuresequenzidentität von 17 bis 90 % variieren (eigener Sequenzvergleich der Bittergeschmacksrezeptoren). Eine Tatsache, die eine solche Möglichkeit unterstützt ist die, dass die Bittergeschmacksrezeptoren eine große Anzahl unterschiedlichster Stoffe detektieren können. Ein Beispiel aus dem Bereich der Geschmacksforschung, dass Rezeptoren mehrere Bindungsstellen und –taschen zur Detektion besitzen können, ist der Süßgeschmacksrezeptor (Behrens *et al.* 2011), wie in Abb. 41 ersichtlich. Für einen abschließenden Befund müssten jedoch alle Bittergeschmacksrezeptoren in Hinblick auf ihre Struktur-Funktions-Beziehung charakterisiert werden.

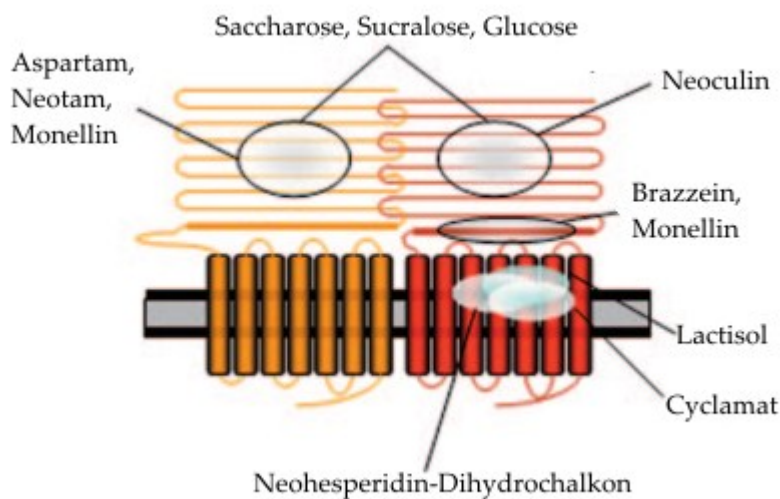


Abb. 41: Bindungsstellen des Süßgeschmacksrezeptors TAS1R2 + TAS1R3

Abgebildet sind die zwei Untereinheiten des Süßgeschmacksrezeptors TAS1R2 (orangefarben) und TAS1R3 (rot) mit den Bindungsstellen für die unterschiedlichen Agonisten. Abb. modifiziert nach Behrens *et al.* 2011.

Die für die Agonisteninteraktion wichtigen Transmembrandomänen (TM) im hTAS2R10 sind TM 3, 5, 6 und 7 (entsprechend Abb. 46). Die bei allen charakterisierten Rezeptoren (Biarnes *et al.* 2010; Brockhoff *et al.* 2010; Sakurai *et al.* 2010a; Sakurai *et al.* 2010b; Dai *et al.* 2011) als wichtig erachteten Transmembrandomänen 3 und 6, sind auch im hTAS2R10 von Bedeutung. TM 3 wurde ebenfalls in den Rezeptoren hTAS2R1 (Upadhyaya *et al.* 2010; Dai *et al.* 2011; Singh *et al.* 2011), hTAS2R16 (Sakurai *et al.* 2010a; Sakurai *et al.* 2010b) und hTAS2R38 (Biarnes *et al.* 2010) als wichtig angesehen. Die TM 5 wurde ebenfalls bei den Rezeptoren hTAS2R1 (Dai *et al.* 2011) und hTAS2R16 (Sakurai *et al.* 2010a; Sakurai *et al.* 2010b) beschrieben. TM 7 wurde gleichfalls bei den Rezeptoren hTAS2R1 (Upadhyaya *et al.* 2010; Dai *et al.* 2011; Singh *et al.* 2011), hTAS2R38 (Biarnes *et al.* 2010) und hTAS2R46

(Brockhoff *et al.* 2010) identifiziert. TM 1 und 2 scheinen keine Bedeutung bei der Agonisteninteraktion im hTAS2R10 zu haben, im Gegensatz zum hTAS2R1 (Upadhyaya *et al.* 2010; Singh *et al.* 2011).

Wie bei allen anderen untersuchten Rezeptoren (Biarnes *et al.* 2010; Brockhoff *et al.* 2010; Sakurai *et al.* 2010a; Sakurai *et al.* 2010b; Upadhyaya *et al.* 2010; Dai *et al.* 2011; Singh *et al.* 2011) konnte auch im hTAS2R10 keine Position in TM 4 mit einem Beitrag zur Agonisteninteraktion beobachtet werden. Es lässt sich zusammenfassen, dass die für Agonisteninteraktionen nachweislich wichtigen Transmembrandomänen in den bisher untersuchten Bittergeschmacksrezeptoren TM 3, 5, 6 und 7 sind.

Die Agonistenbindung der wohl am besten untersuchten GPCR, Rhodopsin und β 2-adrenerger Rezeptor (Kolb *et al.* 2011), wird über polare und hydrophobe Bereiche der TM 3, 5, 6 und 7 vermittelt (Rosenbaum *et al.* 2009), wie auch bei den Bittergeschmacksrezeptoren (s.o.). Daneben konnte auch gezeigt werden, dass sich TM 5 und 6 bei der Aktivierung der GPCR voneinander weg bewegen, was als Notwendigkeit der Aktivierung von GPCR angesehen wird (Kolb *et al.* 2011). Zum Beispiel beträgt die Bewegung des interzellulären Endes von TM 6 des β 2-adrenergen Rezeptors 14 Å (Rasmussen *et al.* 2011), was den höchsten Grad an beobachteter Aktivierung darstellt (Kolb *et al.* 2011). Beim Rhodopsin konnte gezeigt werden, dass das extrazelluläre Ende in Transmembrandomäne 4 zusammen mit den extrazellulären Enden der TM 5 und TM 6, sowie Bereichen in den zweiten extrazellulären Schleifen (EL2) an Wasserstoffbrückennetzwerken beteiligt sind, welche Konformationsänderungen beim isomerisieren des Retinals ermöglichen (Ahuja *et al.* 2009). Für den D2-Dopaminrezeptor konnte gezeigt werden, dass TM 4 an der Rezeptorhomodimerisierung beteiligt ist (Lee *et al.* 2003). Es ist bekannt, dass Bittergeschmacksrezeptoren Homo- und Heterodimere bilden (Kuhn *et al.* 2010). Ob daran ebenfalls TM 4 beteiligt ist muss erst noch untersucht werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die TM 4 in bisher publizierten GPCR-Strukturen nicht an der Agonisteninteraktion beteiligt zu sein scheint.

Die extrazellulären und intrazellulären Schleifen des hTAS2R10 wurden in dieser Arbeit nicht betrachtet. Deren Beitrag an der Agonisteninteraktion und an der G-Protein-Kopplung ist dementsprechend nicht untersucht worden.

Die Aminosäurepositionen S85^{3.29}, W88^{3.32}, V89^{3.33}, N92^{3.36}, Q93^{3.37}, I183^{5.48}, F236^{6.48}, Y239^{6.51}, M263^{7.39} und T266^{7.42} wurden mittels des eingangs verwendeten hTAS2R10-3D-Modells, basierend auf Rhodopsin, als am Aufbau der Bindungstasche beteiligte Positionen identifiziert. Die Validierung erfolgte mittels der in Abschnitt 3.1.3 beschriebenen Alanin-

Mutagenese und anschließender Untersuchung der Alanin-Mutanten mittels *Ca-Imaging*-Analyse. Die Messung dieser Alanin-Mutanten ergab, dass sich die Aktivierung nach Stimulation mit den drei Agonisten Strychnin, Parthenolid und Denatoniumbenzoat für alle Mutanten, im Vergleich zum Wildtyprezeptor, änderte. So ergab die Untersuchung der Alanin-Mutanten der Aminosäurepositionen W88^{3.32}, N92^{3.36}, Q93^{3.37}, I183^{5.48}, F236^{6.48}, Y239^{6.51} und M263^{7.39}, dass diese nach Stimulation mit den ausgewählten Agonisten im gemessenen Konzentrationsbereich nicht mehr aktiviert werden konnten bzw. die Aktivierung so gering war, dass sie sich statistisch nicht von der Messung der MOCK-Kontrolle unterschied (entsprechend Abb. 16A). Bei diesen Aminosäurepositionen kann nicht unterschieden werden, ob die Seitenketten dieser Aminosäuren einen Einfluss auf Agonisteninteraktion, Rezeptoraktivierung oder Konformation haben. Nach dem Aminosäureaustausch der Aminosäurepositionen V89^{3.33} und T266^{7.42} zu Alanin und der Analyse der resultierenden Rezeptormutanten konnte eine generell geringere Aktivierung auf Strychnin, Parthenolid und Denatoniumbenzoat (Abb. 16B) als beim unveränderten Rezeptor beobachtet werden. Diese Aminosäurepositionen könnten über ihre Seitenketten mit den Agonisten auf eine nicht agonistenselektive Weise z.B. über intermolekulare Wechselwirkungen interagieren. Für die Aminosäureposition S85^{3.29} konnte eine agonistenselektive Änderung der Rezeptoraktivität nach Mutation zu Alanin während der Messung beobachtet werden (Abb. 16C). Das spricht dafür, dass diese Positionen S85^{3.29}, W88^{3.32}, V89^{3.33}, N92^{3.36}, Q93^{3.37}, I183^{5.48}, F236^{6.48}, Y239^{6.51}, M263^{7.39} und T266^{7.42} an der Ausformung der Bindungstasche beteiligt sein können. Die Überprüfung dieser Positionen mittels des neueren hTAS2R10-3D-Modells, basierend auf dem β 2-adrenergen Rezeptor ergab, dass die Seitenkette des Isoleucins in Position 183^{5.48} nicht in Richtung der Bindungstasche zeigt und dementsprechend wohl nicht an Interaktionen mit den Agonisten beteiligt ist. Die Mutation dieser Aminosäureposition zu Alanin resultierte in einem Funktionsverlust. Demnach ist es auch möglich, dass diese Aminosäureposition nicht an Agonisteninteraktionen, sondern lediglich an der Rezeptoraktivierung beteiligt ist. Die Seitenketten der anderen Aminosäurepositionen formen auch in diesem neuen Modell die Bindungstasche. Auf mögliche Interaktionen zwischen den Aminosäurepositionen des hTAS2R10 und den Agonisten wird im nächsten Abschnitt ausführlich eingegangen. An der Ausformung der Bindungstasche sind auch die Aminosäurepositionen Q175^{5.40} und L178^{5.43} beteiligt, da sie an Agonisteninteraktionen beteiligt sind und somit auch zur Form und Größe der Bindungstasche beitragen. Ihre Funktion wird ebenfalls im nächsten Abschnitt genauer beschrieben.

Im hTAS2R1 sind die Positionen, die die 4 Å große Bindungstasche bestimmen F6^{1.32}, F17^{1.43}, L19^{1.45}, F22^{1.48}, T23^{1.49}, I26^{1.52}, I62^{2.54}, F63^{2.55}, N66^{2.61}, V69^{2.64}, I70^{2.65}, L85^{3.32}, L86^{3.33}, N89^{3.36}, E90^{3.37}, H240^{6.51}, F257^{7.33}, L260^{7.36}, F261^{7.37}, F262^{7.38}, I263^{7.39}, L264^{7.40}, E267^{7.43} (Upadhyaya *et al.* 2010). Die Angabe von teilweise mehr als drei nebeneinander liegenden Aminosäurepositionen (eine vollständige Windung in der α -Helix) spricht dafür, dass Upadhyaya *et al.* auch Positionen beschrieben haben, die nicht in die Richtung der Bindungstasche zeigen. Ob diese dann tatsächlich Form und Größe der Bindungstasche bestimmen, muss angezweifelt werden. Die Positionen 3.36, 3.37, 6.51 und 7.39 sind auch im hTAS2R10 an der Ausformung der Bindungstasche beteiligt. Für den hTAS2R16 ist beschrieben worden, dass dort die Positionen E86^{3.33}, F93^{3.40}, W94^{3.41}, H181^{5.41}, F240^{6.52} und I243^{6.55} an der Ausformung der Bindungstasche beteiligt sind (Sakurai *et al.* 2010a). Die Position 3.33 konnte experimentell im hTAS2R10 an der Formung der Bindungstasche identifiziert werden. Im hTAS2R38 sind die Positionen W99^{3.32}, M100^{3.33}, N103^{3.36} und S259^{6.51} formgebend für die Bindungstasche (Biarnes *et al.* 2010). All diese Positionen konnten auch im hTAS2R10 als Mitglieder der Bindungstasche identifiziert werden. Für den Rezeptor hTAS2R46 (Brockhoff *et al.* 2010) wurden die Positionen L58^{2.53}, W66^{2.61}, W88^{3.32}, A89^{3.33}, F234^{6.44}, Y241^{6.51}, I245^{6.55}, E265^{7.39}, A268^{7.42}, F269^{7.43} und Y271^{7.45} an der Ausformung einer möglichen Bindungstasche benannt. Die Positionen 3.32, 3.33, 6.51, 7.39 und 7.42 konnten auch im hTAS2R10 an der Ausformung der Bindungstasche beobachtet werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Bindungstaschen der bisher charakterisierten Bittergeschmacksrezeptoren im oberen, zum extrazellulären Raum hin gerichteten Bereich der Transmembrandomänen der Rezeptoren lokalisiert sind, (entsprechend Abb. 46). Die Positionen, die an der Ausformung der Bindungstasche beteiligt sind überlappen dabei teilweise.

In der Studie Kolb *et al.* 2011 wurden 20 der vorhandenen Kristallstrukturen unterschiedlicher GPCR (β_1 - und β_2 -adrenerge Rezeptor, Adenosin A_{2A}-Rezeptor, Dopamin D₃-Rezeptor, CXCR4-Rezeptor und Histamin H₁-Rezeptor) überlagert, wobei sich herausstellte, dass die Bindungstaschen dieser Rezeptoren, wie bei den Bittergeschmacksrezeptoren, im oberen, zum extrazellulären Raum hin gerichteten Bereich der Transmembrandomänen der Rezeptoren lokalisiert sind. Die Form und das Volumen der Bindungstaschen variiert dabei jedoch teilweise.

4.3 Struktur-Funktions-Beziehungen des hTAS2R10

Neben der Charakterisierung der Bindungstasche in Form, Ausdehnung und Lokalisation innerhalb des Bittergeschmacksrezeptors hTAS2R10 wurden in erster Linie Aminosäurepositionen untersucht, die über ihre Seitenketten mit den untersuchten Agonisten Strychnin, Parthenolid und Denatoniumbenzoat interagieren können. Die Bestimmung von potentiell wichtigen Positionen erfolgte sowohl experimentell – mittels Mutagenese – und pharmakologischer Untersuchungen, als auch in Form einer Kombination aus computergestützter Modellierung des Rezeptors und Agonisten-*Docking*. In dem eingangs verwendeten hTAS2R10-3D-Modell, basierend auf Rhodopsin, gab es jedoch eine Diskrepanz zwischen den experimentellen Daten für Positionen aus Transmembrandomäne (TM) 5 und dem Modell. Eine dieser Positionen war K174^{5,39}. Nach dem eingangs benutzten hTAS2R10-Homologiemodell basierend auf Rhodopsin, zeigte diese Position in Richtung Bindungstasche und besaß Kontakt zu den untersuchten Agonisten (Abb. 42A), jedoch ergab die experimentelle Analyse, dass diese Position nicht an agonistenselektiven Interaktionen beteiligt sein kann, was sich im ungefähr gleichen pharmakologischen Verhalten nach Mutation zu Alanin und Leucin (entsprechend Abb. 22) widerspiegelt.

Eine weitere Aminosäureposition mit Unterschieden in den experimentellen Daten und dem Modell ist L178^{5,43}. Nach dem hTAS2R10-Homologiemodell basierend auf Rhodopsin ist diese Position zu weit entfernt für Interaktionen (Daten nicht gezeigt). Es konnte aber zuvor im Abschnitt 3.1.6 gezeigt werden, dass die Mutation dieser Position zu einer kleineren wie Alanin und einer größeren Aminosäure wie Phenylalanin, zu einer nicht agonistenselektiven Änderung in der Aktivität nach Stimulation mit Strychnin, Parthenolid und Denatoniumbenzoat führte (entsprechend Abb. 23). Die Ergebnisse sprechen dafür, dass sich diese Position in räumlicher Nähe zu den Agonisten befindet. In diesen offensichtlichen Unterschieden liegt die Neumodellierung des hTAS2R10 begründet. Es wurde dabei auf Struktur des β 2-adrenergen Rezeptors im aktivierten Zustand zurückgegriffen (Rasmussen *et al.* 2011).

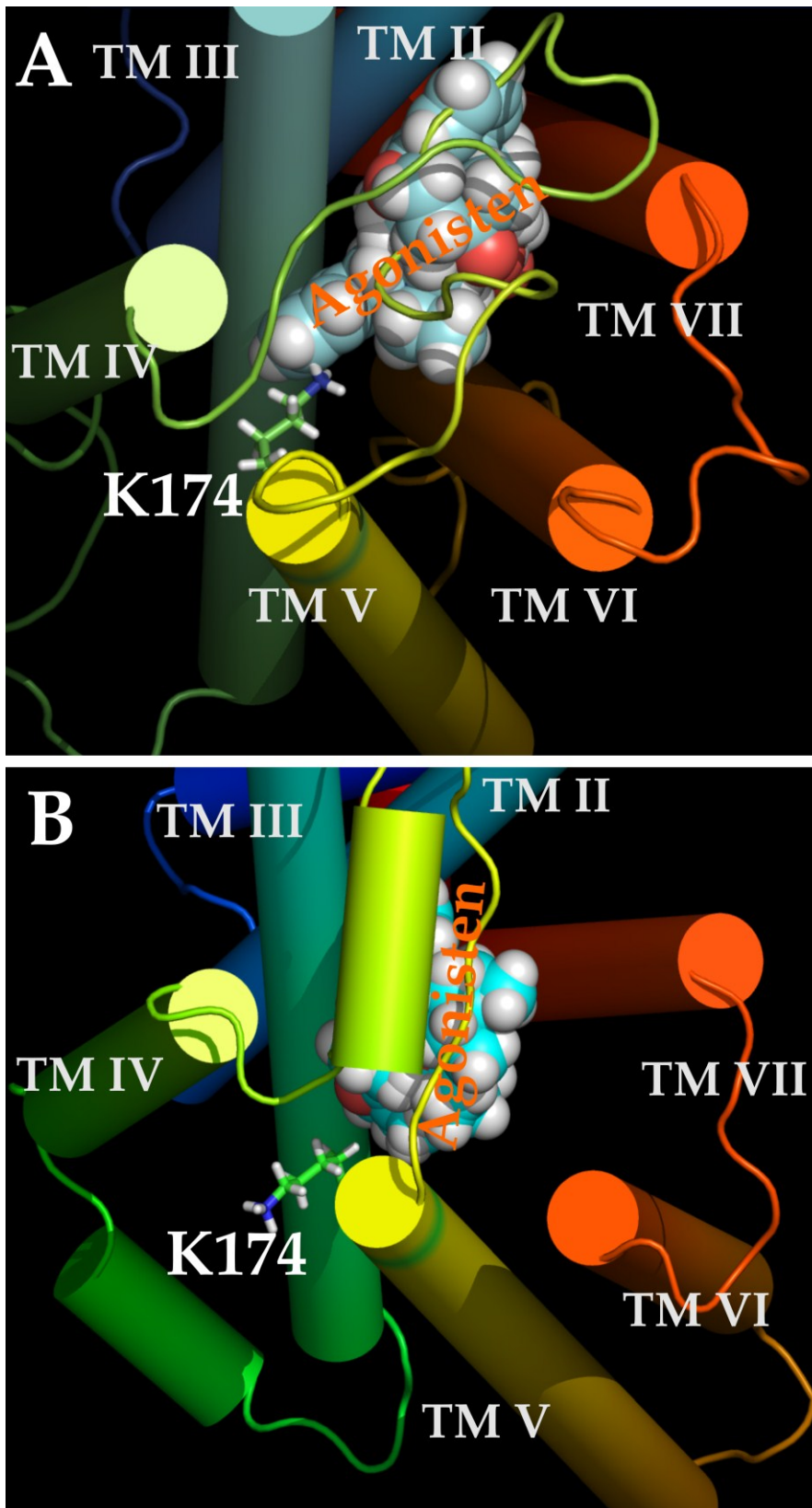


Abb. 42: Position K174^{5,39} in den unterschiedlichen hTAS2R10-3D-Modellen

Das hTAS2R10-3D-Modell, basierend auf dem bovinen Rhodopsin (A) und auf dem β 2-adrenergen Rezeptor (B), dargestellt als Aufsicht. Die

Transmembrandomänen (TM) sind in einer Regenbogenfärbung dargestellt und mit

römischen Zahlen nummeriert. Die gedockten Agonisten Strychnin,

Parthenolid und Denatoniumbenzoat wurden überlagert und sind als

Kalottenmodell dargestellt: Kohlenstoffatome in cyan,

Sauerstoffatome in rot, Stickstoffatome in blau und

Wasserstoffatome in weiß. Die Atome der Aminosäure K174^{5,39} sind wie folgt

dargestellt: Kohlenstoffatome in grün, Sauerstoffatome in rot,

Stickstoffatome in blau und Wasserstoffatome in weiß.

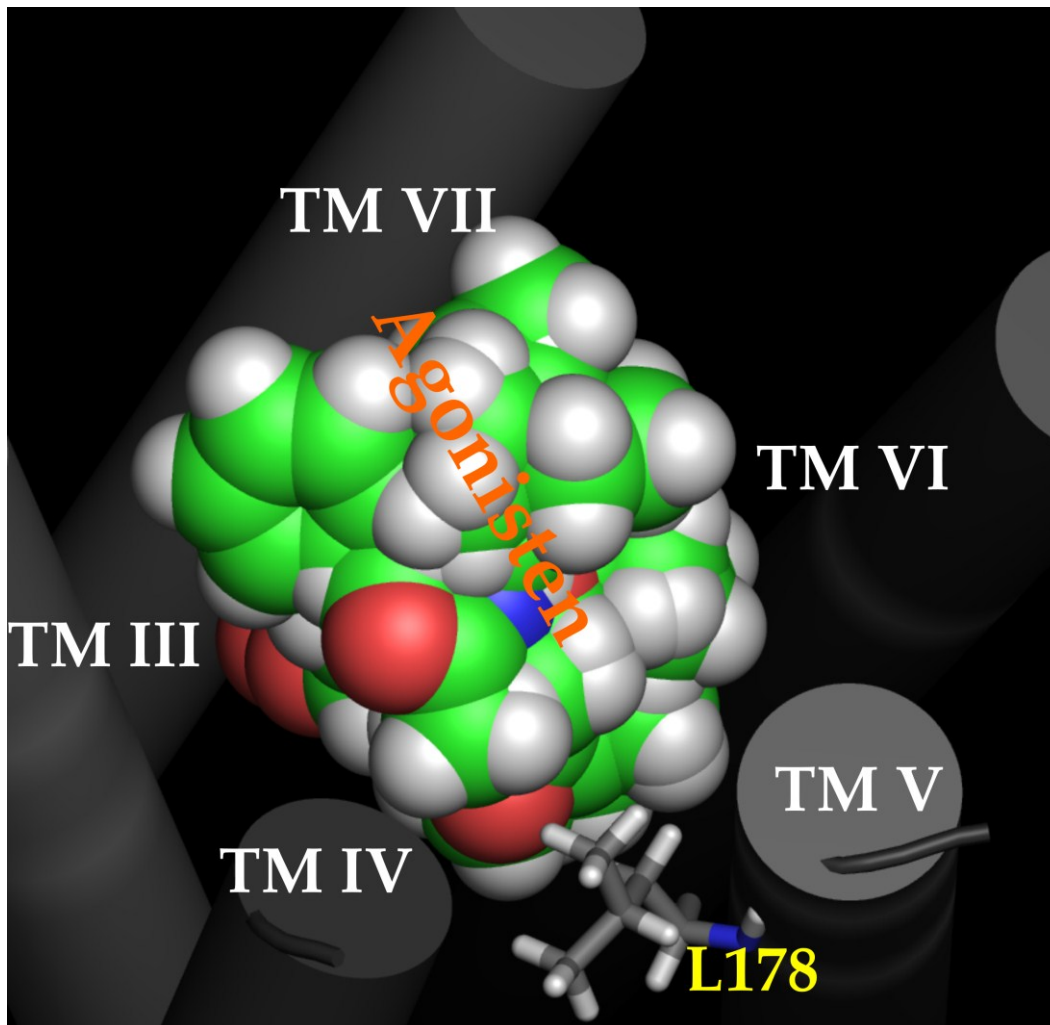


Abb. 43: Position L178^{5.43} im hTAS2R10-3D-Modell

Das 3D-Modell des hTAS2R10 basierend auf dem β 2-adrenergen Rezeptor in einer leicht angewinkelten Aufsicht. Die Transmembrandomänen (TM) sind in unterschiedlichen Grautönen dargestellt und mit römischen Zahlen nummeriert. Die gedockten Agonisten Strychnin, Parthenolid und Denatoniumbenzoat wurden überlagert und sind als Kalottenmodell dargestellt: Kohlenstoffatome in grün, Sauerstoffatome in rot, Stickstoffatome in blau und Wasserstoffatome in weiß. Die Atome der Aminosäure L178 sind wie folgt dargestellt: C-Atome: grau, H-Atome: weiß, O-Atome: rot, N-Atome: blau.

Nach Korrektur des 3D-Modells des hTAS2R10 entsprach das Modell den experimentellen Daten. So zeigte die Aminosäureposition K174^{5.39} im finalen Homologiemodell des hTAS2R10 basierend auf dem β 2-adrenergen Rezeptor (Abb. 42B) nicht in Richtung der Bindungstasche. Dies würde das ähnliche pharmakologische Verhalten der Leucin- und Alanin-Mutanten der Position K174^{5.39} erklären. Auch das in Abschnitt 3.1.7 durchgeführte Agonisten-Docking sagt keine Möglichkeit der Interaktion für die Position voraus. Es scheint demnach, dass diese Position an der Rezeptoraktivierung und den Intra-Rezeptor-Wechselwirkungen beteiligt ist. Auch für die Aminosäureposition L178^{5.53} entsprach nun die Positionierung von L178^{5.43} im 3D-Modell des hTAS2R10 den experimentellen Daten. Für

die Agonisteninteraktion dieser Position lässt sich vermuten, dass zwischen L178^{5.43} und den drei Agonisten eine sterische Hinderung vorliegt (entsprechend Abb. 43, räumliche Nähe zu den drei Agonisten). Der Aminosäureaustausch zu der kleineren Aminosäure Alanin verringerte diese sterische Hinderung. Die Mutation zu einer größeren Aminosäure wie Phenylalanin verstärkt diese sterische Hinderung. Das 3D-Modell des hTAS2R10 basierend auf dem β 2-adrenergen Rezeptor spiegelt sehr gut die gewonnen experimentellen Daten wieder. Im Folgenden wird daher zur Veranschaulichung von Interaktionen dieses hTAS2R10-3D-Modell verwendet.

In dieser Arbeit konnten zwei Aminosäurepositionen im hTAS2R10 mit agonistenselektiven Wechselwirkungen für die untersuchten Agonisten Strychnin, Parthenolid und Denatoniumbenzoat bestimmt werden. Dabei handelt es sich um Position S85^{3.29} und Q175^{5.40} (entsprechend Abb. 25). Es konnte für die Position S85^{3.29} gezeigt werden, dass die Seitenkette des Serins über die OH-Gruppe mit Strychnin interagiert. So führte der Verlust der OH-Gruppe nach Mutation zu Alanin, Cystein und Valin zu einer verringerten Aktivierung, bis hin zu einem Funktionsverlust nach Stimulation mit Strychnin (entsprechend Abschnitt 3.1.4 Abb. 18A und B). Die Mutation von Serin zu Threonin verbesserte leicht die Aktivierung auf den Strychnin-Stimulus (Abb. 18A und B). Nach dem in Abschnitt 3.1.7 durchgeführten Agonisten-*Docking* für Strychnin (entsprechend Abb. 25B) wird für die Interaktion zwischen S85^{3.29} und Strychnin eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der OH-Gruppe des Serins und der Carbonylgruppe im Strychnin vorgeschlagen (entsprechend Abb. 25B). Die Aminosäureposition Q175^{5.40} befindet sich nach dem 3D-Modell des hTAS2R10 in einem Abstand von 3,6 Å zu Strychnin (Abb. 25B). Die Mutation dieser Position zu einer kleinen unpolaren Aminosäure (Alanin) führte zu einer verbesserten Aktivierung nach Stimulation mit Strychnin (entsprechend Abb. 24B). Die Mutation von Q175^{5.40} zu der unpolaren Aminosäure Leucin und der sterisch großen unpolaren Aminosäure Tyrosin, welche eine funktionelle OH-Gruppe besitzt, führte zu einer Funktionsreduzierung nach Stimulation mit Strychnin (entsprechend Abb. 24B und Abb. 33 Mitte). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Position Q175^{5.40} vermutlich Strychnin sterisch hindert perfekt in die Bindungstasche zu passen, wodurch die Reaktion auf Strychnin von Q175^{5.40} schlechter war als die der Alanin-Rezeptormutante. Größere Aminosäuren wie Tyrosin an dieser Position verstärken diesen Effekt noch. Vermutlich stört nicht nur die Größe sondern auch die polare funktionelle Amidgruppe. Diese Vermutung wird durch den durchgeführten Austausch zu einer um ein Kohlenstoffatom kürzeren Aminosäure (Asparagin), mit derselben funktionellen Amidgruppe gestützt. Dieser Austausch führte zu

keinem signifikanten Unterschied bei der Aktivierung mit Strychnin (entsprechend Abb. 24B). Für die Interaktion zwischen Parthenolid und der Aminosäureposition S85^{3,29} konnte eine sterische Hinderung nachgewiesen werden. So führte die Mutation dieser Position zu der kleinen unpolaren Aminosäure Alanin zu einer signifikant gesteigerten Aktivierung nach Stimulation mit Parthenolid. Entgegengesetzt führte der Austausch zu einer größeren polaren (Threonin) und zu einer größeren unpolaren Aminosäure (Valin), sowie zu einer Aminosäure mit einer anderen funktionellen Gruppe (Cystein), zu einer reduzierten Aktivierung nach Stimulation mit Parthenolid (entsprechend Abb. 18B). Nach dem in Abschnitt 3.1.7 durchgeführten Agonisten-*Docking* mit Parthenolid (Abb. 25C) befindet sich die OH-Gruppe des Serins von Position 3.29 in einem Abstand von 3,7 Å zur Methylgruppe am Terpen-Ring A (entsprechend Nomenklatur Abb. 6 und Abb. 14), was eine sterische Hinderung ermöglicht. Die gesteigerte Reaktion auf Parthenolid nach dem Austausch von Serin zu Alanin kann über die Methylgruppenwechselwirkungen zwischen Alanin und Parthenolid erklärt werden. So zeigten Untersuchungen zu den Wechselwirkungen von helikalen Membranproteinen in Rezeptoren, dass Seitenketten mit gleichen Eigenschaften und funktionellen Gruppen bevorzugt miteinander interagieren; also z.B. Methylgruppen mit Methylgruppen oder Hydroxylgruppen mit Hydroxylgruppen (Jha *et al.* 2011). Demnach interagiert Alanin besonders gut mit Methylgruppen, wie z.B. der Methylgruppe in Parthenolid. Für die Wechselwirkung zwischen Q175^{5,40} und Parthenolid gibt das Agonisten-*Docking* (Abb. 25C) nur an, dass diese Aminosäureposition sich in räumlicher Nähe zu Parthenolid befindet (Abb. 25C). Es können demnach Van-der-Waals-, hydrophobe und andere intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Parthenolid und der Seitenkette von Q175^{5,40} auftreten. Die Mutation zu einer kürzeren Aminosäure mit derselben funktionellen Gruppe (Asparagin), sowie zu größeren Aminosäuren wie Leucin und Tyrosin (Abb. 24 und Abb. 33 Mitte), führen zur Störung dieser intermolekularen Wechselwirkungen, wodurch die Reaktion auf den Parthenolid-Stimulus unterschiedlich stark reduziert ist. Interessanterweise hat die Mutation zu Alanin zu einer nur leicht verringerten Reaktion auf den Parthenolid-Stimulus geführt. Eine mögliche Erklärung wäre eine Änderung in der Polarität der Bindungstasche an dieser Stelle durch die Mutation zu Alanin, welche die Interaktion zu Parthenolid nicht negativ beeinflusst. Für die Interaktion zwischen Denatoniumbenzoat und der Position S85^{3,29} können intermolekulare Wechselwirkungen wie Van-der-Waals- und hydrophobe Wechselwirkungen vermutet werden (Abstand ca. 3,0 Å entsprechend Abb. 25D). Auch das durchgeführte Agonisten-*Docking* sagt intermolekulare Wechselwirkungen voraus (Abb. 25D). Experimentell zeigte sich, dass der Austausch von Serin zu Alanin und Threonin nur zu einer

geringen Störung der hydrophoben oder anderen intermolekularen Wechselwirkungen zwischen der Position 3.29 und Denatoniumbenzoat führte (entsprechend Abb. 18B). Wohingegen der Austausch zu Cystein die hydrophoben Wechselwirkung deutlich stärker störte. Die Mutation zu der großen Aminosäure Valin verringerte den Platz für Denatoniumbenzoat soweit, dass dieser Austausch zu einem Funktionsverlust bei Stimulation mit diesem Agonisten führte. Für die Wechselwirkung zwischen der Seitenkette von Q175^{5.40} und Denatoniumbenzoat zeigte der Austausch des Glutamins gegen die kürzere Aminosäure mit der gleichen funktionellen Gruppe Asparagin, sowie zur unpolaren kleineren Aminosäure Alanin, zur unpolaren Aminosäure mit OH-Gruppe Tyrosin und zur unpolaren Aminosäure Leucin eine Minderung in der Aktivierung nach dem Denatoniumbenzoat-Stimulus in unterschiedlichem Ausmaße. Das zeigt, dass die Amidgruppe des Glutamins für die Interaktion mit Denatoniumbenzoat notwendig ist. Das spricht dafür, dass dieser Agonist über eine Wasserstoffbrückenbindung mit Q175^{5.40} interagiert. Das Agonisten-*Docking* aus Abschnitt 3.1.7 unterstützte diese Vermutung. Demnach wechselwirkt der Carbonylsauerstoff des Denatonium mit der Amidgruppe von Q175^{5.40} über eine Wasserstoffbrückenbindung.

Neben den beiden Positionen, die agonistenselektive Wechselwirkungen mit den drei untersuchten Agonisten zeigten, wurden mittels der Kombination aus experimentellen Charakterisierungen von Aminosäurepositionen und dem Agonisten-*Docking* zwei hochkonservierte Positionen identifiziert, deren nicht agonistenselektive Wechselwirkungen für die Aktivierung des Rezeptors notwendig sind. Diese Positionen sind W88^{3.32} und Y239^{6.51}. So besitzen 21 der 25 Bittergeschmacksrezeptoren an Position 3.32 ein Tryptophan (entsprechend Abb. 50). In ersten Untersuchungen zur Struktur-Funktions-Beziehungen konnte gezeigt werden, dass diese Position die Rezeptoraktivität beeinflussen kann (Pronin *et al.* 2004). Tryptophan ist eine große Aminosäure mit der Möglichkeit zu Wasserstoffbrückenbindungen und π -Wechselwirkungen. So lässt sich auf Grundlage des in Abschnitt 3.1.7 durchgeführten Agonisten-*Dockings* vermuten, dass W88^{3.32} über Wasserstoffbrücken mit dem Carbonylsauerstoff des Lacton-Ringes und dem Lacton-Ring-Sauerstoff von Parthenolid wechselwirkt (Abb. 25C). π -Wechselwirkungen in Form von π -Kation-Interaktionen sind die favorisierten Wechselwirkungen zwischen dem protonierten N19 des Strychnins und W88^{3.32}, sowie zwischen dem Stickstoff des quartärenamins von Denatonium und W88^{3.32} (Abb. 25B und D). Wie in Abschnitt 3.1.8 bereits erwähnt, ist durch die Begrenzung auf 20 proteinogene Aminosäuren der Nachweis dieser Wechselwirkungen schwierig. Die zum Austausch ausgewählten Aminosäuren Phenylalanin und Histidin besitzen

ebenfalls die Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen (Histidin) und π -Wechselwirkungen (Histidin und Phenylalanin). Sie sind aber nachweislich schwächer als bei Tryptophan (Dougherty 1996; Mecozzi *et al.* 1996). Die stark reduzierte Aktivierung bzw. der Funktionsverlust nach Mutation von W88^{3.32} war dementsprechend zu erwarten. Zusammenfassend lässt sich nur sagen, dass die vorgeschlagenen Interaktionen über Wasserstoffbrücken und π -Wechselwirkungen von W88^{3.32} möglich sind. Die zweite hochkonservierte Position ist Y239^{6.51}. So besitzen 16 der 25 Bittergeschmacksrezeptoren an Position 6.51 ein Tyrosin (entsprechend Abb. 50). Nach dem Agonisten-*Docking* in Abschnitt 3.1.7 werden für die Seitenkette dieser Position als Wechselwirkung mit Strychnin und Denatonium Wasserstoffbrückenbindungen vorgeschlagen (siehe Abb. 25B und D). Für die Interaktion mit Parthenolid zeigen das Modell und das Agonisten-*Docking* lediglich, dass sich diese Position in enger Nachbarschaft zum Agonisten befindet (Abb. 25C). Somit wären intermolekulare Wechselwirkungen wie Van-der-Waals- und hydrophobe Wechselwirkungen möglich. Mittels der Mutation der Position Y239^{6.51} zu Phenylalanin und der daraus resultierenden Reduzierung der Aktivierung nach Stimulation mit Strychnin und Denatoniumbenzoat (Abb. 27B+C) konnte gezeigt werden, dass die Wechselwirkungen mit diesen beiden Agonisten über Wasserstoffbrückenbindungen möglich ist. Phenylalanin besitzt, bis auf die OH-Gruppe, die gleiche Größe wie Tyrosin, ist aber nicht in der Lage, Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen. Für Parthenolid zeigte der Austausch zu Phenylalanin ebenfalls eine drastische Reduzierung in der Aktivierung (Abb. 27B). Eine mögliche Erklärung, wieso es zu der reduzierten Aktivierung im Vergleich zum Wildtyprezeptor beim Parthenolid-Stimulus nach dem Aminosäureaustausch gekommen ist, ist, dass Tyrosin über Wasserstoffbrückenbindungen mit Parthenolid interagiert, die durch das Lösungsmittel (wässrige Lösung) vermittelt werden. Mit Phenylalanin sind solche Wechselwirkungen nicht möglich. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten *In-silico*-Untersuchungen zu den Wechselwirkungen zwischen Agonisten und Rezeptoren, wurde der Einfluss vom Lösungsmittel nicht betrachtet. Jedoch kann das Lösungsmittel einen entscheidenden Einfluss z.B. auf die Agonistenstabilisierung und bei der Agonisteninteraktion (Congreve *et al.* 2011) haben. Eine weitere Möglichkeit ist daher, dass im echten hTAS2R10 die TM 3 und 5 dichter beieinander liegen, so dass Tyrosin mit Parthenolid über eine Wasserstoffbrückenbindung interagieren kann. Es ist ebenfalls bekannt, dass Tyrosin-Aminosäuren in Rezeptoren einen wichtigen Beitrag zur Rezeptorstabilität beitragen (Pace *et al.* 2001). Es ist daher möglich, dass der Austausch von Tyrosin zu Phenylalanin an Position 6.51 die Rezeptorstabilität gestört hat. Eine weitere mögliche Erklärung sind CH-O-

Wasserstoffbrücken, die bei Protein-Protein-Wechselwirkungen nachgewiesen werden konnten (Jiang *et al.* 2002). In dieser Studie konnte u.a. gezeigt werden, dass Tyrosin mit Methylgruppen aus z.B. Isoleucinen über Wasserstoffbrückenbindungen interagieren kann. Die Aminosäureposition Y239^{6.51} befindet sich in räumlicher Nähe zur Methylgruppe am Lacton-Ring (3,7 Å, Abb. 25C), so dass dort eine solche CH-O-Wasserstoffbrückenbindungwechselwirkung möglich wäre.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im hTAS2R10 die agonistenselektiven Wechselwirkungen für die untersuchten drei Agonisten über die Aminosäurepositionen S85^{3.29} und Q175^{5.40} vermittelt werden. Die Positionen W88^{3.32} und Y239^{6.51} vermitteln nicht agonistenselektive Wechselwirkungen über Wasserstoffbrückenbindungen und/oder π -Interaktion die notwendig zu sein scheinen, um den Rezeptor zu aktivieren. Diese Resultate sind ebenfalls ein eindeutiger Hinweis darauf, dass der hTAS2R10 nur eine Bindungstasche besitzt. Eine Theorie zur Rezeptoraktivierung wäre für den hTAS2R10, dass agonistenselektive Wechselwirkungen, wie z.B. mit denen von Positionen 3.29 und 5.40, sowie die Wechselwirkung mit konservierten, nicht agonistenselektiven Positionen (3.32 und 6.51) die Aktivierung des Rezeptors vermitteln. Ob diese Theorie allgemeingültig auch für andere Bittergeschmacksrezeptoren ist müsste erst untersucht werden.

Die Messung des hTAS2R10 und der Rezeptormutanten mit monocyclischen Terpenlactonen (Menthofurolacton, Dehydromentholacton und AM91A) sowie dem Lacton Gamma-Valerolacton aus Abschnitt 3.1.4 zeigt, dass als Voraussetzung für eine Aktivierung des Rezeptors ein Mindestmaß an Interaktionen bzw. Interaktionspunkten notwendig ist. So konnte das einfache Gamma-Valerolacton den hTAS2R10 nicht aktivieren, da dieses Molekül vermutlich zu klein ist und so nur mit einzelnen Positionen in der Bindungstasche wechselwirkt. Wie in dem Agonisten-*Docking* Abb. 25A-D zu sehen, zeigen die Agonisten Wechselwirkungen mit Seitenketten der Positionen von mehr als einer Transmembrandomäne. Eine Voraussetzung zur Aktivierung könnte also die „Vernetzung“ von Positionen aus unterschiedlichen Transmembrandomänen über den Agonisten sein. Die größeren monocyclischen Terpenlactone können den Rezeptor aktivieren. Die Fähigkeit den Rezeptor zu aktivieren, nimmt bei diesen Molekülen mit den Möglichkeiten der Wechselwirkungen zu (entsprechend Abb. 19 und Tab. 8). So bietet AM91A im Vergleich zu den anderen monocyclischen Terpenlactonen nur wenige Möglichkeiten für Wechselwirkungen mit Wasserstoffbrücken-Akzeptoren/-Donatoren und aktiviert den Rezeptor nur schwach. Bei Zunahme der Möglichkeiten für Wechselwirkungen, wie bei Menthofurolacton und Dehydromentholacton, nimmt auch die Aktivierung des Rezeptors zu.

Die Sesquiterpenlactone zeigten sehr gut, dass wiederum die Zunahme an Größe durch Seitenketten sich ab einem bestimmten Punkt störend auf die Aktivierung des Rezeptors auswirkt. So aktivieren Epoxy-Parthenolid und Parthenolid-Aldehyd den Rezeptor in einem geringeren Ausmaße als Parthenolid, was sich in dem größeren Schwellenwert und den kleineren Amplituden zeigte (Abb. 18 und Tab. 8). Die Parthenolid-Derivate besitzen zusätzliche Seitenketten, die sich störend auf die Rezeptoraktivierung auswirken. Die Bittergeschmacksstoffe müssen dementsprechend eine Mindestgröße aufweisen bzw. ein Mindestmaß an Interaktionsmöglichkeiten bieten, um den Rezeptor zu aktivieren. Sie dürfen aber auch die Interaktion mit Rezeptor durch z.B. verzweigte Seitenketten nicht stören, was wiederum eine Aktivierung vermindern oder verhindern würde. Diese Erkenntnisse können zur Entwicklung von selektiven Inhibitoren des hTAS2R10 genutzt werden. So wäre es vorstellbar, dass ein Inhibitor mit den agonistenselektiven Positionen interagiert, jedoch nicht mit den konservierten Positionen, wodurch der Rezeptor nicht aktiviert wird. Ein ähnlicher Mechanismus ist höchstwahrscheinlich die Grundlage des selektiven hTAS2R31 und hTAS2R43 Inhibitors GIV3727, der mit den Positionen 7.39 und 7.42 wechselwirkt, anscheinend jedoch nicht über die Position 6.51 (Slack *et al.* 2010). Eine weitere Möglichkeit zur Inhibition wäre die Blockade der konservierten Positionen. Vorstellbar wäre ein Molekül wie Gamma-Valerolacton, das auf Grund der geringen Größe nur mit einer Position wechselwirken kann. Ob Gamma-Valerolacton bereits inhibitorische Eigenschaften besitzt wurde nicht getestet. Eine weitere Möglichkeit wäre die von Hejaz *et al.* 2011 für Paracetamol vorgeschlagene Änderung der Agonistenstruktur durch z.B. Einbringen von Seitenketten in die bitteschmeckende Substanz, die zu einer sterischen Hinderung im Bittergeschmacksrezeptor führen und so die Wechselwirkungen zwischen den Rezeptoren und den Agonisten minimieren. Es wäre außerdem möglich durch das Entfernen von Seitenketten die Wechselwirkungsmöglichkeiten zwischen dem Agonisten und den Bittergeschmacksrezeptoren zu verringern und so den bitteren Geschmack einer potentiell gesunden Substanz herabzusetzen. Bei Strukturänderungen muss jedoch stets darauf geachtet werden, dass die eigentliche Wechselwirkung mit dem Zielrezeptor nicht gestört wird.

Die Untersuchung der Aminosäurepositionen S85^{3.29} und Q175^{5.40} eröffnet eine mögliche Erklärung, wieso dieser Rezeptor von vielen Agonisten, jedoch nur mit einer geringen Sensitivität (im Vergleich zu anderen GPCR), aktiviert werden kann. Aminosäureänderungen an diesen Positionen verschieben die Sensitivität in einen niedrigeren Konzentrationsbereich für z.B. Parthenolid und Strychnin, jedoch stets zu Lasten der Detektion anderer Bitterstoffe. Als Beispiel führte der Austausch von Q175^{5.40} zu Alanin zu einer besseren Sensitivität für

Strychnin, jedoch zu Lasten der Detektion von Denatoniumbenzoat. Er zeigt also eine Art Kompromiss, viele Stoffe zu Lasten der Sensitivität zu detektieren.

4.4 Vergleich der Struktur-Funktions-Beziehungen zu anderen Rezeptoren

Die konservierte Position 6.51 wurde ebenfalls im hTAS2R46 untersucht (Brockhoff *et al.* 2010). Hier wurde ebenfalls das Y241^{6.51} zu Phenylalanin mutiert, was zu einer Reduktion der Aktivierung mit Strychnin führte. Nach Brockhoff *et al.* wird die Interaktion zwischen Strychnin und dem hTAS2R46 über eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Carbonylsauerstoff des Strychnins und Y241^{6.51} vermittelt (entsprechend Abb. 44). Daneben befinden sich das negativ geladene E265^{7.39} im Abstand von 3,0 Å zum positiv geladenen N19 im gedockten Strychnin-hTAS2R46-3D-Modell (Abb. 44), wodurch eine polare Wechselwirkung zustande kommen kann (Brockhoff *et al.* 2010). Außerdem wurde für den hTAS2R46 gezeigt, dass für die Interaktion mit Strychnin Position A268^{7.42} von Bedeutung ist (Brockhoff *et al.* 2010). Der Austausch dieser Positionen im hTAS2R10 (M263^{7.39} und T266^{7.42}) zu den Aminosäuren im hTAS2R46 zeigte, dass die Strychnininteraktion nicht in Richtung des hTAS2R46 verschoben werden konnte (Abb. 38). Wie oben bereits erwähnt, konnte gezeigt werden, dass neben der Position 6.51 (Y239 bzw. Y241), andere Positionen an den Wechselwirkungen mit Strychnin beteiligt (S85^{3.29} und W88^{3.32}) sind. Vergleicht man die Agonisten-Dockings des hTAS2R10 (Abb. 25B) und hTAS2R46 (Abb. 44) für Strychnin zeigt sich, dass in beiden Modellen das Strychnin eine unterschiedliche Orientierung besitzt. So ist der Agonist im hTAS2R10 dichter an TM 3, 5 und 6 orientiert, während das Strychnin im hTAS2R46 dichter zu TM 6 und 7 orientiert ist. Für die Position M263^{7.39} im hTAS2R10 sagt das Agonisten-Docking für alle Agonisten nicht spezifische intermolekulare Wechselwirkungen voraus (Abb. 25). Der Funktionsverlust aller für diese Position durchgeführten Mutationen (Abschnitt 3.2.2 und 3.3.1) lässt sich vermutlich durch die Störung dieser Interaktionen erklären. Die Position T266^{7.42} zeigte nach der Mutation zu Alanin eine Reduktion in der Rezeptorreaktion nach Stimulation mit allen drei Agonisten (Abb. 38). Nach dem Agonisten-Docking ist diese Position zu weit entfernt für jeglichen Agonistenkontakt (Abb. 25). Eine Erklärung wäre, dass die Funktion der Position 7.42 im hTAS2R10 eher eine Beteiligung an der Rezeptoraktivierung oder Konformation besitzt. Es wurde überprüft, ob Position 3.29 im hTAS2R46 einen Beitrag zur Interaktion mit Strychnin

leistet. Es zeigt sich, dass der Aminosäureaustausch von Tyrosin zu Alanin in Position 3.29 zu einer reduzierten Aktivierung führte; sowohl nach Stimulation mit Strychnin, als auch mit Parthenolid und Denatoniumbenzoat. Beim Strychninstimulus zeigte das hTAS2R46-Y85^{3.29}A-Konstrukt, im Gegensatz zum hTAS2R10-S85^{3.29}A-Konstrukt, lediglich eine reduzierte Amplitude (Abb. 40 und Tab. 17). Der EC₅₀-Wert für den Wildtyp-hTAS2R46 (0,67 +/- 0,18 µM) und das hTAS2R46-Y85^{3.29}A-Konstrukt (0,55 +/- 0,61 µM), sowie der Schwellenwert mit 0,03 µM, waren für den Wildtyprezeptor und die Rezeptormutante gleich. Das spricht für eine Störung in der Aktivierung des Rezeptors nach Aminosäureaustausch. Der EC₅₀-Wert für den hTAS2R46 beträgt in der Literatur 0,43 +/- 0,02 µM (Brockhoff *et al.* 2010) und stimmt mit dem in dieser Arbeit gemessenen überein. Der Schwellenwert des hTAS2R46 ist in der Literatur 0,1 µM (Brockhoff *et al.* 2007). Er ist damit leicht höher als der in dieser Arbeit bestimmte Wert. Kleinere Unterschiede liegen dabei im Bereich natürlicher Schwankungen durch die Verwendung eines auf Zellen basierenden Messsystems. Schaut man in das 3D-Homologiemodell des hTAS2R46 (Abb. 44), so ist die Position 3.29 mit einem Abstand von 6 Å zum gedockten Strychnin zu weit entfernt für Interaktionen. Es lässt sich vermuten, dass diese Position im hTAS2R46 nicht an der Interaktion mit Strychnin beteiligt ist. Für die Wechselwirkung des hTAS2R46 mit Parthenolid und Denatonium gibt es in der Literatur keine Vorschläge über beteiligte Positionen. Die Messung des hTAS2R46Y85^{3.29}A-Konstruktes zeigte, im Gegensatz zum hTAS2R10-S85^{3.29}A-Konstrukt, eine starke Reduzierung der Aktivierung für beide Agonisten. Eine mögliche Wechselwirkung zwischen Y85^{3.29} und diesen beiden Agonisten wäre über Wasserstoffbrückenbindungen und/oder π -Interaktionen. Wahrscheinlicher ist aber, dass diese Position generell an der Rezeptorstabilität (Pace *et al.* 2001) und Rezeptoraktivierung beteiligt ist. Die Position T177^{5.40} im hTAS2R46, die der Position Q175^{5.40} im hTAS2R10 entspricht, zeigt im 3D-Modell des hTAS2R46 in Richtung Zellmembran und wäre demnach nicht an Interaktionen beteiligt (Abb. 44). Die Grundlage beider Modelle sind unterschiedliche Rezeptorvorlagen, wodurch es zu Unterschieden in der Orientierung einzelner Aminosäurepositionen kommen kann. Die Funktion der Position 5.40 im hTAS2R46 wurde nicht näher untersucht. Der Vergleich zwischen hTAS2R10 und hTAS2R46 hat gezeigt, dass die Funktion potentiell wichtiger Positionen in hTASR10 und hTAS2R46 unterschiedlich sind und dass in beiden Rezeptoren die Wechselwirkung mit denselben Agonisten auf unterschiedliche Art und Weise von statten geht. Beide Rezeptoren besitzen dementsprechend unterschiedliche Bindungsmodi. Demnach lässt sich sagen, dass der hTAS2R10 keine weniger sensitive Version eines „Strychninrezeptors“ hTAS2R46 ist, sondern ein Rezeptor,

der wie der hTAS2R46 von Strychnin aktiviert wird, sich jedoch höchstwahrscheinlich unabhängig entwickelt hat.

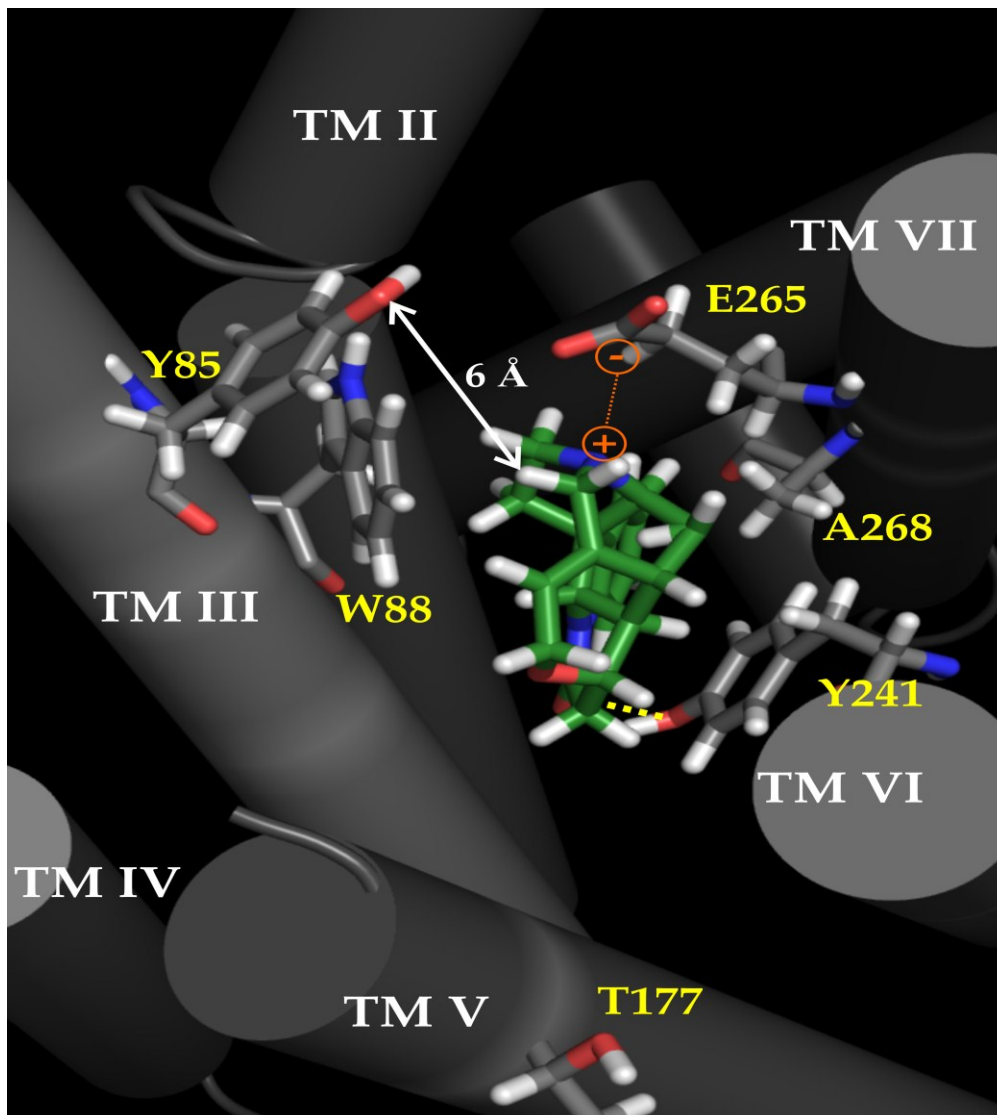


Abb. 44: Interaktion des hTAS2R46 mit Strychnin

Der hTAS2R46 mit den Transmembrandomänen (TM) als graue Zylinder und mit römischen Zahlen nummeriert. Das gedockte Strychnin ist mit Kohlenstoffatomen in grün, Sauerstoffatomen in rot, Stickstoffatomen in blau und Wasserstoffatomen in weiß dargestellt. Die Interaktion über Wasserstoffbrückenbindung ist als gelb gestrichelte Linie dargestellt. Eine mögliche polare Wechselwirkung wird über eine orangefarbene gestrichelte Linie zwischen zwei Ladungen (+ und -) dargestellt. Die für die Agonisteninteraktion als wichtig identifizierten Positionen Y241^{6,51} und E265^{7,39} (Brockhoff *et al.* 2010), sowie die konservierte Aminosäure W88^{3,32} und die Positionen, die im hTAS2R10 als wichtig für die Interaktion identifiziert wurden (Y85^{3,29} und T177^{5,40}), sind wie folgt dargestellt: C-Atome: grau, H-Atome: weiß, O-Atome: rot, N-Atome: blau. (PDB-Datei des hTAS2R46-Docking-Modells zur Verfügung gestellt von M.Behrens (Dife)).

Dass es Bittergeschmacksrezeptoren gibt, die durch teilweise gleiche Agonisten, jedoch über unterschiedliche Bindungsmodi aktiviert werden, liegt wahrscheinlich in der Tatsache begründet, dass Bitterstoffe sowohl als Agonisten, als auch als Antagonisten agieren können. (Brockhoff *et al.* 2011). So würde die Mischung von Bitterstoffen mit agonistischen und antagonistischen Eigenschaften in der Nahrung eine effiziente Detektion von bitter schmeckenden Giften verhindern (Brockhoff *et al.* 2011). Evolutionär ist es daher sinnvoll, dass Bitterstoffe von mehreren Rezeptoren über unterschiedliche Bindungsmodi detektiert werden. So konnte von Brockhoff *et al.* 2011 gezeigt werden, dass Substanzen wie z. B. das Sesquiterpenlacton 3 β -Hydroxydihydrocostunolid die Detektion von Strychnin durch den hTAS2R46 inhibiert. Der Rezeptor hTAS2R10 wird durch diese Substanz nicht negativ beeinflusst. Somit ist gewährleistet, dass auch bei Inhibition eines Rezeptors potentiell giftige Bitterstoffe detektiert werden können (Brockhoff *et al.* 2011). Dieser Befund ist außerdem eine weitere Bestätigung dafür, dass die Interaktion zwischen dem hTAS2R46 und Strychnin, sowie dem hTAS2R10 und Strychnin, nicht über die selben Aminosäurepositionen erfolgen kann.

Ein weiterer Rezeptor, dessen Bindungsmodus mit dem des hTAS2R10 verglichen wurde, ist der zum hTAS2R10 homologe murine Bittergeschmacksrezeptor mTas2r105 (entsprechend Abschnitt 3.2). Dieser unterscheidet sich vom hTAS2R10 darin, dass dieser nicht durch Strychnin aktiviert werden kann (Chandrashekar *et al.* 2000; Bufe *et al.* 2002). Die Positionen des mTas2r105, die nach dem Homologiemodell des mTas2r105 (Abb. 32) auffällig unterschiedlich zu den Positionen des hTAS2R10 sind, wurden zu den Aminosäuren des jeweilig anderen Rezeptors verändert. Durch diesen Austausch sollte versucht werden eine Strychninaktivierung im mTas2r105 zu etablieren. Im Gegenzug wurde getestet, ob im hTAS2R10 die Reaktion auf Cycloheximid der Agonist, der zuerst für den mTas2r105 identifiziert wurde (Chandrashekar *et al.* 2000), in Richtung des mTas2r105 verschoben werden kann. Durch den durchgeführten Aminosäureaustausch konnte weder eine Aktivierung auf einen Strychninstimulus im mTas2r105 erzielt, noch die Reaktion des hTAS2R10 auf Cycloheximid verbessert werden (Abb. 33). Auch der zuvor durchgeführte Austausch ganzer Transmembrandomänen (Chimärenkonstruktion, Abb. 30) konnte die Pharmakologie des einen Rezeptors nicht mit der des anderen Rezeptors kombinieren (Abb. 31). Es zeigte sich aber, dass die untersuchten Positionen zum Teil eine unterschiedliche Bedeutung bei der Wechselwirkung mit den untersuchten Agonisten haben. So führte der Austausch der ungeladenen polaren Aminosäure Glutamin zur basisch geladenen Aminosäure Histidin in Position 3.37 im hTAS2R10 zu einer deutlichen Verschlechterung der Aktivierung

mit Denatoniumbenzoat. Der umgekehrte Austausch im mTas2r105 zeigt hingegen keinen Einfluss auf die Aktivierung mit Denatoniumbenzoat (Abb. 33). Dementsprechend war die Vermutung, dass sich die Bindungsmodi zwischen hTAS2R10 und mTas2r105 für Denatoniumbenzoat unterscheiden. Aus diesem Grund wurde an zwei Positionen im mTas2r105 der gleiche Aminosäureaustausch wie im hTAS2R10 durchgeführt. Dafür wurde die Position 3.29 mit einer nachweislich agonistenselektiven Funktion im hTAS2R10 (S85^{3.29}) und Position 5.43, die sich in der Nähe zum Agonisten im hTAS2R10 (L178^{5.43}) befindet, ausgewählt. Der Aminosäureaustausch von S86^{3.29} zu Alanin und Threonin im mTas2r105 zeigte, dass die Position 3.29 im mTas2r105 sich nicht in der Nähe der Agonisten Parthenolid und Denatoniumbenzoat befindet, da kein Unterschied in der Reaktion auf diese beiden Agonisten gemessen werden konnte (Abb. 37). Für die Messung mit Cycloheximid konnte eine leichte Verschlechterung mit den Alanin- und Threoninkonstrukten gemessen werden. Der Beitrag der Position 3.29 zur Wechselwirkung mit diesem Agonisten kann daher nur gering sein. Für den Aminosäureaustausch der Position L180^{5.43} zu Alanin zeigte sich, dass hier eine agonistenselektive Interaktion mit Parthenolid besteht. Die Rezeptormutante zeigte keine Reaktion auf den Parthenolidstimulus. Für den Denatoniumbenzoatstimulus konnte eine leichte Verbesserung in der Aktivierung und für den Cycloheximidstimulus konnte kein Unterschied zum Wildtyprezeptor beobachtet werden. Demnach ist die Position 5.43 im mTas2r105 sehr wichtig für die Interaktion mit Parthenolid. Dies zeigt, dass diese beiden relativ homologen Rezeptoren unterschiedliche Bindungsmodi für die untersuchten Agonisten besitzen. Die unterschiedlichen Bindungsmodi würden auch erklären, wieso keine Strychninreaktion im mTas2r105 etabliert werden konnte. Für die Messung mit Cycloheximid wird in der Literatur (Chandrashekar *et al.* 2000) ein EC₅₀-Wert von 0,5 µM mit einem Schwellenwert von ~0,2 *in vitro* angegeben. In dieser Arbeit konnte für die Aktivierung des mTas2r105 ein EC₅₀-Wert von ~0,06 µM mit einem Schwellenwert von 0,003 µM gemessen werden. Die höhere Sensitivität der Messung in dieser Arbeit resultiert vermutlich aus Unterschieden in der Meßmethode. Chandrashekar benutzte ein anderes G-Protein (G_{α15}), als das in dieser Arbeit verwendete (G-Protein-Chimäre G_{α16Gust44}). So ist bekannt, dass das verwendete G-Protein einen Einfluss auf das Agonistenspektrum und die Pharmakologie eines Rezeptors haben kann (Kostenis *et al.* 2005; Shirokova *et al.* 2005). Zudem unterscheiden sich die Zellen. Chandrashekar hat HEK 293-Zellen benutzt. Diese wurden mit dem G-Protein und den Bittergeschmacksrezeptoren transient transfiziert. In dieser Arbeit wurden HEK293T-Zellen verwendet, die das G-Protein stabil exprimierten. Nur die Bittergeschmacksrezeptoren wurden transient transfiziert. Ein weiterer Unterschied ist das N-

terminale Epitop zur Expressionsverbesserung des Rezeptors. So benutzte Chandrashekar ein Rhodopsinepitop, während in dieser Arbeit ein Epitop des Somatostatinrezeptors Subtyp 3 der Ratte verwendet wurde. Für die Interaktion zwischen dem mTas2r105 und Cycloheximid konnte mittels der Rezeptorchimären aus Abschnitt 3.2.1 gezeigt werden, dass die Transmembrandomäne 5 wichtig für die Wechselwirkung ist, da der Austausch dieser Transmembrandomäne zu einer stark eingeschränkten Reaktion auf Cycloheximid führte (Abb. 31). Daneben konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Positionen Y177^{5.40} und F265^{7.39} für die Wechselwirkung mit Cycloheximid besonders wichtig sind (Abb. 33). Tyrosin in Position 5.40 und Phenylalanin in 7.39 können über π -Interaktionen mit Cycloheximid interagieren. Daneben hat Tyrosin die Fähigkeit Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen. Die Möglichkeiten zur Interaktion zwischen diesen Positionen und dem Cycloheximidmolekül sind in Abb. 45 abgebildet.

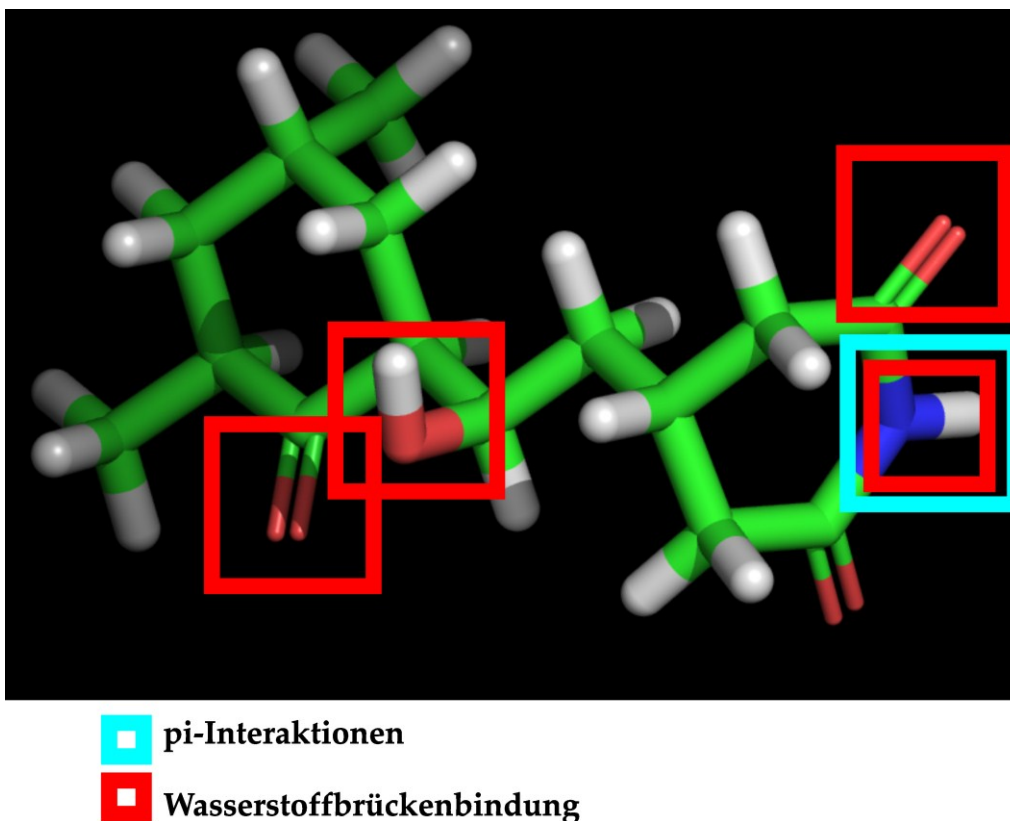


Abb. 45: Interaktionsmöglichkeiten von Cycloheximid

Abgebildet ist das 3D-Modell von Cycloheximid mit den möglichen Interaktionsmöglichkeiten für Phenylalanin in Position 7.39 (π -Interaktionen) und Tyrosin in Position 5.40 (Wasserstoffbrückenbindungen und π -Interaktionen) des mTas2r105.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Position 7.39 in beiden Rezeptoren einen Einfluss auf die Rezeptoraktivierung hat. Eine Position deren Bedeutung in beiden

Rezeptoren an der Agonisteninteraktion gezeigt werden konnte, ist 5.40. Jedoch unterscheiden sich die Agonisten, die mit dieser Position interagieren. Der hTAS2R10 und der mTas2r105 gelten zwar als orthologe Rezeptoren (Shi *et al.* 2003), jedoch zeigen die Untersuchungen, dass in beiden Rezeptoren unterschiedliche Bindungsmodi für die untersuchten Agonisten vorhanden sind. Es lässt sich somit auch vermuten, dass die Rezeptoren einen gemeinsamen Ursprung hatten, sich jedoch die evolutionäre Entwicklung der beiden Rezeptoren in Hinblick auf Agonisteninteraktion getrennt voneinander vollzogen haben muss. Die beiden Rezeptoren besitzen jedoch überlappende Schlüsselpositionen. Um diese Thesen weiter ausführen zu können, wären jedoch weitere funktionelle Analysen nötig. Im hTAS2R1 konnte gezeigt werden, dass die Wechselwirkungen mit den Peptidagonisten und Dextromethorphan über die Positionen N66^{2.51}, N89^{3.36} und E90^{3.37} in den Transmembrandomänen und den Positionen E74 und N163 in den extrazellulären Schleifen vermittelt wird. Der Einfluss von Position 3.36 auf die Agonisteninteraktion und Rezeptoraktivierung wurde bereits für unterschiedliche Bittergeschmacksrezeptoren diskutiert (Pronin *et al.* 2004; Brockhoff *et al.* 2010). Der Aminosäureaustausch dieser Position (N92^{3.36}) im hTAS2R10 zu Alanin zeigte einen Funktionsverlust für alle drei Agonisten (Abb. 16). Das spricht dafür, dass die Position N92^{3.36} im hTAS2R10 auch an Agonisteninteraktionen und/oder der Rezeptoraktivierung beteiligt sein kann. Nach dem Agonisten-*Docking* wurde für diese Position und Parthenolid eine Wasserstoffbrückenbindung vorhergesagt (Abb. 25). Im hTAS2R38 konnte gezeigt werden, dass die Position 3.36 (N103) an der Agonisteninteraktion mit PTC beteiligt ist (Biarnes *et al.* 2010). Die im hTAS2R1 identifizierte Position 3.37 wurde ebenfalls im hTAS2R10 untersucht. So zeigte der Aminosäureaustausch zu Alanin einen Funktionsverlust für die Messungen mit den drei Agonisten (Abb. 16) und eine Reduzierung der Aktivierung beim Austausch zu Histidin (Abb. 33). Nach dem Agonisten-*Docking* befindet sich Q93^{3.37} in räumlicher Nähe zu den Agonisten, sodass eine Interaktion möglich wäre. Demnach kann diese Position auch an Agonisteninteraktionen beteiligt sein. Die Wechselwirkung zwischen dem hTAS2R16 und Salicin wird nach Sakurai *et al.* 2010a/b über die Positionen E86^{3.33}, W94^{3.41} und H181^{5.41} vermittelt. Für die Position 3.33 (V89) im hTAS2R10 konnte gezeigt werden, dass diese Position an Agonisteninteraktionen beteiligt ist. Der Aminosäureaustausch zu Alanin führte zu einer nicht agonistenselektiven Reduzierung der Aktivität für alle drei untersuchten Agonisten (Abb. 16). Nach dem Agonisten-*Docking* ist diese Position in der Nähe der Agonisten und kann über nichtselektive intermolekulare Wechselwirkungen interagieren (Abb. 25). Für die Interaktion zwischen V89^{3.33} und Parthenolid wird eine

Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Rückgrat der 3. Transmembrandomäne und dem Agonisten vorgeschlagen, was einer nicht agonistenselektiven Wechselwirkung entspricht.

In Abb. 46 sind die für die Agonisteninteraktion von Bedeutung beschriebenen Positionen der bisher untersuchten Bittergeschmacksrezeptoren (Biarnes *et al.* 2010; Brockhoff *et al.* 2010; Sakurai *et al.* 2010a; Sakurai *et al.* 2010b; Dai *et al.* 2011; Singh *et al.* 2011) als Übersicht zusammengefasst. Die für Interaktionen mit den untersuchten Agonisten ermittelten Aminosäurepositionen des hTAS2R10 und mTas2r105 sind dort ebenfalls enthalten. Es zeigt sich, dass sich die meisten – der für Interaktionen wichtigen Positionen – auf die TM 3 und 5, auf die obere Hälfte der Transmembrandomänen verteilen. Die Wechselwirkung mit Agonisten scheint sich in den Bittergeschmacksrezeptoren unter Beteiligung überlappender Positionen zu ereignen. Der Beitrag der Positionen an der Interaktion scheint aber zwischen den Rezeptoren zu variieren.

Die Agonistenbindung des β 2-adrenergen Rezeptors mit Katecholaminen wird überwiegend über die Positionen D113^{3.32}, S203^{5.42}, S207^{5.46}, W286^{6.48}, N293^{6.55} und N312^{7.39} (Katritch *et al.* 2009; Reynolds *et al.* 2009; Katritch *et al.* 2011) vermittelt. Die Position 3.32 ist sowohl im β 2-adrenergen Rezeptor von Bedeutung, als auch in den hTAS2R. In den humanen Bittergeschmacksrezeptoren ist diese Position hochkonserviert (entsprechend Abb. 50). Die Position 6.48 ist im hTAS2R10 (F236) an der Ausformung der Bindungstasche beteiligt (entsprechend Abschnitt 3.1.3). Die Mutation dieser Aminosäureposition zu Alanin zeigte für die Stimulation mit allen drei Agonisten einen Funktionsverlust. Es lässt sich vermuten, dass diese Position bei der Rezeptoraktivierung und/oder Rezeptorstabilität von Bedeutung ist. Dass die Position 7.39 in humanen Bittergeschmacksrezeptoren von Bedeutung ist, konnte im hTAS2R46 (Brockhoff *et al.* 2010) gezeigt werden. Für die Funktion der Position 7.39 im hTAS2R10 lassen sich eher unspezifische intermolekulare Wechselwirkungen vermuten (s.o.). Der Zweite, als Prototyp eines GPCR geltende Rezeptor Rhodopsin, interagiert über die Position K296^{7.43} mit dem Liganden unter Beteiligung einer kovalenten Bindung in Form einer protonierten Schiff'schen Base mit und wird stabilisiert von E113^{3.28}. Die Positionen E122^{3.37}, W126^{3.41} und H211^{5.46} formen ein TM3-TM5-Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk, welches den Agonisten umgibt (Hofmann *et al.* 2009). Im Falle des Rhodopsins ist der Ligand 11-*cis*-Retinal ein sehr starker inverser Agonist, der den Rezeptor in der inaktiven Form hält (Stenkamp *et al.* 2002; Li *et al.* 2004; Okada *et al.* 2004). Die Absorption eines Photons führt zur *cis* \rightarrow *trans* Isomerisierung. Daraus entsteht *in situ* all-*trans*-Retinal, wodurch der Rezeptor aktiviert wird (Hofmann *et al.* 2009).

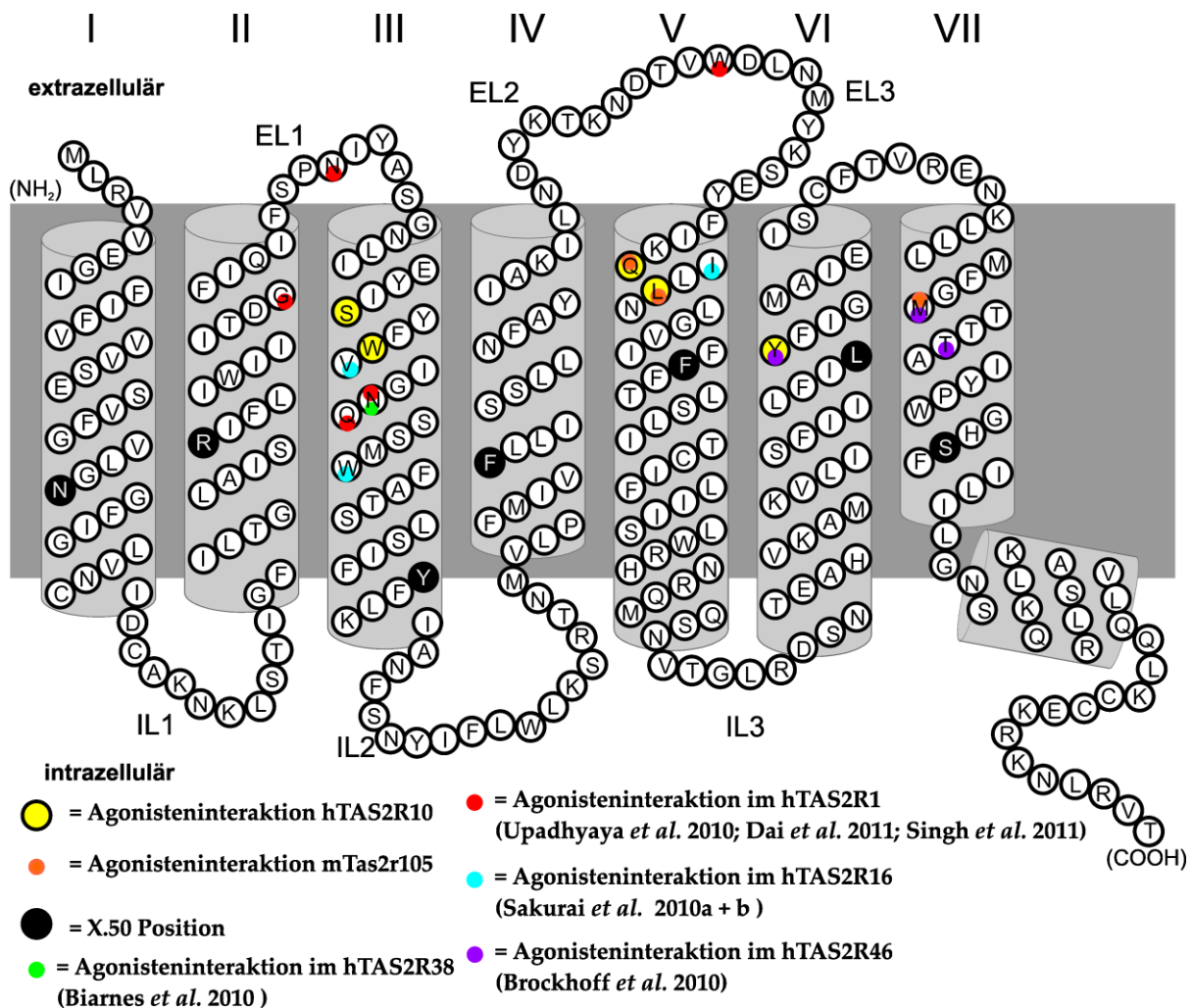


Abb. 46: 2D Schlangenmodell des hTAS2R10

In diesem zweidimensionalen Schlangenmodell des hTAS2R10 sind alle in diesem Rezeptor für die Agonisteninteraktion als wichtig identifizierten Positionen (gelb), sowie die für die Agonisteninteraktion von Bedeutung beschriebenen Positionen der Bittergeschmacksrezeptoren hTAS2R1 (rot), hTAS2R16 (cyan), hTAS2R38 (grün) und hTAS2R46 (violett) markiert. Die in dieser Arbeit als für Interaktionen wichtig bestimmten Positionen im mTas2r105 sind orange markiert. Die Transmembrandomänen wurden mit römischen Zahlen (I-VII) nummeriert. Die intrazellulären (IL)- und extrazellulären Schleifen (EL) sind mit arabischen Zahlen nummeriert.

Für die Position 3.37 konnte in den Bittergeschmacksrezeptoren hTAS2R1 (Upadhyaya *et al.* 2010) und hTAS2R10 gezeigt werden, dass diese Position mit dem Agonisten wechselwirkt. Insgesamt betrachtet besitzen Bittergeschmacksrezeptoren in der Interaktion mit Agonisten in einzelnen Positionen Übereinstimmungen mit dem β 2-adrenergen Rezeptor (3.32, 6.48 und 7.39, s.o.) und Rhodopsin (3.37). Die Übereinstimmung mit dem β 2-adrenergen Rezeptor scheint demnach höher zu sein. Der Grund dafür kann darin liegen, dass Rhodopsin ein hochselektiver Rezeptor mit einer engen Bindungstasche ist, dessen natürlicher Ligand das Retinal ist (Hofmann *et al.* 2009).

Der auf Wechselwirkungen mit Bittergeschmacksrezeptoren untersuchte Agonist Strychnin aktiviert selbst den auf Strychnin sensitivsten Rezeptor hTAS2R46 mit einem EC₅₀-Wert von

~0,7 μM . Strychnin bindet hingegen hochsensitiv an den inhibitorischen Glycinrezeptor (GlyR), einen *Cys-Loop*-Rezeptor (Brams *et al.* 2011). *Cys-Loop*-Rezeptoren sind pentamere ligandengesteuerte Ionenkanäle. Der Glycinrezeptor vermittelt schnelle inhibitorische Neurotransmission im zentralen Nervensystem (Lynch 2009). Strychnin bindet an den Glycinrezeptor mit einer inhibitorischen Dissoziationskonstante von ~16 nM und einer mittleren inhibitorischen Konzentration von ~50 nM (Brams *et al.* 2011). Die Ligandenbindungsdomäne besteht aus einem 10-Strang-beta-Faltblatt-Sandwich, welches aus einem inneren Strang, der aus sechs und einem äußeren Strang, der aus vier β -Faltblättern besteht (Brejc *et al.* 2001). Die Bindungstasche ist an den extrazellulären Berührungsfleichen der Glycinrezeptoruntereinheiten lokalisiert. Die Ausformung erfolgt auf der „+“-Seite von drei Schleifen (A, B, und C) und auf der „-“-Seite von β -Faltblättern, die als Bindungsschleifen D, E und F bezeichnet werden (Miyazawa *et al.* 2003; Bocquet *et al.* 2009; Hilf *et al.* 2009). An der Interaktion mit Strychnin sind dabei besonders die Positionen F63 (D-Schleife) und R131 (E-Schleife) beteiligt (Brams *et al.* 2011). In Bittergeschmacksrezeptoren ist die Bedeutung der extrazellulären Schleifen (EL) an der Wechselwirkung mit den Agonisten nur wenig untersucht (Biarnes *et al.* 2010; Brockhoff *et al.* 2010; Sakurai *et al.* 2010a; Sakurai *et al.* 2010b). Pronin *et al.* 2004 hat über eine Bedeutung der Schleifen an der Agonisteninteraktion spekuliert, die bisher nicht zweifelsfrei bewiesen wurde. Von Brockhoff *et al.* 2010 wird über eine Art Zugangskontrolle spekuliert, die über die Position E70^{2.65} und unbekanntenen Positionen in der EL1 vermittelt wird. Bei dieser Position handelt es sich jedoch nicht um eine konservierte Position. Ob es diese Zugangskontrolle generell in den hTAS2R gibt, muss erst noch bewiesen werden.

4.5 Abschließende Betrachtung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der hTAS2R10 eine Bindungstasche besitzt, die in der oberen Hälfte des zum extrazellulären Raum gerichteten Bereichs des Rezeptors lokalisiert ist. Die an der Agonisteninteraktion beteiligten Transmembrandomänen sind TM 3, 5, 6 und 7. Diese Resultate stimmen mit den Beobachtungen bei den Untersuchungen anderer Bittergeschmacksrezeptoren überein (Biarnes *et al.* 2010; Brockhoff *et al.* 2010; Sakurai *et al.* 2010a; Sakurai *et al.* 2010b; Upadhyaya *et al.* 2010; Dai *et al.* 2011; Singh *et al.* 2011). Diese Lokalisation der Bindungstasche lässt sich ebenfalls beim β 2-adrenergen Rezeptor

(Rasmussen *et al.* 2011) und beim bovinen Rhodopsin (Salom *et al.* 2006) beobachten. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass wichtige agonistenselektive Interaktionen des hTAS2R10 über die Seitenketten der Aminosäurepositionen S85^{3.29} und Q175^{5.40} vermittelt werden. Basierend auf den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen konnte eine erste Theorie zur Aktivierung des hTAS2R10 abgeleitet werden. Nach dieser Theorie sind agonistenselektive Wechselwirkungen mit den Seitenketten der Aminosäuren in den Positionen 3.29 und 5.40, in Kombination mit den nicht agonistenselektiven Wechselwirkungen über die Seitenketten der Aminosäurepositionen W88^{3.32} und Y239^{6.51}, Voraussetzung für die Aktivierung des hTAS2R10. Sind die Interaktionen mit dem Rezeptor auf Grund der Größe des Agonisten nicht ausreichend, wie im Falle des Gamma-Valerolacton oder durch sterische Hinderung auf Grund zusätzlicher störender Seitenketten am Agonisten, wie beim Epoxy-Parthenolid beeinträchtigt, kann der Rezeptor nur unzureichend oder gar nicht aktiviert werden. Durch künstliches Einbringen solcher strukturellen Veränderungen könnte es möglich sein, einen ursprünglichen Rezeptoragonisten in einen partiellen Agonisten oder neutralen Agonisten umzuwandeln. Ob diese Theorie zur Aktivierung vollständig zutreffend ist und auch auf andere Bittergeschmacksrezeptoren übertragen werden kann müssen weitere Studien zeigen. Die Untersuchungen der Positionen 3.29 und 5.40 haben gezeigt, dass das weitgefächerte Agonistenspektrum des hTAS2R10 zu Lasten der Sensitivität für einzelne Bitterstoffe gehen kann. Es konnte gezeigt werden, dass der Bittergeschmacksrezeptor hTAS2R46 mit einem teilweise überlappenden Agonistenspektrum zum hTAS2R10 einen anderen Bindungsmodus für die untersuchten Agonisten besitzt. Die Strychnininteraktion im hTAS2R10 wird nicht über die Positionen des hTAS2R46 (7.39 und 7.42, (Brockhoff *et al.* 2010)) vermittelt. Diese Positionen haben jedoch einen Einfluss auf die Rezeptoraktivierung. Die biologische Grundlage, dass zwei Rezeptoren von einem Agonisten aktiviert werden, jedoch über die Interaktion mit unterschiedlichen Aminosäurepositionen, liegt wahrscheinlich in einer Art von biologischem „Sicherheitssystem“. So konnte gezeigt werden, dass Nahrung natürliche Bittergeschmacksrezeptorinhibitoren enthalten kann (Brockhoff *et al.* 2011). Ein redundantes System zur Detektion von potentiell gefährlichen Bitterstoffen kann den Ausfall einzelner Rezeptoren durch Inhibition kompensieren. Die Entwicklung dieser beiden Rezeptoren muss sich frühzeitig getrennt voneinander vollzogen haben. Die Untersuchungen in dieser Arbeit ergaben, dass der zum hTAS2R10 sehr homologe Rezeptor mTas2r105 ebenfalls einen anderen Bindungsmodus besitzt, der sich von dem des hTAS2R10 unterscheidet. So konnte experimentell mittels Aminosäureaustausch und Chimärenkonstruktion keine Strychninwechselwirkung im mTas2r105 etabliert werden. Es

konnte gezeigt werden, dass die Position 3.29 im mTas2r105 so gut wie keinen Einfluss auf die Agonisteninteraktion besitzt, im Gegensatz zum hTAS2R10. In beiden Rezeptoren interagieren die Seitenketten der Aminosäuren in Position 5.40 über agonistenselektive Wechselwirkungen mit unterschiedlichen Agonisten. In beiden Rezeptoren hat die Position 7.39 einen Einfluss auf die Rezeptoraktivierung. Im murinen Bittergeschmacksrezeptor interagiert die Aminosäure in dieser Position zusätzlich mit den Agonisten. Es zeigt sich, dass es im hTAS2R10 und mTas2r105 überlappende Schlüsselpositionen gibt, obwohl sich die beiden Rezeptoren getrennt voneinander entwickelt haben. Es konnte gezeigt werden, dass der hTAS2R10 und die anderen bisher untersuchten Bittergeschmacksrezeptoren überlappende Positionen besitzen, die einen Einfluss auf die Rezeptoraktivität haben. Zu diesen Positionen gehören z.B. 3.32, 3.37 oder 7.39. Einzelne dieser Positionen konnten auch bei der Agonisteninteraktion des Rhodopsins und des β 2-adrenergen Rezeptors identifiziert werden. Dies spricht dafür, dass bestimmte Strukturmerkmale und Positionen in den GPCR konserviert sind, auch wenn die Rezeptoren nur eine geringe Sequenzübereinstimmung zeigen. Anhand dieser Erkenntnisse können die Wechselwirkungen zwischen Bitterstoffen und den Bittergeschmacksrezeptoren besser verstanden werden. Diese Resultate können genutzt werden, um Inhibitoren zu entwickeln, die ein wichtiges Werkzeug in der Rezeptoranalytik wären. Solche Inhibitoren könnten ebenfalls dazu genutzt werden, den bitteren Geschmack von Medikamenten zu inhibieren. Daneben wäre auch ein Einsatz entsprechender Inhibitoren in der Lebensmittelindustrie denkbar. So zeigen künstliche Süßstoffe, die zur Senkung der Nährstoffdichte von Lebensmittel eingesetzt werden, oder gesundheitsfördernde sekundäre Pflanzenstoffe häufig einen bitteren Beigeschmack. Zum Beispiel Sulfonylamid-Süßstoffe wie Acesulfam K, zeigen eine Aktivierung der humanen Bittergeschmacksrezeptoren hTAS2R43 und -31(ehemals 44) (Kuhn *et al.* 2004; Pronin *et al.* 2007). Durch den Einsatz von Inhibitoren des Bittergeschmacks können diese Substanzen stärker in die Nahrung einfließen und damit könnte ein Beitrag zur Gesundheit der Menschen geleistet werden.

Für ein vollständiges Verständnis der Bittergeschmacksrezeptoren sollten jedoch noch weitere Studien zur Aktivierung der Rezeptoren erfolgen. Fragestellungen zur G-Protein-Kopplung und zur Verschiebung von TM 5 und 6 bei der Aktivierung, ähnlich wie beim β 2-adrenergen Rezeptor (Rasmussen *et al.* 2011), sind dabei von Interesse. Zudem sollte untersucht werden, ob die von Brockhoff *et al.* 2010 vorgeschlagene mögliche Zugangskontrolle für Agonisten im hTAS2R10 und den anderen Bittergeschmacksrezeptoren vorhanden ist.

5. Zusammenfassung

Die Bittergeschmacksrezeptoren stellen in der Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren eine besondere Gruppe dar. Im Menschen können die 25 Rezeptoren eine große Anzahl unterschiedlichster Bittergeschmacksstoffe detektieren. Diese Substanzen können sowohl schädlich, wie etwa Strychnin, als auch der Gesundheit förderliche Arzneistoffe, wie etwa Chloramphenicol sein. Unter den Bittergeschmacksrezeptoren des Menschen gibt es eine Gruppe von drei Rezeptoren, die besonders viele Bitterstoffe detektieren können. Einer von ihnen ist der Rezeptor hTAS2R10.

In dieser Arbeit konnte sowohl experimentell als auch durch computergestützte Modellierung gezeigt werden, dass der hTAS2R10 nur eine Bindungstasche besitzt. Das stimmt mit den bisher ausführlich experimentell und *in silico* untersuchten Rezeptoren hTAS2R1, -R16, -R38 und -R46 überein. Die für die Agonisteninteraktionen nachweislich wichtigen Transmembrandomänen sind in den bisher untersuchten Bittergeschmacksrezeptoren, wie auch im hTAS2R10, die Transmembrandomänen 3, 5, 6 und 7. Die Untersuchungen zeigten, dass die Bindungstasche des hTAS2R10 in der oberen Hälfte des zum extrazellulären Raum gerichteten Bereichs lokalisiert ist. Insbesondere konnte für die untersuchten Agonisten Strychnin, Parthenolid und Denatoniumbenzoat gezeigt werden, dass die Seitenketten der Aminosäuren in Position 3.29 und 5.40 ausgeprägte agonistenselektive Wechselwirkungen eingehen. Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass das weitgefächerte Agonistenspektrum des hTAS2R10 zu Lasten der Sensitivität für einzelne Bitterstoffe geht. Der Vergleich wichtiger Positionen im hTAS2R10, hTAS2R46 und mTas2r105 hat deutlich gemacht, dass sich die Bindungsmodi zwischen diesen Rezeptoren unterscheiden. Dies deutet auf eine getrennte evolutionäre Entwicklung der Bindungseigenschaften dieser Rezeptoren hin. Gleichfalls zeigten die Untersuchungen, dass einige Positionen wie z.B. 7.39 die Funktion aller untersuchten Bittergeschmacksrezeptoren prägen, sich jedoch die genaue Bedeutung im jeweiligen Rezeptor unterscheiden kann. Einzelne dieser Positionen konnten auch bei der Agonisteninteraktion des Rhodopsins und des β 2-adrenergen Rezeptors beobachtet werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit helfen dabei die Wechselwirkungen zwischen Bitterstoffen und den Bittergeschmacksrezeptoren zu verstehen und geben erste Einblicke in die Entwicklung der Rezeptoren in Hinblick auf ihren Funktionsmechanismus. Diese Erkenntnisse können genutzt werden, um Inhibitoren zu entwickeln, die sowohl ein wichtiges Werkzeug in der Rezeptoranalytik wären, als auch dazu genutzt werden könnten,

den unerwünschten bitteren Geschmack von Medikamenten oder gesundheitsfördernden sekundären Pflanzenstoffen zu mindern. Damit könnte ein Beitrag zur Gesundheit der Menschen geleistet werden.

Literaturverzeichnis

- Adler, E., M. A. Hoon, K. L. Mueller, J. Chandrashekar, N. J. Ryba and C. S. Zuker (2000). "A novel family of mammalian taste receptors." *Cell* **100**(6): 693-702.
- Ahuja, S., V. Hornak, E. C. Yan, N. Syrett, J. A. Goncalves, A. Hirshfeld, M. Ziliox, T. P. Sakmar, M. Sheves, et al. (2009). "Helix movement is coupled to displacement of the second extracellular loop in rhodopsin activation." *Nat Struct Mol Biol* **16**(2): 168-75.
- Albert, P. R. and L. Robillard (2002). "G protein specificity: traffic direction required." *Cell Signal* **14**(5): 407-18.
- Ammon, C., J. Schafer, O. J. Kreuzer and W. Meyerhof (2002). "Presence of a plasma membrane targeting sequence in the amino-terminal region of the rat somatostatin receptor 3." *Arch Physiol Biochem* **110**(1-2): 137-45.
- Angers, S., A. Salahpour and M. Bouvier (2002). "Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**: 409-35.
- Attwood, T. K. and J. B. Findlay (1994). "Fingerprinting G-protein-coupled receptors." *Protein Eng* **7**(2): 195-203.
- Bachmanov, A. A. and G. K. Beauchamp (2007). "Taste receptor genes." *Annu Rev Nutr* **27**: 389-414.
- Ballesteros, J. A., H. Weinstein and C. S. Stuart (1995). [19] Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods in Neurosciences*, Academic Press. **Volume 25**: 366-428.
- Bartel, D. L., S. L. Sullivan, E. G. Lavoie, J. Seigny and T. E. Finger (2006). "Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is the ecto-ATPase of type I cells in taste buds." *J Comp Neurol* **497**(1): 1-12.
- Behrens, M., J. Bartelt, C. Reichling, M. Winnig, C. Kuhn and W. Meyerhof (2006). "Members of RTP and REEP gene families influence functional bitter taste receptor expression." *J Biol Chem* **281**(29): 20650-9.
- Behrens, M., A. Brockhoff, C. Batram, C. Kuhn, G. Appendino and W. Meyerhof (2009). "The human bitter taste receptor hTAS2R50 is activated by the two natural bitter terpenoids andrographolide and amarogentin." *J Agric Food Chem* **57**(21): 9860-6.
- Behrens, M., A. Brockhoff, C. Kuhn, B. Bufe, M. Winnig and W. Meyerhof (2004). "The human taste receptor hTAS2R14 responds to a variety of different bitter compounds." *Biochem Biophys Res Commun* **319**(2): 479-85.
- Behrens, M., S. Foerster, F. Staehler, J. D. Raguse and W. Meyerhof (2007). "Gustatory expression pattern of the human TAS2R bitter receptor gene family reveals a heterogenous population of bitter responsive taste receptor cells." *J Neurosci* **27**(46): 12630-40.
- Behrens, M. and W. Meyerhof (2010). "Oral and extraoral bitter taste receptors." *Results Probl Cell Differ* **52**: 87-99.
- Behrens, M., W. Meyerhof, C. Hellfritsch and T. Hofmann (2011). "Sweet and umami taste: natural products, their chemosensory targets, and beyond." *Angew Chem Int Ed Engl* **50**(10): 2220-42.
- Berger, S. and D. Sicker (2009). *Classics in spectroscopy: isolation and structure elucidation of natural products*, WILEY-VCH.
- Bertani, G. (1951). "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **62**(3): 293-300.
- Benzencon, C., J. le Coutre and S. Damak (2007). "Taste-signaling proteins are coexpressed in solitary intestinal epithelial cells." *Chem Senses* **32**(1): 41-9.
- Biarnes, X., A. Marchiori, A. Giorgetti, C. Lanzara, P. Gasparini, P. Carloni, S. Born, A. Brockhoff, M. Behrens, et al. (2010). "Insights into the binding of Phenyltiocarbamide (PTC) agonist to its target human TAS2R38 bitter receptor." *PLoS One* **5**(8): e12394.
- Bocquet, N., H. Nury, M. Baaden, C. Le Poupon, J. P. Changeux, M. Delarue and P. J. Corringer (2009). "X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation." *Nature* **457**(7225): 111-4.
- Brams, M., A. Pandya, D. Kuzmin, R. van Elk, L. Krijnen, J. L. Yakel, V. Tsetlin, A. B. Smit and C. Ulens (2011). "A structural and mutagenic blueprint for molecular recognition of strychnine and d-tubocurarine by different cys-loop receptors." *PLoS Biol* **9**(3): e1001034.
- Brejck, K., W. J. van Dijk, R. V. Klaassen, M. Schuurmans, J. van Der Oost, A. B. Smit and T. K. Sixma (2001). "Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors." *Nature* **411**(6835): 269-76.

- Brockhoff, A., M. Behrens, A. Massarotti, G. Appendino and W. Meyerhof (2007). "Broad tuning of the human bitter taste receptor hTAS2R46 to various sesquiterpene lactones, clerodane and labdane diterpenoids, strychnine, and denatonium." *J Agric Food Chem* **55**(15): 6236-43.
- Brockhoff, A., M. Behrens, M. Y. Niv and W. Meyerhof (2010). "Structural requirements of bitter taste receptor activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(24): 11110-5.
- Brockhoff, A., M. Behrens, N. Roudnitzky, G. Appendino, C. Avonto and W. Meyerhof (2011). "Receptor agonism and antagonism of dietary bitter compounds." *J Neurosci* **31**(41): 14775-82.
- Brooks, B. R., C. L. Brooks, 3rd, A. D. Mackerell, Jr., L. Nilsson, R. J. Petrella, B. Roux, Y. Won, G. Archontis, C. Bartels, et al. (2009). "CHARMM: the biomolecular simulation program." *J Comput Chem* **30**(10): 1545-614.
- Bufe, B., P. A. Breslin, C. Kuhn, D. R. Reed, C. D. Tharp, J. P. Slack, U. K. Kim, D. Drayna and W. Meyerhof (2005). "The molecular basis of individual differences in phenylthiocarbamide and propylthiouracil bitterness perception." *Curr Biol* **15**(4): 322-7.
- Bufe, B., T. Hofmann, D. Krautwurst, J. D. Raguse and W. Meyerhof (2002). "The human TAS2R16 receptor mediates bitter taste in response to beta-glucopyranosides." *Nat Genet* **32**(3): 397-401.
- Cartoni, C., K. Yasumatsu, T. Ohkuri, N. Shigemura, R. Yoshida, N. Godinot, J. le Coutre, Y. Ninomiya and S. Damak (2010). "Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120." *J Neurosci* **30**(25): 8376-82.
- Chale-Rush, A., J. R. Burgess and R. D. Mattes (2007). "Evidence for human orosensory (taste?) sensitivity to free fatty acids." *Chem Senses* **32**(5): 423-31.
- Chandrashekar, J., M. A. Hoon, N. J. Ryba and C. S. Zuker (2006). "The receptors and cells for mammalian taste." *Nature* **444**(7117): 288-94.
- Chandrashekar, J., C. Kuhn, Y. Oka, D. A. Yarmolinsky, E. Hummler, N. J. Ryba and C. S. Zuker (2010). "The cells and peripheral representation of sodium taste in mice." *Nature* **464**(7286): 297-301.
- Chandrashekar, J., K. L. Mueller, M. A. Hoon, E. Adler, L. Feng, W. Guo, C. S. Zuker and N. J. Ryba (2000). "T2Rs function as bitter taste receptors." *Cell* **100**(6): 703-11.
- Chang, R. B., H. Waters and E. R. Liman (2010). "A proton current drives action potentials in genetically identified sour taste cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(51): 22320-5.
- Chaudhari, N. and S. D. Roper (2010). "The cell biology of taste." *J Cell Biol* **190**(3): 285-96.
- Chen, M. C., S. V. Wu, J. R. Reeve, Jr. and E. Rozengurt (2006). "Bitter stimuli induce Ca²⁺ signaling and CCK release in enteroendocrine STC-1 cells: role of L-type voltage-sensitive Ca²⁺ channels." *Am J Physiol Cell Physiol* **291**(4): C726-39.
- Chidiac, P., T. E. Hebert, M. Valiquette, M. Dennis and M. Bouvier (1994). "Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists." *Mol Pharmacol* **45**(3): 490-9.
- Clapp, T. R., K. R. Trubey, A. Vandenbeuch, L. M. Stone, R. F. Margolskee, N. Chaudhari and S. C. Kinnamon (2008). "Tonic activity of Galpha-gustducin regulates taste cell responsivity." *FEBS Lett* **582**(27): 3783-7.
- Clapp, T. R., R. Yang, C. L. Stoick, S. C. Kinnamon and J. C. Kinnamon (2004). "Morphologic characterization of rat taste receptor cells that express components of the phospholipase C signaling pathway." *J Comp Neurol* **468**(3): 311-21.
- Congreve, M., C. J. Langmead, J. S. Mason and F. H. Marshall (2011). "Progress in structure based drug design for G protein-coupled receptors." *J Med Chem* **54**(13): 4283-311.
- Conte, C., M. Ebeling, A. Marcuz, P. Nef and P. J. Andres-Barquin (2002). "Identification and characterization of human taste receptor genes belonging to the TAS2R family." *Cytogenet Genome Res* **98**(1): 45-53.
- Dai, W., Z. You, H. Zhou, J. Zhang and Y. Hu (2011). "Structure-function relationships of the human bitter taste receptor hTAS2R1: insights from molecular modeling studies." *J Recept Signal Transduct Res* **31**(3): 229-40.
- Damak, S., M. Rong, K. Yasumatsu, Z. Kokrashvili, V. Varadarajan, S. Zou, P. Jiang, Y. Ninomiya and R. F. Margolskee (2003). "Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3." *Science* **301**(5634): 850-3.
- De Lean, A., J. M. Stadel and R. J. Lefkowitz (1980). "A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor." *J Biol Chem* **255**(15): 7108-17.
- DeFazio, R. A., G. Dvoryanchikov, Y. Maruyama, J. W. Kim, E. Pereira, S. D. Roper and N. Chaudhari (2006). "Separate populations of receptor cells and presynaptic cells in mouse taste buds." *J Neurosci* **26**(15): 3971-80.
- Delay, E. R., N. P. Hernandez, K. Bromley and R. F. Margolskee (2006). "Sucrose and monosodium glutamate taste thresholds and discrimination ability of T1R3 knockout mice." *Chem Senses* **31**(4): 351-7.
- Deshpande, D. A., W. C. Wang, E. L. McIlmoyle, K. S. Robinett, R. M. Schillinger, S. S. An, J. S. Sham and S. B. Liggett (2010). "Bitter taste receptors on airway smooth muscle bronchodilate by localized calcium signaling and reverse obstruction." *Nat Med* **16**(11): 1299-304.

- Devi, L. A. (2001). "Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking." *Trends Pharmacol Sci* **22**(10): 532-7.
- Dolphin, A. C. (1999). "L-type calcium channel modulation." *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **33**: 153-77.
- Dong, D., G. Jones and S. Zhang (2009). "Dynamic evolution of bitter taste receptor genes in vertebrates." *BMC Evol Biol* **9**: 12.
- Dotson, C. D. (2010). "The search for mechanisms underlying the sour taste evoked by acids continues." *Chem Senses* **35**(7): 545-7.
- Dotson, C. D., L. Zhang, H. Xu, Y. K. Shin, S. Vignes, S. H. Ott, A. E. Elson, H. J. Choi, H. Shaw, et al. (2008). "Bitter taste receptors influence glucose homeostasis." *PLoS One* **3**(12): e3974.
- Dougherty, D. A. (1996). "Cation-pi interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp." *Science* **271**(5246): 163-8.
- Drewnowski, A. (2001). "The science and complexity of bitter taste." *Nutr Rev* **59**(6): 163-9.
- Dvoryanchikov, G., M. S. Sinclair, I. Perea-Martinez, T. Wang and N. Chaudhari (2009). "Inward rectifier channel, ROMK, is localized to the apical tips of glial-like cells in mouse taste buds." *J Comp Neurol* **517**(1): 1-14.
- Farbman, A. I. (1965). "Fine Structure of the Taste Bud." *J Ultrastruct Res* **12**: 328-50.
- Finger, T. E., B. Bottger, A. Hansen, K. T. Anderson, H. Alimohammadi and W. L. Silver (2003). "Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(15): 8981-6.
- Finger, T. E., V. Danilova, J. Barrows, D. L. Bartel, A. J. Vigers, L. Stone, G. Hellekant and S. C. Kinnamon (2005). "ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves." *Science* **310**(5753): 1495-9.
- Foord, S. M., T. I. Bonner, R. R. Neubig, E. M. Rosser, J. P. Pin, A. P. Davenport, M. Spedding and A. J. Harmar (2005). "International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list." *Pharmacol Rev* **57**(2): 279-88.
- Ford, C. E., N. P. Skiba, H. Bae, Y. Daaka, E. Reuveny, L. R. Shekter, R. Rosal, G. Weng, C. S. Yang, et al. (1998). "Molecular basis for interactions of G protein betagamma subunits with effectors." *Science* **280**(5367): 1271-4.
- Fredriksson, R., M. C. Lagerstrom, L. G. Lundin and H. B. Schiöth (2003). "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints." *Mol Pharmacol* **63**(6): 1256-72.
- Freedman, N. J. and R. J. Lefkowitz (1996). "Desensitization of G protein-coupled receptors." *Recent Prog Horm Res* **51**: 319-51; discussion 352-3.
- Fukuwatari, T., K. Shibata, K. Iguchi, T. Saeki, A. Iwata, K. Tani, E. Sugimoto and T. Fushiki (2003). "Role of gustation in the recognition of oleate and triolein in anosmic rats." *Physiol Behav* **78**(4-5): 579-83.
- Galindo, M. M., N. Voigt, J. Stein, J. van Lengerich, J. D. Raguse, T. Hofmann, W. Meyerhof and M. Behrens (2011). "G Protein-Coupled Receptors in Human Fat Taste Perception." *Chem Senses*.
- Gao, N., M. Lu, F. Echeverri, B. Laita, D. Kalabat, M. E. Williams, P. Hevezi, A. Zlotnik and B. D. Moyer (2009). "Voltage-gated sodium channels in taste bud cells." *BMC Neurosci* **10**: 20.
- Gee, K. R., K. A. Brown, W. N. Chen, J. Bishop-Stewart, D. Gray and I. Johnson (2000). "Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes." *Cell Calcium* **27**(2): 97-106.
- Ghanouni, P., J. J. Steenhuis, D. L. Farrens and B. K. Kobilka (2001). "Agonist-induced conformational changes in the G-protein-coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(11): 5997-6002.
- Glendinning, J. I. (1994). "Is the bitter rejection response always adaptive?" *Physiol Behav* **56**(6): 1217-27.
- Glendinning, J. I., Y. M. Yiin, K. Ackroff and A. Scalfani (2008). "Intragastric infusion of denatonium conditions flavor aversions and delays gastric emptying in rodents." *Physiol Behav* **93**(4-5): 757-65.
- Gray, H. and W. H. Lewis (1918). *Anatomy of the human body*. Philadelphia, Lea & Febiger.
- Gulbrandsen, B. D., T. R. Clapp, T. E. Finger and S. C. Kinnamon (2008). "Nasal solitary chemoreceptor cell responses to bitter and trigeminal stimulants in vitro." *J Neurophysiol* **99**(6): 2929-37.
- Hanyaloglu, A. C. and M. von Zastrow (2008). "Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48**: 537-68.
- Heck, G. L., S. Mierson and J. A. DeSimone (1984). "Salt taste transduction occurs through an amiloride-sensitive sodium transport pathway." *Science* **223**(4634): 403-5.
- Hejaz, H., R. Karaman and M. Khamis (2011). "Computer-assisted design for paracetamol masking bitter taste prodrugs." *J Mol Model*.
- Hilf, R. J. and R. Dutzler (2009). "Structure of a potentially open state of a proton-activated pentameric ligand-gated ion channel." *Nature* **457**(7225): 115-8.
- Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen and L. R. Pease (1989). "Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction." *Gene* **77**(1): 51-9.

- Hofer, D. and D. Drenckhahn (1998). "Identification of the taste cell G-protein, alpha-gustducin, in brush cells of the rat pancreatic duct system." *Histochem Cell Biol* **110**(3): 303-9.
- Hofer, D., B. Puschel and D. Drenckhahn (1996). "Taste receptor-like cells in the rat gut identified by expression of alpha-gustducin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(13): 6631-4.
- Hofmann, K. P., P. Scheerer, P. W. Hildebrand, H. W. Choe, J. H. Park, M. Heck and O. P. Ernst (2009). "A G protein-coupled receptor at work: the rhodopsin model." *Trends Biochem Sci* **34**(11): 540-52.
- Hoon, M. A., E. Adler, J. Lindemeier, J. F. Battey, N. J. Ryba and C. S. Zuker (1999). "Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity." *Cell* **96**(4): 541-51.
- Horio, N., R. Yoshida, K. Yasumatsu, Y. Yanagawa, Y. Ishimaru, H. Matsunami and Y. Ninomiya (2011). "Sour taste responses in mice lacking PKD channels." *PLoS One* **6**(5): e20007.
- Huang, A. L., X. Chen, M. A. Hoon, J. Chandrashekar, W. Guo, D. Trankner, N. J. Ryba and C. S. Zuker (2006). "The cells and logic for mammalian sour taste detection." *Nature* **442**(7105): 934-8.
- Huang, L., Y. G. Shanker, J. Dubauskaite, J. Z. Zheng, W. Yan, S. Rosenzweig, A. I. Spielman, M. Max and R. F. Margolskee (1999). "Ggamma13 colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates IP3 responses to bitter denatonium." *Nat Neurosci* **2**(12): 1055-62.
- Huang, Y. A., Y. Maruyama, R. Stimac and S. D. Roper (2008). "Presynaptic (Type III) cells in mouse taste buds sense sour (acid) taste." *J Physiol* **586**(Pt 12): 2903-12.
- Huang, Y. A. and S. D. Roper (2010). "Intracellular Ca(2+) and TRPM5-mediated membrane depolarization produce ATP secretion from taste receptor cells." *J Physiol* **588**(Pt 13): 2343-50.
- Huang, Y. J., Y. Maruyama, G. Dvoryanchikov, E. Pereira, N. Chaudhari and S. D. Roper (2007). "The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(15): 6436-41.
- Huberman, J. A. (1995). "Importance of measuring nucleic acid absorbance at 240 nm as well as at 260 and 280 nm." *Biotechniques* **18**(4): 636.
- Intelmann, D., C. Batram, C. Kuhn, G. Haseleu, W. Meyerhof and T. Hofmann (2009). "Three TAS2R Bitter Taste Receptors Mediate the Psychophysical Responses to Bitter Compounds of Hops (<i>Humulus lupulus</i>) and Beer." *Chemosensory Perception* **2**(3): 118-132.
- Ishimaru, Y., H. Inada, M. Kubota, H. Zhuang, M. Tominaga and H. Matsunami (2006). "Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(33): 12569-74.
- Jha, A. N., S. Vishveshwara and J. R. Banavar (2011). "Amino acid interaction preferences in helical membrane proteins." *Protein Eng Des Sel* **24**(8): 579-88.
- Jiang, L. and L. Lai (2002). "CH...O hydrogen bonds at protein-protein interfaces." *J Biol Chem* **277**(40): 37732-40.
- Joost, P. and A. Methner (2002). "Phylogenetic analysis of 277 human G-protein-coupled receptors as a tool for the prediction of orphan receptor ligands." *Genome Biol* **3**(11): RESEARCH0063.
- Jung, H. S., K. Akita and J. Y. Kim (2004). "Spacing patterns on tongue surface-gustatory papilla." *Int J Dev Biol* **48**(2-3): 157-61.
- Katritch, V. and R. Abagyan (2011). "GPCR agonist binding revealed by modeling and crystallography." *Trends Pharmacol Sci* **32**(11): 637-43.
- Katritch, V., K. A. Reynolds, V. Cherezov, M. A. Hanson, C. B. Roth, M. Yeager and R. Abagyan (2009). "Analysis of full and partial agonists binding to beta2-adrenergic receptor suggests a role of transmembrane helix V in agonist-specific conformational changes." *J Mol Recognit* **22**(4): 307-18.
- Kim, U., S. Wooding, D. Ricci, L. B. Jorde and D. Drayna (2005). "Worldwide haplotype diversity and coding sequence variation at human bitter taste receptor loci." *Hum Mutat* **26**(3): 199-204.
- Kim, U. K., E. Jorgenson, H. Coon, M. Leppert, N. Risch and D. Drayna (2003). "Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide." *Science* **299**(5610): 1221-5.
- Kinnamon, S. C. (2000). "A plethora of taste receptors." *Neuron* **25**(3): 507-10.
- Kinnamon, S. C. (2011). "Taste receptor signalling - from tongues to lungs." *Acta Physiol (Oxf)*.
- Kitagawa, I. (2002). "Licorice root. A-natural sweetener and an important ingredient in Chinese medicine." *Pure and Applied Chemistry* **74**(7): 1189-1198.
- Kolakowski, L. F., Jr. (1994). "GCRDb: a G-protein-coupled receptor database." *Receptors Channels* **2**(1): 1-7.
- Kolb, P. and G. Klebe (2011). "Das goldene Zeitalter der Strukturbiologie von GPCRs: Einflüsse auf die Wirkstoffentwicklung?" *Angewandte Chemie* **123**(49): 11778-11780.
- Koska, J., V. Z. Spassov, A. J. Maynard, L. Yan, N. Austin, P. K. Flook and C. M. Venkatachalam (2008). "Fully automated molecular mechanics based induced fit protein-ligand docking method." *J Chem Inf Model* **48**(10): 1965-73.
- Kostenis, E., M. Waelbroeck and G. Milligan (2005). "Techniques: promiscuous Galpha proteins in basic research and drug discovery." *Trends Pharmacol Sci* **26**(11): 595-602.

- Kozak, M. (1984). "Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin in vivo." *Nature* **308**(5956): 241-6.
- Kozak, M. (1987). "An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs." *Nucleic Acids Res* **15**(20): 8125-48.
- Krivov, G. G., M. V. Shapovalov and R. L. Dunbrack, Jr. (2009). "Improved prediction of protein side-chain conformations with SCWRL4." *Proteins* **77**(4): 778-95.
- Kruskal, W. and A. Wallis (1952). "Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis." *Journal of the American Statistical Association* **47**(260): 583-621.
- Kuhn, C., B. Bufe, C. Batram and W. Meyerhof (2010). "Oligomerization of TAS2R bitter taste receptors." *Chem Senses* **35**(5): 395-406.
- Kuhn, C., B. Bufe, M. Winnig, T. Hofmann, O. Frank, M. Behrens, T. Lewtschenko, J. P. Slack, C. D. Ward, et al. (2004). "Bitter taste receptors for saccharin and acesulfame K." *J Neurosci* **24**(45): 10260-5.
- Kurose, H. (2003). "Galphal2 and Galphal3 as key regulatory mediator in signal transduction." *Life Sci* **74**(2-3): 155-61.
- Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." *Nature* **409**(6822): 860-921.
- Laurie, A. T. and R. M. Jackson (2005). "Q-SiteFinder: an energy-based method for the prediction of protein-ligand binding sites." *Bioinformatics* **21**(9): 1908-16.
- Lawton, D. M., D. N. Furness, B. Lindemann and C. M. Hackney (2000). "Localization of the glutamate-aspartate transporter, GLAST, in rat taste buds." *Eur J Neurosci* **12**(9): 3163-71.
- Lee, S. P., B. F. O'Dowd, R. D. Rajaram, T. Nguyen and S. R. George (2003). "D2 dopamine receptor homodimerization is mediated by multiple sites of interaction, including an intermolecular interaction involving transmembrane domain 4." *Biochemistry* **42**(37): 11023-31.
- Li, J., P. C. Edwards, M. Burghammer, C. Villa and G. F. Schertler (2004). "Structure of bovine rhodopsin in a trigonal crystal form." *J Mol Biol* **343**(5): 1409-38.
- Li, X., L. Staszewski, H. Xu, K. Durick, M. Zoller and E. Adler (2002). "Human receptors for sweet and umami taste." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(7): 4692-6.
- Lin, W., C. A. Burks, D. R. Hansen, S. C. Kinnamon and T. A. Gilbertson (2004). "Taste receptor cells express pH-sensitive leak K⁺ channels." *J Neurophysiol* **92**(5): 2909-19.
- Lin, W., T. E. Finger, B. C. Rossier and S. C. Kinnamon (1999). "Epithelial Na⁺ channel subunits in rat taste cells: localization and regulation by aldosterone." *J Comp Neurol* **405**(3): 406-20.
- Lin, W., T. Ogura, R. F. Margolskee, T. E. Finger and D. Restrepo (2008). "TRPM5-expressing solitary chemosensory cells respond to odorous irritants." *J Neurophysiol* **99**(3): 1451-60.
- Lindemann, B. (1996). "Taste reception." *Physiol Rev* **76**(3): 718-66.
- Liu, D. and E. R. Liman (2003). "Intracellular Ca²⁺ and the phospholipid PIP₂ regulate the taste transduction ion channel TRPM5." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(25): 15160-5.
- LopezJimenez, N. D., M. M. Cavenagh, E. Sainz, M. A. Cruz-Ithier, J. F. Battey and S. L. Sullivan (2006). "Two members of the TRPP family of ion channels, Pkd113 and Pkd211, are co-expressed in a subset of taste receptor cells." *J Neurochem* **98**(1): 68-77.
- Luttrell, L. M. (2008). "Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors." *Mol Biotechnol* **39**(3): 239-64.
- Lynch, J. W. (2009). "Native glycine receptor subtypes and their physiological roles." *Neuropharmacology* **56**(1): 303-9.
- Maehashi, K., M. Matano, H. Wang, L. A. Vo, Y. Yamamoto and L. Huang (2008). "Bitter peptides activate hTAS2Rs, the human bitter receptors." *Biochem Biophys Res Commun* **365**(4): 851-5.
- Maruyama, Y., E. Pereira, R. F. Margolskee, N. Chaudhari and S. D. Roper (2006). "Umami responses in mouse taste cells indicate more than one receptor." *J Neurosci* **26**(8): 2227-34.
- Matsunami, H., J. P. Montmayeur and L. B. Buck (2000). "A family of candidate taste receptors in human and mouse." *Nature* **404**(6778): 601-4.
- Mattes, R. D. (2009). "Is there a fatty acid taste?" *Annu Rev Nutr* **29**: 305-27.
- Max, M., Y. G. Shanker, L. Huang, M. Rong, Z. Liu, F. Campagne, H. Weinstein, S. Damak and R. F. Margolskee (2001). "Tas1r3, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus Sac." *Nat Genet* **28**(1): 58-63.
- McLaughlin, S. K., P. J. McKinnon and R. F. Margolskee (1992). "Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins." *Nature* **357**(6379): 563-9.
- Mecozzi, S., A. P. West, Jr. and D. A. Dougherty (1996). "Cation-pi interactions in aromatics of biological and medicinal interest: electrostatic potential surfaces as a useful qualitative guide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(20): 10566-71.
- Medler, K. F., R. F. Margolskee and S. C. Kinnamon (2003). "Electrophysiological characterization of voltage-gated currents in defined taste cell types of mice." *J Neurosci* **23**(7): 2608-17.
- Meyerhof, W. (2005). "Elucidation of mammalian bitter taste." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **154**: 37-72.

- Meyerhof, W., C. Batram, C. Kuhn, A. Brockhoff, E. Chudoba, B. Bufe, G. Appendino and M. Behrens (2010). "The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors." *Chem Senses* **35**(2): 157-70.
- Meyerhof, W., S. Born, A. Brockhoff and M. Behrens (2011). "Molecular biology of mammalian bitter taste receptors. A review." *Flavour and Fragrance Journal* **26**(4): 260-268.
- Milligan, G. (2001). "Oligomerisation of G-protein-coupled receptors." *J Cell Sci* **114**(Pt 7): 1265-71.
- Miyazawa, A., Y. Fujiyoshi and N. Unwin (2003). "Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore." *Nature* **423**(6943): 949-55.
- Montmayeur, J. P., S. D. Liberles, H. Matsunami and L. B. Buck (2001). "A candidate taste receptor gene near a sweet taste locus." *Nat Neurosci* **4**(5): 492-8.
- Moriyama, K., M. M. Bakre, F. Ahmed, N. Spickofsky, M. Max and R. F. Margolskee (2002). "Assaying G protein-phosphodiesterase interactions in sensory systems." *Methods Enzymol* **345**: 37-48.
- Morris, A. J. and S. Scarlata (1997). "Regulation of effectors by G-protein alpha- and beta gamma-subunits. Recent insights from studies of the phospholipase c-beta isoenzymes." *Biochem Pharmacol* **54**(4): 429-35.
- Moss, G. P. (1989). "IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). The nomenclature of steroids. Recommendations 1989." *Eur J Biochem* **186**(3): 429-58.
- Mueller, K. L., M. A. Hoon, I. Erlenbach, J. Chandrashekar, C. S. Zuker and N. J. Ryba (2005). "The receptors and coding logic for bitter taste." *Nature* **434**(7030): 225-9.
- Murray, R. G. (1993). "Cellular relations in mouse circumvallate taste buds." *Microsc Res Tech* **26**(3): 209-24.
- Murray, R. G., A. Murray and S. Fujimoto (1969). "Fine structure of gustatory cells in rabbit taste buds." *J Ultrastruct Res* **27**(5): 444-61.
- Nelson, G., J. Chandrashekar, M. A. Hoon, L. Feng, G. Zhao, N. J. Ryba and C. S. Zuker (2002). "An amino-acid taste receptor." *Nature* **416**(6877): 199-202.
- Nelson, G., M. A. Hoon, J. Chandrashekar, Y. Zhang, N. J. Ryba and C. S. Zuker (2001). "Mammalian sweet taste receptors." *Cell* **106**(3): 381-90.
- Nelson, G. M. and T. E. Finger (1993). "Immunolocalization of different forms of neural cell adhesion molecule (NCAM) in rat taste buds." *J Comp Neurol* **336**(4): 507-16.
- Nelson, T. M., N. D. Lopezjimenez, L. Tassarollo, M. Inoue, A. A. Bachmanov and S. L. Sullivan (2010). "Taste function in mice with a targeted mutation of the *pkd1l3* gene." *Chem Senses* **35**(7): 565-77.
- Offermanns, S. and M. I. Simon (1995). "G alpha 15 and G alpha 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C." *J Biol Chem* **270**(25): 15175-80.
- Okada, T., M. Sugihara, A. N. Bondar, M. Elstner, P. Entel and V. Buss (2004). "The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 Å crystal structure." *J Mol Biol* **342**(2): 571-83.
- Pace, C. N., G. Horn, E. J. Hebert, J. Bechert, K. Shaw, L. Urbanikova, J. M. Scholtz and J. Sevcik (2001). "Tyrosine hydrogen bonds make a large contribution to protein stability." *J Mol Biol* **312**(2): 393-404.
- Perez, C. A., L. Huang, M. Rong, J. A. Kozak, A. K. Preuss, H. Zhang, M. Max and R. F. Margolskee (2002). "A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells." *Nat Neurosci* **5**(11): 1169-76.
- Pronin, A. N., H. Tang, J. Connor and W. Keung (2004). "Identification of ligands for two human bitter T2R receptors." *Chem Senses* **29**(7): 583-93.
- Pronin, A. N., H. Xu, H. Tang, L. Zhang, Q. Li and X. Li (2007). "Specific alleles of bitter receptor genes influence human sensitivity to the bitterness of aloin and saccharin." *Curr Biol* **17**(16): 1403-8.
- Rasmussen, S. G., B. T. Devree, Y. Zou, A. C. Kruse, K. Y. Chung, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. S. Chae, E. Pardon, et al. (2011). "Crystal structure of the beta(2) adrenergic receptor-Gs protein complex." *Nature*.
- Reichling, C., W. Meyerhof and M. Behrens (2008). "Functions of human bitter taste receptors depend on N-glycosylation." *J Neurochem* **106**(3): 1138-48.
- Reynolds, K. A., V. Katritch and R. Abagyan (2009). "Identifying conformational changes of the beta(2) adrenoceptor that enable accurate prediction of ligand/receptor interactions and screening for GPCR modulators." *J Comput Aided Mol Des* **23**(5): 273-88.
- Richter, T. A., G. A. Dvoryanchikov, N. Chaudhari and S. D. Roper (2004). "Acid-sensitive two-pore domain potassium (K2P) channels in mouse taste buds." *J Neurophysiol* **92**(3): 1928-36.
- Romanov, R. A., O. A. Rogachevskaja, M. F. Bystrova, P. Jiang, R. F. Margolskee and S. S. Kolesnikov (2007). "Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells." *Embo J* **26**(3): 657-67.
- Rompler, H., C. Staubert, D. Thor, A. Schulz, M. Hofreiter and T. Schoneberg (2007). "G protein-coupled time travel: evolutionary aspects of GPCR research." *Mol Interv* **7**(1): 17-25.
- Roper, S. D. (2007). "Signal transduction and information processing in mammalian taste buds." *Pflugers Arch* **454**(5): 759-76.
- Rosenbaum, D. M., S. G. Rasmussen and B. K. Kobilka (2009). "The structure and function of G-protein-coupled receptors." *Nature* **459**(7245): 356-63.
- Rossler, P., C. Kroner, J. Freitag, J. Noe and H. Breer (1998). "Identification of a phospholipase C beta subtype in rat taste cells." *Eur J Cell Biol* **77**(3): 253-61.

- Rozengurt, N., S. V. Wu, M. C. Chen, C. Huang, C. Sternini and E. Rozengurt (2006). "Colocalization of the alpha-subunit of gustducin with PYY and GLP-1 in L cells of human colon." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **291**(5): G792-802.
- Ruiz-Avila, L., S. K. McLaughlin, D. Wildman, P. J. McKinnon, A. Robichon, N. Spickofsky and R. F. Margolskee (1995). "Coupling of bitter receptor to phosphodiesterase through transducin in taste receptor cells." Nature **376**(6535): 80-5.
- Rutishauser, U. (1984). "Developmental biology of a neural cell adhesion molecule." Nature **310**(5978): 549-54.
- Sainz, E., M. M. Cavenagh, J. Gutierrez, J. F. Battey, J. K. Northup and S. L. Sullivan (2007). "Functional characterization of human bitter taste receptors." Biochem J **403**(3): 537-43.
- Sainz, E., J. N. Korley, J. F. Battey and S. L. Sullivan (2001). "Identification of a novel member of the T1R family of putative taste receptors." J Neurochem **77**(3): 896-903.
- Saito, H., M. Kubota, R. W. Roberts, Q. Chi and H. Matsunami (2004). "RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors." Cell **119**(5): 679-91.
- Sakurai, T., T. Misaka, M. Ishiguro, K. Masuda, T. Sugawara, K. Ito, T. Kobayashi, S. Matsuo, Y. Ishimaru, et al. (2010a). "Characterization of the beta-D-glucopyranoside binding site of the human bitter taste receptor hTAS2R16." J Biol Chem **285**(36): 28373-8.
- Sakurai, T., T. Misaka, Y. Ueno, M. Ishiguro, S. Matsuo, Y. Ishimaru, T. Asakura and K. Abe (2010b). "The human bitter taste receptor, hTAS2R16, discriminates slight differences in the configuration of disaccharides." Biochem Biophys Res Commun **402**(4): 595-601.
- Salom, D., D. T. Lodowski, R. E. Stenkamp, I. Le Trong, M. Golczak, B. Jastrzebska, T. Harris, J. A. Ballesteros and K. Palczewski (2006). "Crystal structure of a photoactivated deprotonated intermediate of rhodopsin." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(44): 16123-8.
- Samama, P., S. Cotecchia, T. Costa and R. J. Lefkowitz (1993). "A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model." J Biol Chem **268**(7): 4625-36.
- Samama, P., G. Pei, T. Costa, S. Cotecchia and R. J. Lefkowitz (1994). "Negative antagonists promote an inactive conformation of the beta 2-adrenergic receptor." Mol Pharmacol **45**(3): 390-4.
- Sambrook, J., D. W. Russell and L. Cold Spring Harbor (2001). Molecular cloning : a laboratory manual / Joseph Sambrook, David W. Russell. Cold Spring Harbor, N.Y. :, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Shah, A. S., Y. Ben-Shahar, T. O. Moninger, J. N. Kline and M. J. Welsh (2009). "Motile cilia of human airway epithelia are chemosensory." Science **325**(5944): 1131-4.
- Shi, P., J. Zhang, H. Yang and Y. P. Zhang (2003). "Adaptive diversification of bitter taste receptor genes in Mammalian evolution." Mol Biol Evol **20**(5): 805-14.
- Shirokova, E., K. Schmiedeberg, P. Bedner, H. Niessen, K. Willecke, J. D. Raguse, W. Meyerhof and D. Krautwurst (2005). "Identification of specific ligands for orphan olfactory receptors. G protein-dependent agonism and antagonism of odorants." J Biol Chem **280**(12): 11807-15.
- Simon, S. A., I. E. de Araujo, R. Gutierrez and M. A. Nicolelis (2006). "The neural mechanisms of gustation: a distributed processing code." Nat Rev Neurosci **7**(11): 890-901.
- Singh, N., P. Pydi, J. Upadhyaya and P. Chelikani (2011). "Structural basis of activation of bitter taste receptor T2R1 and comparison with class A GPCRs." J Biol Chem.
- Slack, J. P., A. Brockhoff, C. Batram, S. Menzel, C. Sonnabend, S. Born, M. M. Galindo, S. Kohl, S. Thalmann, et al. (2010). "Modulation of bitter taste perception by a small molecule hTAS2R antagonist." Curr Biol **20**(12): 1104-9.
- Smith, D. V., R. A. Akeson and M. T. Shipley (1993). "NCAM expression by subsets of taste cells is dependent upon innervation." J Comp Neurol **336**(4): 493-506.
- Smith, R. L., P. Newberne, T. B. Adams, R. A. Ford and J. B. Hallagan (1996). "GRAS flavoring substances 17." Food Technology **50**(10): 72-&.
- Soranzo, N., B. Bufo, P. C. Sabeti, J. F. Wilson, M. E. Weale, R. Marguerie, W. Meyerhof and D. B. Goldstein (2005). "Positive selection on a high-sensitivity allele of the human bitter-taste receptor TAS2R16." Curr Biol **15**(14): 1257-65.
- Stenkamp, R. E., D. C. Teller and K. Palczewski (2002). "Crystal structure of rhodopsin: a G-protein-coupled receptor." ChemBiochem **3**(10): 963-7.
- Stevens, D. R., R. Seifert, B. Bufo, F. Muller, E. Kremmer, R. Gauss, W. Meyerhof, U. B. Kaupp and B. Lindemann (2001). "Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli." Nature **413**(6856): 631-5.
- Stoffel, R. H., 3rd, J. A. Pitcher and R. J. Lefkowitz (1997). "Targeting G protein-coupled receptor kinases to their receptor substrates." J Membr Biol **157**(1): 1-8.
- Sugawara, T., Y. Go, T. Udono, N. Morimura, M. Tomonaga, H. Hirai and H. Imai (2011). "Diversification of bitter taste receptor gene family in western chimpanzees." Mol Biol Evol **28**(2): 921-31.
- Sugawara, T., K. Ito, M. Shiroishi, N. Tokuda, H. Asada, T. Yurugi-Kobayashi, T. Shimamura, T. Misaka, N. Nomura, et al. (2009). "Fluorescence-based optimization of human bitter taste receptor expression in *Saccharomyces cerevisiae*." Biochem Biophys Res Commun **382**(4): 704-10.

- Sunahara, R. K., C. W. Dessauer and A. G. Gilman (1996). "Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**: 461-80.
- Swaminath, G., X. Deupi, T. W. Lee, W. Zhu, F. S. Thian, T. S. Kobilka and B. Kobilka (2005). "Probing the beta2 adrenoceptor binding site with catechol reveals differences in binding and activation by agonists and partial agonists." *J Biol Chem* **280**(23): 22165-71.
- Swaminath, G., Y. Xiang, T. W. Lee, J. Steenhuis, C. Parnot and B. K. Kobilka (2004). "Sequential binding of agonists to the beta2 adrenoceptor. Kinetic evidence for intermediate conformational states." *J Biol Chem* **279**(1): 686-91.
- Takeda, M., Y. Suzuki, N. Obara and Y. Nagai (1992). "Neural cell adhesion molecule of taste buds." *J Electron Microsc (Tokyo)* **41**(5): 375-80.
- Tizzano, M., M. Cristofolletti, A. Sbarbati and T. E. Finger (2011). "Expression of taste receptors in solitary chemosensory cells of rodent airways." *BMC Pulm Med* **11**: 3.
- Tizzano, M., B. D. Gulbransen, A. Vandenbeuch, T. R. Clapp, J. P. Herman, H. M. Sibhatu, M. E. Churchill, W. L. Silver, S. C. Kinnamon, et al. (2010). "Nasal chemosensory cells use bitter taste signaling to detect irritants and bacterial signals." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(7): 3210-5.
- Tomchik, S. M., S. Berg, J. W. Kim, N. Chaudhari and S. D. Roper (2007). "Breadth of tuning and taste coding in mammalian taste buds." *J Neurosci* **27**(40): 10840-8.
- Ueda, T., S. Ugawa, H. Yamamura, Y. Imaizumi and S. Shimada (2003). "Functional interaction between T2R taste receptors and G-protein alpha subunits expressed in taste receptor cells." *J Neurosci* **23**(19): 7376-80.
- Upadhyaya, J., S. P. Pydi, N. Singh, R. E. Aluko and P. Chelikani (2010). "Bitter taste receptor T2R1 is activated by dipeptides and tripeptides." *Biochem Biophys Res Commun* **398**(2): 331-5.
- Vandenbeuch, A., T. R. Clapp and S. C. Kinnamon (2008). "Amiloride-sensitive channels in type I fungiform taste cells in mouse." *BMC Neurosci* **9**: 1.
- Vandenbeuch, A. and S. C. Kinnamon (2009). "Why do taste cells generate action potentials?" *J Biol* **8**(4): 42.
- Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, et al. (2001). "The sequence of the human genome." *Science* **291**(5507): 1304-51.
- Vollhardt, K. P. C. and N. E. Schore (2005). *Organische Chemie*, Wiley-VCH-Verl.
- Wickman, K. D. and D. E. Clapham (1995). "G-protein regulation of ion channels." *Curr Opin Neurobiol* **5**(3): 278-85.
- Wooding, S., B. Bufe, C. Grassi, M. T. Howard, A. C. Stone, M. Vazquez, D. M. Dunn, W. Meyerhof, R. B. Weiss, et al. (2006). "Independent evolution of bitter-taste sensitivity in humans and chimpanzees." *Nature* **440**(7086): 930-4.
- Wooding, S., H. Gunn, P. Ramos, S. Thalmann, C. Xing and W. Meyerhof (2011). "Genetics and bitter taste responses to goitrin, a plant toxin found in vegetables." *Chem Senses* **35**(8): 685-92.
- Wu, S. V., M. C. Chen and E. Rozengurt (2005). "Genomic organization, expression, and function of bitter taste receptors (T2R) in mouse and rat." *Physiol Genomics* **22**(2): 139-49.
- Wu, S. V., N. Rozengurt, M. Yang, S. H. Young, J. Sinnott-Smith and E. Rozengurt (2002). "Expression of bitter taste receptors of the T2R family in the gastrointestinal tract and enteroendocrine STC-1 cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(4): 2392-7.
- Yang, R., H. H. Crowley, M. E. Rock and J. C. Kinnamon (2000). "Taste cells with synapses in rat circumvallate papillae display SNAP-25-like immunoreactivity." *J Comp Neurol* **424**(2): 205-15.
- Yarnitzky, T., A. Levit and M. Y. Niv (2010). "Homology modeling of G-protein-coupled receptors with X-ray structures on the rise." *Curr Opin Drug Discov Devel* **13**(3): 317-25.
- Yee, C. L., R. Yang, B. Bottger, T. E. Finger and J. C. Kinnamon (2001). "'Type III' cells of rat taste buds: immunohistochemical and ultrastructural studies of neuron-specific enolase, protein gene product 9.5, and serotonin." *J Comp Neurol* **440**(1): 97-108.
- Yoshida, R., K. Yasumatsu, S. Shirosaki, M. Jyotaki, N. Horio, Y. Murata, N. Shigemura, K. Nakashima and Y. Ninomiya (2009). "Multiple receptor systems for umami taste in mice." *Ann N Y Acad Sci* **1170**: 51-4.
- Zhao, G. Q., Y. Zhang, M. A. Hoon, J. Chandrashekar, I. Erlenbach, N. J. Ryba and C. S. Zuker (2003). "The receptors for mammalian sweet and umami taste." *Cell* **115**(3): 255-66.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Humane Zunge mit Papillen und Geschmacksknospe	1
Abb. 2: Klassifizierung der unterschiedlichen GPCR-Zustände.....	8
Abb. 3: Signaltransduktion von Bittergeschmacksrezeptoren in Typ-II-Zellen	11
Abb. 4: Dendrogramm der humanen Bittergeschmacksrezeptoren mit ihren Schlüssel-Agonisten	14
Abb. 5: eng- und weitgefächerte Bittergeschmacksrezeptoren	15
Abb. 6: Nomenklatur für Steroide.....	20
Abb. 7: Klonierungskassette für Bittergeschmacksrezeptoren	24
Abb. 8: Klonierungsstrategie zur Generierung von Bittergeschmacksrezeptormutanten und -chimären	27
Abb. 9: GeneRuler™ DNA Ladder Mix Standard (links) und phiX174 DNA/BsuRI (HaeIII) Standard (rechts)	31
Abb. 10: IP ₃ -abhängige Signalkaskade und Grundprinzip der <i>Calcium-Imaging</i> -Analyse.....	38
Abb. 11: <i>In silico</i> 3D-Modell des hTAS2R10 (A) im Vergleich zur 3D-Struktur des Rinderrhodopsins (B)	47
Abb. 12: Potentielle Bindungstasche des hTAS2R10 im Kalottenmodell.....	48
Abb. 13: Positionen im 3D-hTAS2R10-Modell mit Möglichkeit zur Agonisten-Interaktion .	50
Abb. 14: Struktur der verwendeten Agonisten.....	51
Abb. 15: Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurve von hTAS2R10 gemessen mit Denatoniumsaccharinat und Natriumbenzoat	52
Abb. 16: Pharmakologische Charakterisierung der Alanin-Mutanten.....	55
Abb. 17 Immunzytochemische Charakterisierung der Alanin-Mutanten	56
Abb. 18: S85 ^{3.29} -Mutagenese	61
Abb. 19: Dosis-Wirkungs-Kurven der gemessen Parthenolid-Derivate und -Strukturanaloga	64
Abb. 20: <i>Docking</i> von Parthenolid in das hTAS2R10-3D-Modell	65
Abb. 21: Charakterisierung der K174 ^{5.39} A, Q175 ^{5.40} A und L178 ^{5.43} A-Mutanten.....	67
Abb. 22: K174 ^{5.39} -Mutagenese.....	69
Abb. 23: L178 ^{5.43} -Mutagenese	70
Abb. 24: Q175 ^{5.40} -Mutagenese.....	73
Abb. 25: Agonisten- <i>Docking</i> im hTAS2R10	76
Abb. 26: W88 ^{3.32} -Mutagenese.....	79

Abb. 27: Charakterisierung der hTAS2R10-Y239 ^{6.51} F-Mutante	81
Abb. 28: Dendrogramm der humanen Bittergeschmacksrezeptoren und des mTas2r105	82
Abb. 29: Reaktion des mTas2r105 auf Cycloheximid, Strychnin, Parthenolid und Denatoniumbenzoat.....	83
Abb. 30: Bittergeschmacksrezeptorchimären zwischen dem hTAS2R10 und mTas2r105	84
Abb. 31: Charakterisierung der hTAS2R10-mTas2r105-Chimären	86
Abb. 32: Überlagerung der mTas2r105- und hTAS2R10-3D-Homologiemodelle.....	88
Abb. 33: Pharmakologische Charakterisierung der hTAS2R10- und mTas2r105-Mutanten ..	91
Abb. 34: Immunzytochemische Charakterisierung der hTAS2R10- und mTas2r105-Konstrukte	92
Abb. 35: Charakterisierung der mTas2r105-M90 ^{3.33} V-H94 ^{3.37} Q-Y177 ^{5.40} Q-F265 ^{7.39} M-A268 ^{7.42} T Rezeptormutante.....	93
Abb. 36: Immunzytochemische Charakterisierung der Rezeptormutanten von Position 3.29 und 5.43	97
Abb. 37: Pharmakologische Charakterisierung der Rezeptormutanten von Position 3.29 und 5.43	98
Abb. 38: Austausch von M263 ^{7.39} und T266 ^{7.43} zu E ^{7.39} und A ^{7.42}	102
Abb. 39: Austausch von L178 ^{5.43} zu L178T ^{5.43}	104
Abb. 40: Vergleich der Alanin-Mutanten der Position 3.29 im hTAS2R10 und im hTAS2R46	108
Abb. 41: Bindungsstellen des Süßgeschmacksrezeptors TAS1R2 + TAS1R2	111
Abb. 42: Position K174 ^{5.39} in den unterschiedlichen hTAS2R10-3D-Modellen	116
Abb. 43: Position L178 ^{5.43} im hTAS2R10-3D-Modell	117
Abb. 44: Interaktion des hTAS2R46 mit Strychnin	126
Abb. 45: Interaktionsmöglichkeiten von Cycloheximid	129
Abb. 46: 2D Schlangenmodell des hTAS2R10.....	132
Abb. 47: <i>Alignment</i> der Transmembrandomänen des Rinderrhodopsin mit dem hTAS2R10155	
Abb. 48: <i>Alignment</i> der hTAS2R10-Sequenz mit der des β 2-adrenergen Rezeptors	156
Abb. 49: <i>Alignment</i> der hTAS2R10-Sequenz mit der des mTas2r105	156
Abb. 50: Multiples Sequenz- <i>Alignment</i> der Bittergeschmacksrezeptoren zur Bestimmung hochkonservierter Positionen nach Ballesteros und Weinstein.....	161

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht der verwendeten Geräte	20
Tab. 2: Übersicht der verwendeten Software	22
Tab. 3: Übersicht der verwendeten Haplotypen	23
Tab. 4: Übersicht der verwendeten Enzyme	25
Tab. 5: Aminosäurepositionen im Radius von 6 Å ausgehend von N92	49
Tab. 6: Zusammenstellung der gemessenen Schwellenwerte und berechneten EC ₅₀ -Werte und Expressionsrate für die Alanin-Rezeptor-Mutanten	54
Tab. 7: Pharmakologische Parameter und Expressionsrate der S85 ^{3.29} -Mutanten	60
Tab. 8: Auflistung der pharmakologischen Parameter der Parthenolid-Derivate und -strukturanaloga	63
Tab. 9: Pharmakologische Parameter und Expressionsrate der K174 ^{5.39} -, Q175 ^{5.40} - und L178 ^{5.43} -Mutanten	71
Tab. 10: Positionen im hTAS2R10-Agonisten- <i>Docking</i> -Modell in räumlicher Nähe zu den Agonisten	75
Tab. 11: Pharmakologische Parameter und Expressionsraten der W88 ^{3.32} - und Y239 ^{6.51} Konstrukte im Vergleich	78
Tab. 12: Pharmakologische Parameter und Expressionsraten der Rezeptorchimären	87
Tab. 13: Pharmakologische Parameter und Expressionsrate der hTAS2R10- und mTas2r105-Konstrukte	90
Tab. 14: Pharmakologische Parameter und Expressionsrate der Rezeptormutanten von Position 3.29 und 5.43	96
Tab. 15: Pharmakologische Parameter und Expressionsraten der hTAS2R10-M ^{7.29} E, -T266A ^{7.42} und -M263 ^{7.39} E-T266 ^{7.42} A-Rezeptormutanten	101
Tab. 16: Pharmakologische Parameter und Expressionsraten des hTAS2R10-L178 ^{5.43} T-Konstruktes	105
Tab. 17: Pharmakologische Parameter und Expressionsrate von hTAS2R46-Y85 ^{3.29} A	107
Tab. 18: Struktur der Geschmacksstoffe	152
Tab. 19: Oligonukleotid-Primer für die zielgerichtete, ortsspezifische Mutagenese	152
Tab. 20: Aminosäuren mit Einbuchstabencode	161

Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
ABNR	<i>adopted basis Newton-Raphson</i> (Algorithmus zur Energieminimierung)
abs.	absolut
AM	Acetoxy-Methylester-Gruppe
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
ASIC	<i>acid-sensing ion channel</i>
ATP	Adenosintriphosphat
B.und W.	Nomenklatur Ballesteros und Weinstein
β2ADR	β2-adrenerger Rezeptor
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	circa
Ca ²⁺	zweifach positiv geladene Calcium-Ionen
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCD	<i>Charge-coupled Device</i> (integriertes elektronisches Bauteil zum Transport elektrischer Ladungen)
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cfu	<i>colony-forming unit</i> (Koloniebildende Einheit)
CMV	Zytomegalie-Virus
CYX	Cycloheximid
DAG	Diacylglycerin
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
DHC	Dihydrocostunolid
DHM	Dehydromentholacton
DHP	Dihydroparthenolid
DIfE	Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke
D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTB	Denatoniumbenzoat
DTS	Denatoniumsaccharinat
E _λ	Extinktion
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EL	extrazelluläre Schleife
ENAC	epithelialer Natriumkanal (<i>epithelial sodium channel</i>)
Endkonz.	Endkonzentration
EPA	Epoxy-Parthenolid
Em	<i>Emission</i> / Aussendung
ER	endoplasmatisches Retikulum
Exc	<i>Excitation</i> / Anregung
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (Fetales Kälberserum)

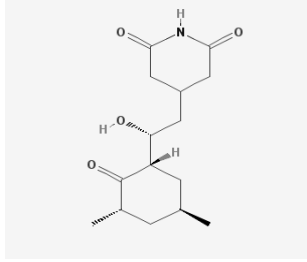
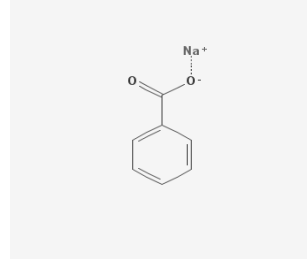
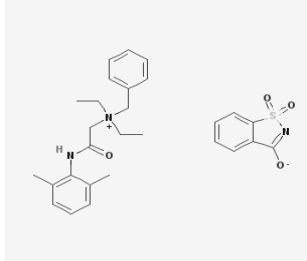
FLIPR	<i>Fluorometric Imaging Plate Reader</i>
FW	Vorwärts
g	die Konstante für die Schwerebeschleunigung der Erde
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
ggf.	gegebenenfalls
GLAST	<i>glutamate-aspartate transporter</i>
GlyR	Glycinrezeptor
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor (<i>G protein-coupled receptor</i>)
GRAFS	<i>glutamate-rhodopsin-adhesion-frizzled/taste2-secretin</i>
GRK	G-Protein-Rezeptor-Kinase
GTP	Guanosintriphosphat
GVL	Gamma-Valerolacton
HCN	<i>hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channel</i>
HEK	„ <i>Human Embryonic Kidney</i> “-Zellen
Hepes	(4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HSV	Herpes-Simplex-Virus
hTAS2R	humaner Typ-2-Geschmacksrezeptor (Bittergeschmacksrezeptor)
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IgG	Immunglobulin G
IKACH	<i>Inwardly rectifying potassium channel</i>
IL	intrazelluläre Schleifen
incl.	inklusive
IP ₃	Inositoltriphosphat
IP ₃ R	IP ₃ -Rezeptor
λ	Lambda / Wellenlänge
LB-Medium	<i>Lysogeny broth</i> -Medium
M	Molarität (Stoffmengenkonzentration mol/L)
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MFL	Menthofurolacton
mind.	mindestens
MW	Mittelwert
mTas2r	Maus Typ-2-Geschmacksrezeptor (Bittergeschmacksrezeptor)
NCAM	<i>neural cell adhesion molecule</i> (neuronales Zelladhäsionsmolekül)
Nr.	Nummer
n.s.a.	nicht signifikante Aktivierung
NTPDase	Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase
PAR	Parthenolid
PBS	<i>phosphate-buffered-saline</i> (Phosphatpuffer)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PDE	Phosphodiesterase
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Protein-Kinase A

PKC	Protein-Kinase C
PKD2L1	<i>Polycystic kidney disease 2-like 1 protein</i>
PKD1L3	<i>Polycystic kidney disease 1-like 3 protein</i>
PLC	Phosphoinositid-Phospholipase C
PLD	Parthenolid-Aldehyd
PS, PenStrep	Penicillin/Streptomycin
PTC	Phenylthiocarbamid
REEP	<i>receptor expression enhancer protein</i>
Rho	Kurzbezeichnung fotoaktiviertes Rinderrhodopsin
RLU	<i>Relative light units</i> (relative Lichteinheiten)
ROMK	Kaliumkanal des äußeren Nierenmarks (<i>Renal Outer Medullary Potassium (K) channel</i>)
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RTP	Rezeptor-Transport-Protein
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RV	Rückwärts
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i> (Eismeergarnelen-alkalische-Phosphatase)
SDB	Natriumbenzoat
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
s.o.	siehe oben
S.O.C.-Medium	Super Optimal broth with Catabolite repression
SSC	<i>solitary chemosensory cells</i>
SST	Somatostatin
Std. Abw.	Standardabweichung
STR	Strychnin
s. u.	siehe unten
SW	Schwellenwert
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TEL	Telekin
TM	Transmembrandomäne
TRP	<i>transient receptor potential</i>
TRPM5	<i>Transient receptor potential cation channel subfamily M member 5</i>
u.a.	unter anderem
U	<i>Unit</i>
UV	ultraviolettes Licht; Wellenlängen von 1 nm bis 380 nm
VDCC	spannungsabhängige Calciumkanäle (<i>Voltage-dependent calcium channels</i>)
VIS	Sichtbares Licht; Wellenlängen von 380 bis 780 nm
vol	Volumenanteile
vs.	<i>versus</i>
w/v	Masse/Volumen
w. z. B.	wie zum Beispiel
z. B.	zum Beispiel

Anhang

Tab. 18: Struktur der Geschmacksstoffe

Übersicht über die Struktur der in dieser Doktorarbeit verwendeten Geschmacksstoffe. Die Strukturformeln wurden pubchem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) entnommen¹⁾.

Geschmacksstoff	Struktur	Geschmacksstoff	Struktur
Cycloheximid ¹⁾		Natriumbenzoat ¹⁾	
Denatoniumsaccharinat ¹⁾			

Tab. 19: Oligonukleotid-Primer für die zielgerichtete, ortsspezifische Mutagenese

Übersicht über die verwendeten Mutations-, Chimären- und Vektor Primer inklusive der 5' – 3' Sequenz, der Schmelztemperatur T_M und der im Labor verwendeten Primerbezeichnung.

Mutante / Chimäre	Primerbezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Schmelztemperatur T_M / °C
hTAS2R10-S85A	FW_A83_R10	CTAATTGAATATATT GCT TACTTTTGGGTAATTG	55
	RV_A83_R10	CAATTACCCAAAAGTA AGC AATATATTCAATTAG	
hTAS2R10-S85C	S85CFW	GGTAACCTAATTGAATATATT IGT TACTTTTGGGTAATTGG	59
	S85CRV	CCAATTACCCAAAAGTA ACA AATATATTCAATTAGGTTACC	
hTAS2R10-S85T	S85TFW	GGTAACCTAATTGAATATATT ACT TACTTTTGGGTAATTGG	58
	S85TRV	CCAATTACCCAAAAGTA AGT AATATATTCAATTAGGTTACC	
hTAS2R10-S85V	S85VFW	GTAACCTAATTGAATATATT GTT TACTTTTGGGTAATTGG	58
	S85VRV	CCAATTACCCAAAAGTA AAC AATATATTCAATTAGGTTAC	
hTAS2R10-W88A	FW-1-A88	CTAATTGAATATATTAGTTACTTT GCG GTAATTGGTAATCAATCAAG	60
	RV-1-A88	CTTGATTGATTACCAATTAC CGC AAAGTAACTAATATATTCAATTAG	
hTAS2R10-W88F	W88FFW	GAATATATTAGTTACTTT TTC GTAATTGGTAATCAATCAAG	57
	W88FRV	CTTGATTGATTACCAATTAC GAA AAAGTAACTAATATATTC	
hTAS2R10-W88H	W88HFW	CCTAATTGAATATATTAGTTACTTT CAT GTAATTGGTAATCAATCAAG	59
	W88HRV	CTTGATTGATTACCAATTAC ATG AAAGTAACTAAT ATATTCAATTAGG	
hTAS2R10-	V89AFW	GAATATATTAGTTACTTTTGG GCA	62

V89A		ATTGGTAATCAATCAAGTATGTGG	
	V89ARV	CCACATACTTGATTGATTACCAAT TGC CCAAAAGTAACTAATATATTC	
hTAS2R10- N92A	FW-2-A92	GTTACTTTTGGGTAATTGGT GCT CAATCAAGTATGTGGTTTG	64
	RV-2-A92	CAAACCACATACTTGATTG AGC ACCAATTACCCAAAAGTAAC	
hTAS2R10- Q93A	FW-1-A93	GTTACTTTTGGGTAATTGGTAAT GCA TCAAGTATGTGGTTTGCCAC	66
	RV-1-A93	GTGGCAAACCACATACTTGA TGC ATTACCAATTACCCAAAAGTAAC	
hTAS2R10- Q93H	R10Q93HFW	GGGTAATTGGTAAT CAC TCAAGTATGTGGTTTG	60
	R10Q93HRV	CAAACCACATACTTGA GTG ATTACCAATTACCC	
hTAS2R10- K174A	K174AFW	GTATAAAAGTGAATACTTTATT GCA CAGATTTTGCTAAATCTGGGAG	62
	K174ARV	CTCCCAGATTTAGCAAAATCTG TGC AATAAAGTATTCACTTTATAC	
hTAS2R10- K174L	FWK174L	GTATAAAAGTGAATACTTTATT TTA CAGATTTTGCTAAATCTGGGAG	60
	RVK174L	CTCCCAGATTTAGCAAAATCTG TAA AATAAAGTATTCACTTTATAC	
hTAS2R10- Q175A	Q175AFW	GTATAAAAGTGAATACTTTATTTAAA GCG ATTTTGCTAAATCTGGGAGTC	62
	Q175ARV	GACTCCCAGATTTAGCAAAAT CGC TTTAATAAAGTATTCACTTTATAC	
hTAS2R10- Q175L	FWQ175L	GTATAAAAGTGAATACTTTATTTAAA TTG ATTTTGCTAAATCTGGGAGTC	60
	RVQ175L	GACTCCCAGATTTAGCAAAAT CAA TTTAATAAAGTATTCACTTTATAC	
hTAS2R10- Q175N	Q175NFW	GTATAAAAGTGAATACTTTATTTAAA AAT ATTTTGCTAAATCTGGGAGTC	59
	Q175NRV	GACTCCCAGATTTAGCAAAAT ATT TTTAATAAAGTATTCACTTTATAC	
hTAS2R10- Q175Y	H10Q175YFW	GTGAATACTTTATTTAAA TAC ATTTTGCTAAATCTGGGAGTC	59
	H10Q175YRV	GACTCCCAGATTTAGCAAAAT GTA TTTAATAAAGTATTCAC	
hTAS2R10- L178A	FWL178A	CTTTATTAACAGATTTTG GCA AATCTGGGAGTCATTTTC	61
	RVL178A	GAAAATGACTCCCAGATT TGC CAAAATCTGTTAATAAAG	
hTAS2R10- L178F	L178FFW	CTTTATTAACAGATTTTG TTT AATCTGGGAGTCATTTTCTC	59
	L178FRV	GAAGAAAATGACTCCCAGATT AAA CAAAATCTGTTAATAAAG	
hTAS2R10- L178T	R10L178TFW	CTTTATTAACAGATTTTG ACA AATCTGGGAGTCATTTTCTC	61
	R10L178TRV	GAAGAAAATGACTCCCAGATT TGT CAAAATCTGTTAATAAAG	
hTAS2R10- I183A	I183AFW	GCTAAATCTGGGAGTC GCT TTCTTCTTACACTATCCC	64
	I183ARV	GGGATAGTGTAAGAAGAA AGC GACTCCCAGATTTAGC	

hTAS2R10-F236A	F236AFW	GATATCTTTCATCATCCTC GCT ATCTTGATTTTATAGGC	60
	F236ARV	GCCTATAAAAATACAAGAT AGC GAGGATGATGAAAGATATC	
hTAS2R10-Y239A	FW-2-A239	CATCATCCTCTTTATCTTG GCT TTTATAGGCATGGCCATAG	64
	RV-2-A239	CTATGGCCATGCCTATAAA AGC CAAGATAAAGAGGATGATG	
hTAS2R10-Y239F	FWY239F	CATCCTCTTTATCTTG TTT TTTATAGGCATGGCCATAG	61
	RVY239F	CTATGGCCATGCCTATAAA AAA CAAGATAAAGAGGATG	
hTAS2R10-M263A	FW_A263_R10	CTTATGTTTGGGA GCG ACAACCACAG	59
	RV_A263_R10	CTGTGGTTGT CGC TCCAAACATAAG	
hTAS2R10M263E	R10M263EFW	CTT ATG TTT GGA GAG ACA ACC ACA GCC	60
	R10M263ERV	GGC TGT GGT TGT CTC TCC AAA CAT AAG	
hTAS2R10-M263E-T266A	FW_E263_A266_R10	GTTTGGGA GAG ACAACC GCA GCCATCTATC	63
	RV_E263_A266_R10	GATAGATGGC TGC GGTTGT CTC TCC AAAC	
hTAS2R10-T266A	T266A	GTTTGGGAATGACAACC GCA GCCATCTATCCCTG	66
	T266A	CAGGGATAGATGGC TGC GGTTGTCATTCCAAAC	
mTas2r105-S86A	R105S86AFW	CTGATTGAAATCATC GCT TATATATGGATGACTGTG	60
	R105S86ARV	CACAGTCATCCATATATA AGC GATGATTTCATCAG	
mTas2r105-S86T	R105S86TFW	GTCTGATTGAAATCATC ACT TATATATGGATGACTGTG	59
	R105S86TFW	CACAGTCATCCATATATA TGA GATGATTTCATCAGAC	
mTas2r105-H94Q	R105H94QFW	GATGACTGTGAAT CAA CTGACTGTCTGG	60
	R105H94QRV	CCAGACAGTCAG TIG ATTCACAGTCATC	
mTas2r105-Y177Q	M105Y177QFW	GGCAATTCACTATTAAC CAA GTTTTCCTCAATATTGG	61
	M105Y177QRV	CCAATATTGAGGAAAAC TIG GTTAATAGTGAATTGCC	
mTas2r105-L180A	R105L180AFW	CTATTAACTACGTTTC GCC AATATTGGAGTCATTTC	60
	R105L180ARV	GAAATGACTCCAATATT GGC GAAAACGTAGTTAATAG	
mTas2r105-F265M	R105F265MFW	GCTATTTATTTTTGGT ATG ACAACTGCATCCATATATC	59
	R105F265MRV	GATATATGGATGCAGTTGT CAT ACCAAAAATAAATAGC	
mTas2r105-A268T	R105A268TFW	CTATTTATTTTTGGTTTCACAAC ACA TCCATATATCCTTGCTG	61
	R105A268TRV	CAGCAAGGATATATGGA TGT AGTTGTGAAACCAAAAATAAATAG	
mTas2r105-M90V-H94Q	R105M90VH94QFW	CTCTTATATATGG GTG ACTGTGAAT CAA CTGAC	59
	R105M90VH94QRV	GTCAG TIG ATTCACAGT CAC CCATATATAAGAG	
mTas2r105-F265M-A268T	R105F265MA268TFW	G CTA TTT ATT TTT GGT ATG ACA ACT ACA TCC ATA TAT CCT TGC	61
	R105F265MA268TRV	GCA AGG ATA TAT GGA TGT AGT TGT CAT ACC AAA AAT AAA TAG C	
R10-R105-CH1.1	CH1.1R10RV	GAAGATGCTTAGGCTGGT GGCAAACCAT ACTTG	66
	CH1.1R105FW	CAAGTATGTGGTTTGCC ACCAGCCTAAGCATCTTC	
R10-R105-	CH1.2R10RV	CATCTGCCTGCTGTGTCTCCA AAGGGAAATGAT	66

CH1.2		TAAAAAATACATG	
	CH1.2R105F W	CATGTATTTTTTAATCATTTCCTT <u>TGGAGA</u> <u>CACAGCAGGCAGATG</u>	
R105-R10- CH2.1	CH2.1R105R V	GAAATAGAAGATGCTGAGGCTGGT <u>GGCAAACCA</u> <u>GACAGTCAG</u>	69
	CH2.1R10FW	<u>CTGACTGTCTGGTTTGCC</u> ACCAGCCTCAGCATC TTCTATTC	
R105-R10- CH2.2	CH2.2R105R V	CATCTGCCTGTTGTGTCTCCA <u>AAGTGACATAAT</u> <u>TAACAAGAAACATG</u>	66
	CH2.2R10FW	<u>CATGTTTCTTGTTAATTATGTC</u> ACTT TGGAGACACAACAGGCAGATG	
R105-R10- R105 CH3	CH3R10CFW	<u>GACTGTGTATTICTCTGGTTG</u> AAGAGCAGAACA AATATGGTTCTTC	65
	CH3R105wRV	GAAGAACCATATTTGTTCTGCTCTT <u>CAACCAGAGAAATACACAGTC</u>	
R10-R105-R10- CH4	CH4R105cFW	CCAATAACATATTTCTCTGGTTG <u>AAGAGGAGAACTGATAAAGCTTTTG</u>	65
	CH4R10wRV	<u>CAAAAGCTTTATCAGTTCTCCTCTT</u> CAACCAGAGAAATATGTAGTTGG	
Vektor Primer	CMVfor	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	64
	pCR3.1-BGHrev	TAGAAGGCACAGTCGAGG	53

TM1:**Rho:** PWQFSMLAAYMFLLIMLGFPINFLTLYVTVQ**R10:** EGIFFIFVVVSESVFGVVGNGFIGLVNCIDCA**TM2****Rho:** PLNYILLNLAVADLFMVFGGFTTTLYTS**R10:** TIGFILTGLAISRIFLIWIITDGFIQI**TM3****Rho:** PTGCNLEGGFFATLGGEIALWSLVVLAIERYV**R10:** GNLI EYISYFWVIGNQSSMWFATSLSIFYFL**TM4****Rho:** AIMGVAF TWVMALACAAPPLV**R10:** TNMVLPMIVFLLISSLLNFA**TM5****Rho:** NESFVIYMFVVHFIIPLIVIFFCYG**R10:** YFIKQILLNLGVIFFFTLSLITCIF**TM6****Rho:** AEKEVTRMVIIMVIAFLICWLPYAGVAFYIFT**R10:** SNTEAHVKAMKVLISFIILFIFYFIGMAIEIS**TM7****Rho:** IPAFFAKTSAVYNPVIYIMMKNQFRNCMVTTL**R10:** FGMTTTAYIPWGHSEFILILGNSKLRVLSLRVL**Abb. 47: Alignment der Transmembrandomänen des Rinderrhodopsin mit dem hTAS2R10**

Die Transmembrandomänen (TM) des Rinderrhodopsins (Rho) wurden mit der Aminosäuresequenz des hTAS2R10 (R10) abgeglichen (mittels Vector NTI (Invitrogen)) und das *Alignment* so angepasst, das sich in den potentiellen TMs des R10 keine Lücke ergibt. Ähnliche Aminosäuren sind grün und gleiche Aminosäuren sind rot dargestellt.



Abb. 48: Alignment der hTAS2R10-Sequenz mit der des β 2-adrenergen Rezeptors

Das *Alignment* wurde von Anat Levit zur Verfügung gestellt. Es wurde mittels SwissPDB erstellt und anschließend angepasst. In dem *Alignment* sind die TMs als rote und blaue (basierend auf (Rasmussen *et al.* 2011)) Markierungen dargestellt. Identische Aminosäuren sind rot, ähnliche blau markiert. Die höchst konservierten Aminosäuren sind entsprechend der Ballesteros und Weinstein Nomenklatur als X.50 dargestellt.

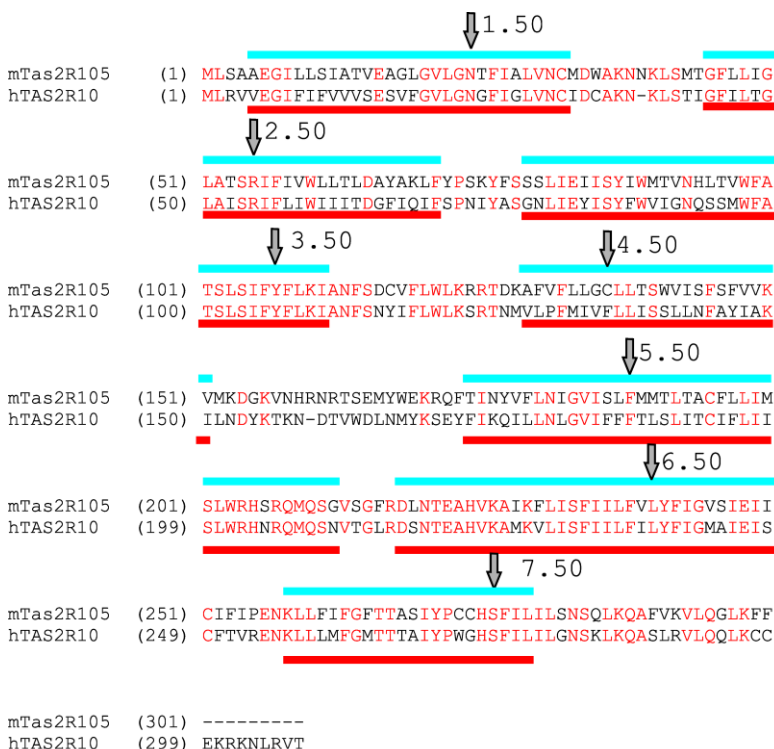


Abb. 49: Alignment der hTAS2R10-Sequenz mit der des mTas2r105

Das *Alignment* wurde mittels Vector NTI (Invitrogen) erstellt. In dem *Alignment* sind die TMs als rote und blaue Markierungen dargestellt. Identische Aminosäuren sind rot markiert. Die höchst konservierten Aminosäuren sind entsprechend der Ballesteros und Weinstein Nomenklatur als X.50 dargestellt.


```

hTAS2R1      1  -----MLES-----
hTAS2R3      1  -----MMGLT-----
hTAS2R4      1  -----MLRLF-----
hTAS2R5      1  -----MLS-----
hTAS2R7      1  -----MADKV-----
hTAS2R8      1  -----MFSPA-----
hTAS2R9      1  -----MPSAI-----
hTAS2R10     1  -----MLRVV-----
hTAS2R13     1  -----MESAL-----
hTAS2R14     1  -----MGGVI-----
hTAS2R16     1  -----MIPIQ-----
hTAS2R38     1  -----MLTLTRIRT-----
hTAS2R39     1  -----MLGRCFPPDTKEKQQLRMTKL
hTAS2R40     1  -----MATVNTD-----
hTAS2R41     1  -----MQAAL-----
hTAS2R43     1  -----MITFL-----
hTAS2R44     1  -----MTTFI-----
hTAS2R45     1  -----MITFL-----
hTAS2R46     1  -----MITFL-----
hTAS2R47     1  -----MITFL-----
hTAS2R48     1  -----MCCFL-----
hTAS2R49     1  -----MMSFL-----
hTAS2R50     1  -----MITFL-----
hTAS2R55     1  -----MATEL-----
hTAS2R56     1  -----MNGDHMVLGS-----S-
B2ADR        1  DYKDDDA-MGQPGNGSAFLLAPNRSHPDHDVTQQRDEVVVVGMG-----
bRho         1  -----XMNGTEGPNFYVFPFSNKTGVV
B1ADR        1  -----MGAELLSQ-----
A2ADR        1  DYKDDDDAMGQ-----PVGAPP--IMGSSVY-----

```

1.50

```

hTAS2R1      6  -----LII-YFLLA-VIQFLLGIFTN--GIIVVVNGIDLKHKRMAPLDLLL
hTAS2R3      6  -----EGV-FLILS-GTQFTLGILVN--CFIELVNGSSWFKTKRMSLSDFI
hTAS2R4      6  -----YFS-AIIAS-VILNFVGIIMN--LFI TVVNCCTWVKSHRISSSDRIL
hTAS2R5      4  -----AGLGL-LMLVA-VVEFLIGLIGN--GSLVWVSFRWIRKFNWSSYNLII
hTAS2R7      6  -----QTT-LLFLA-VGEFVVGILGN--AFIGLVN CMDVVKRRIASIDLIL
hTAS2R8      6  -----DNI-FIILI-TGEFILGILGN--GYIALVNWIDWIKKKKISTVDYIL
hTAS2R9      6  -----EAI-YIILI-AGELTIGIWGN--GFIVLVNCIDWLKRRDISLIDIIL
hTAS2R10     6  -----EGI-FIFVV-VSESVFVGLGN--GFIGLVNCIDCAK-NKLSTIGFIL
hTAS2R13     6  -----PSI-FTLVI-IAEFIIIGNLSN--GFIVLINCIDWVSKRELSVVDKLL
hTAS2R14     6  -----KSI-FTFVL-IVEFIIIGNLGN--SFIALVNCIDWVKGRKISSVDRIL
hTAS2R16     6  -----LTVFMIYIY-VLESITIVQS--SLIVAVLGREWLQVRRIMPVDMIL
hTAS2R38     10 -----V-SYEVRS-TFLFIS-VLEFAVGFLTN--AFVFLVNFWDVVKRQALSNSDCVL
hTAS2R39     22 -----CDPAESEL-SPFLITL-ILAVL-LAEYLLIGIAN--GFIMAIHAAEWVQNKAVSTSGRIL
hTAS2R40     8  -----ATDK-D-ISKFKVT-FTLVVSGIECITGILGS--GFTAIYGAEWARGKTLPTGDRIM
hTAS2R41     6  -----TAF-FVLLF-SLLSLLGIAAN--GFIVLV LGREWLR YGRLLPLDMIL
hTAS2R43     6  -----PII-FSSLV-VTFVIGNFAN--GFIALVNSIESFKRQKISFADQIL
hTAS2R44     6  -----PII-FSSVV-VLVFVIGNFAN--GFIALVNSIERVKRQKISFADQIL
hTAS2R45     6  -----PII-FSILV-VTFVIGNFAN--GFIALVNSTEWVKRQKISFADQIV
hTAS2R46     6  -----PII-FSILI-VTFVIGNFAN--GFIALVNSIEWFKRQKISFADQIL
hTAS2R47     6  -----PII-FSILI-VVIFVIGNFAN--GFIALVNSIEWVKRQKISFVDQIL
hTAS2R48     6  -----LII-SSILV-VFAFVLGNVAN--GFIALVNVIDWVNTRKSIAEQIL
hTAS2R49     6  -----HIV-FSILV-VVAFILGNFAN--GFIALINFIAWVKRQKISSADQII
hTAS2R50     6  -----YIF-FSILI-MVLFVLGNFAN--GFIALVNFIDWVKRKKISSADQIL
hTAS2R55     6  -----DKI-FLILA-IAEFIISMLGN--VFIGLVNCSGEIKNQVFSADFIL
hTAS2R56     12 -----V-TDK-KAIIILVTIL-LLRLVVAIAGN--GFI TAALGVEWVLRRLMLPCDKLL
B2ADR        45 -----I-VM-SLI-VLAIVFG--VL--VITAI AKFER-LQTVTNYFI
bRho         22 -----RSPFEAPQYYLAEPWQ-FSMLA-AYMFL LIMLGFPI--FLTLYVTV--QHKKLRTP LNYIIL
B1ADR        9  -----Q-WEAGMS-LLMALV-VLLIVAG--VL--VIAAIGSTQR-LQTLTNLFI
A2ADR        25 -----I-TVELAI-AVLAILG--VL--VCWAVWLNSNLQNVNTNYFV

```

2.50

```

hTAS2R1      49  SCL-----AVSRIFLQLFIFYVN--VIVIFFI-E---FIMCSANCAILLFINELE
hTAS2R3      49  TTL-----ALLRIILLCIILTDS--FLIEFSP-NTHDSGIIMQIIDVSWFTTNHLS
hTAS2R4      49  FSL-----GITRIFMLGLFLVNT--IYFVSSN-TER-SVYLSAFFVLCFMFLDSSS
hTAS2R5      49  LGL-----AGCRFLQWLIILDL--S---LFP-L-FQSSRWLRYSIFWVLSQAS
hTAS2R7      49  TSL-----AISRICLLCVILLDC--FIIVLVLP-DVYATGKEMRIIDFFWTLTNHLS
hTAS2R8      49  TNL-----VIARICLISVMVNG--IVIVLNP-DVYTKNKQQIVFTFWTFANYLN
hTAS2R9      49  ISL-----AISRICLCVISLDG--FFMLLFP-GTYGNSVLSIVNVWTFANNSS
hTAS2R10     48  TGL-----AISRIFLIWIIITDG--FIQIFSP-NIYASGNLIEYISYFVWVIGNQSS
hTAS2R13     49  IIL-----AISRIGLIWEILVSW--FLALHYL-AIFVSGTGLRIMIFSWIVSNHFN

```

```

hTAS2R14      49  TAL-----AISRISLVWLI FGSW--CVSVFFP-ALFATEKMFRLMTNIVTVINHFS
hTAS2R16      50  ISL-----GISRFCLQWASMLNN--FCSYFNL-NY-----VLCNLTITWEFFNILT
hTAS2R38      58  LCL-----SISRFLFHGLLFLSA--IQLTHFQKLEPLNHSYQAIIMLWMIANQAN
hTAS2R39      77  VFL-----SVSRIALQSLMMLEI--TISSTSL-SFYSEDAVYAFKISIFLNFCS
hTAS2R40      61  LML-----SFSRLLQLIWMLEN--IFSLLFR-IVYNQNSVYILFKVITVFLNHSN
hTAS2R41      49  ISL-----GASRFCLQLVGTVHN--FYSAQK-VEYSGGLGRQFFHLHWHFLNSAT
hTAS2R43      49  TAL-----AVSRVGLLWVLLLNW--YSTVLNP-AFNSV-EVRTTAYNIWAVINHFS
hTAS2R44      49  TAL-----AVSRVGLLWVLLLNW--YSTVFNP-AFYSV-EVRTTAYNVWAVTGHFS
hTAS2R45      49  TAL-----AVSRVGLLWVLLLNW--YSTVLNP-AFCVS-ELRRTAYNIWAVTGHFS
hTAS2R46      49  TAL-----AVSRVGLLWVLLLNW--YATELNP-AFNSI-EVRTTAYNVWAVINHFS
hTAS2R47      49  TAL-----AVSRVGLLWVLLLHW--YATQLNP-AFYSV-EVRTTAYNVWAVTNHFS
hTAS2R48      49  TAL-----VVSRIGLLWVMLFLW--YATVFNS-ALYGL-EVRIVASNAWAVTNHFS
hTAS2R49      49  AAL-----AVSRVGLLWVILLHW--YSTVLNP-TSSNL-KVIFISNAWAVTNHFS
hTAS2R50      49  TAL-----AVSRIGLLWALLLNW--YLTVLNP-AFYSV-ELRITSYNWVVTNHFS
hTAS2R55      49  TCL-----AISTIGQLLVILFDS--FLVGLAS-HLYTTRYLGKTVIMLWHMTNHLT
hTAS2R56      60  VSL-----GASRFCLQSVVMGKT--IYVFLHP-MAFPYNPVLQFLAFQWDFLNAAT
B2ADR         80  TSLACADLVMGALVVPFGAAHILMKMW--TFGNFCE-----FWTSDIV--
bRho          78  LNL-----AVADLFMVFGGFTTT--LYTSLHG-YFVFGPTGCNLEGFFATLGGEIA
B1ADR         51  TSLACADLVVGLLVVPFGATLVVVGTTW--LWGSFLCE-----LWTSLDV--
A2ADR         61  VSL-----AAADIAVGVLA-IPFAITISTGFCA---AC-HGCL----FIACFVL--

```

```

                                3.50                                4.50
                                ↓                                ↓
hTAS2R1      93  LWLATWLGVFYCAKV-----AS-VRHPLFIWLKMRISK-LVPWMILGSLLYVSMI--
hTAS2R3      97  IWLATCLGLVLYCLKI-----AS-FSHPTFLWLKWRVSR-VMVWMLLGLALLSCGS--
hTAS2R4      96  VWFVTLNLNLYCVKI-----TN-FQHSVFLLLKRNISP-KIPRLLACVLISAFT--
hTAS2R5      93  LWFATFLSVFYCKKI-----TT-FDRPAYLWLKQRAYN-LSLWCLLGYFIINLLL--
hTAS2R7      97  IWFATCLSIYFFKI-----GN-FHPLFLWMKWRIDR-VISWILLGCVVLSVFI--
hTAS2R8      97  MWITTCNLNVFYFLKI-----AS-SSHPLFLWLKWKIDM-VVHWILLGCF AISLLV--
hTAS2R9      97  LWFTSCLSIYLLKI-----AN-ISHPPFWLKLKINXK-VLRLAILLGSLFLSLII--
hTAS2R10     96  MWFATSLSIFYFLKI-----AN-FSNYIFLWLKSRNTM-VLPFMIVFLL-ISSLL--
hTAS2R13     97  LWLATIFSIFYLLKI-----AS-FSSPAFLYLKWRVVK-VILMILLGTLVFLFL---
hTAS2R14     97  VWLATGLGTFYFLKI-----AN-FSNSIFLYLKWVVK-VVLVLLLVTSVFLFL---
hTAS2R16     93  FWLNSLLTVFYCIKV-----SS-FTHHIFLWLRWRI LR-LFPWILLGSLMITCVT--
hTAS2R38     107  LWLAACL SLLYCSKL-----IR-FSHTFLCLASWVSR-KISQMLLGIILCSCIC--
hTAS2R39     125  LWFAAWLSFFYFVKI-----AN-FSYPLFLKLRWRTG-LIPWLLWLSVFISFSH--
hTAS2R40     109  LWFAAWLKVFYCLRI-----AN-FNHPLFLMKRKIIV-LMPWLLRLSVLVSLSF--
hTAS2R41     97  FWFCWSLSVLPVKI-----AN-ITHSTFLWLKWRFLG-WVPWLLGSLVLSIFII--
hTAS2R43     96  NWLATLSIFYLLKI-----AN-FSNFI FLHLKRRVKS-VILVLLGPLLFLAC---
hTAS2R44     96  NWLATLSIFYLLKI-----AN-FSNLI FLHLKRRVKS-VILVLLGPLLFLAC---
hTAS2R45     96  NWPATLSIFYLLKI-----AN-FSNLI FLRLKRRVKS-VILVLLGPLLFLAC---
hTAS2R46     96  NWLATLSIFYLLKI-----AN-FSNLI FLHLKRRVKS-VVLVLLGPLLFLVC---
hTAS2R47     96  SWLATLSMFYLLRI-----AN-FSNLI FLRIKRRVKS-VVLVLLGPLLFLVC---
hTAS2R48     96  MWLAASLSIFCLLKI-----AN-FSNLI SLHLKRRVKS-VVLVLLGPLVFLIC---
hTAS2R49     96  IWLATLSIFYLLKI-----VN-FSRLIFHLLKRRKKS-VVLVLLGSLFLVLC---
hTAS2R50     96  MWLAANLSIFYLLKI-----AN-FSNLL FLHLKRRVRS-VILVLLGTLIFLVC---
hTAS2R55     97  TWLATLSIFYFFKI-----AH-FPHSLFLWLRWRMNG-MIVMLLILSLFLIFD--
hTAS2R56     108  LWSSTWLSVYFVKI-----AT-FTHPVFWLKHKLKSG-WLPWMLFSSVGLSSFT--
B2ADR         122  --LCVTASIE TLCVIAVDRIYFAITS-PFKYQSLTKNKA--RVIILMVIVS-GLT---
bRho          126  LWSLVVLAIERVYVV-----CKPMSNFRFG-ENHAIMGVAFTVMALACAAPLVGW
B1ADR         93  --LCVTASIE TLCVIAIDRYLAITS-PFRYQSLMTRARA--KVICTVWVWIS-ALV---
A2ADR         101  --VLTQSSIFSLAIAIDRYIAIRI-PLRYNGLVGTGRA--KGI IACVWLS-FAI---

```

```

hTAS2R1      141  -CVFHSK--YAGFMVPYF-L--RKFFSQNATI Q-K--EDT-----LAIQI-F-SF----
hTAS2R3      145  -TASLIN--EFKL-YSVF-R--GIEATRNVTEH-FRKKRS----EYLI-H--VLG----
hTAS2R4      144  -TCLYIT-LSQASPF-PE----LVTRNNTSF---NISEG-----ILS---LVVSL----
hTAS2R5      141  -TVQIGL-T---F-----YHPPQGNSSIR-YPFESW---QYL--Y--AFQL----
hTAS2R7      145  -SLPATE--NLNADFRFC-V--KAKRKTNLTWS-CRVNKT---QHAST-K--LFL----
hTAS2R8      145  -SLIAAI--VLSCDYRFH-A--IAKHKRNI TEM-FHVSKI---PYF--E-PLTLF----
hTAS2R9      145  -SVPKND--DMW--YHLF---KVSHEENITWK-FKVSKI---PGTFK-Q--LTL----
hTAS2R10     143  -NFAYIA--KI-----L-N--DYKMKNDTVWD-LNMYKS----EYFIK-Q--ILL----
hTAS2R13     144  -NLIQI---N--MHIKDW----LDRYERN TWN-FSMSDF---ETFSV-SVKFTM----
hTAS2R14     144  -NIALI---N--IHINAS---INGYRRNKTCs-SDSSNF---TRFSS-LIVLTS----
hTAS2R16     141  -IIPSAI-GNYIQIQLLT---MEHLPRNSTVT-DKLENF---HQY---QFQAH----
hTAS2R38     155  -TVLCVWCFFSRPHFTVT-T--VLFMNNNTRLN-WQIKDL---NLFYS-F--LFC----
hTAS2R39     173  -SMFC-I-NICTVYCNNS---FPIHSSNSTKK-TYLSI---NVV--G-LAFFF----
hTAS2R40     157  -SFPLSR-DVFNVYVNSS---IIPSSNSTEK-KYFSET---NMV--N-LVFFY----
hTAS2R41     145  -TLFFFW-VNYPVQEFL---IRKFSGNMTYK-WNTRIE---TYFF--PSLKL----
hTAS2R43     143  -HLFVI---N--MNEIVR---TKEFEGNMTWK-IKLKSA---MYFSN-M--TVT----
hTAS2R44     143  -QLFVI---N--MKEIVR---TKEYEGNMTWK-IKLKSA---VYLSA-A--TVT----
hTAS2R45     143  -HLFVV---N--MNQIVW---TKEYEGNMTWK-IKLKSA---MYLSA-T--TVT----

```

hTAS2R46	143	-HLFVI---N--MNQIIW----TKEYEGNMTWK-IKLRSA----MYLSN-T--TVT----
hTAS2R47	143	-HLFVI---N--MDET VW----TKEYEGNVTWK-IKLRSA----MYHSN-M--TLT----
hTAS2R48	143	-NLAVI---T--MDEVW----TKEYEGNVTWK-IKLRNA----IHLSS-L--TVT----
hTAS2R49	143	-HLVMK---H--TYINWV----TEECEGNVTWK-IKLRNA----MHLSS-L--TVA----
hTAS2R50	143	-HLLVA---N--MDESMW----AEEYEGNMTGK-MKLRNT----VHLSY-L--TVT----
hTAS2R55	145	-SLVLEI--FID--ISLN-----IIDKSNLTLY-LDESKT----LYDKLSILKTLL----
hTAS2R56	156	-TILFFI-GNHRMYQNYL-R--NHLQPWNVTGD-SIRSYC----EKFY---LFPLK----
B2ADR	172	-SFLPIQM-----HWY-R--A-THQEA INCY-AEETCC----DFFTN-Q--AYAIASS
bRho	177	SRYPEG-MQCSCGIDYY---TPHE-----ET---NNE--SFVIYMF----
B1ADR	143	-SFLPIMM-----HWW-R--D-EDPQAL KCY-QDPGCC----DFVTN-R--AYAIASS
A2ADR	151	-GL-TPML-----GWNNGQP-KEGKNHSQGC GEGQVACLFE DVVPM-N--YMVYFNF

5.50

hTAS2R1	180	VAEFSVPELLIFLFAVLLLI FSLGRHT-----
hTAS2R3	186	TLWYLPPLIVSLASYSLLI FSLGRHT-----
hTAS2R4	182	VLSSSLQFIINVTASLLI HSLRRHI-----
hTAS2R5	174	NSGSYLPVVFVSSGMLI VSLYTHH-----
hTAS2R7	187	NLATLLPFCVCLMSFFLLI LSLRRHI-----
hTAS2R8	187	NLFAIVPFIVSLISFFLLV RSLWRHT-----
hTAS2R9	184	NLGVMPFIFLCLISFFLLI FSLVRHT-----
hTAS2R10	179	NLGVIFPFLLSLITCIFI LSLWRHN-----
hTAS2R13	184	TMFSLTPFTVAFISFLLI FSLQKHL-----
hTAS2R14	184	TVFIFPFLLSLAMFLLI FSMWKHR-----
hTAS2R16	182	TVALVIPFILFLASTIFL MASLTK-----
hTAS2R38	199	YLWSVPPFLLFLVSSGML TVSLGRHM-----
hTAS2R39	214	NLGIPTPLIMFILTATLLI LSLKRHT-----
hTAS2R40	199	NMGIFVPLIMFILAATLLI LSLKRHT-----
hTAS2R41	187	V-IWSIPFSVFLVSIMLLI NLSLRHT-----
hTAS2R43	181	MVANLVPFLLTLLSFMLLI CSLCKHL-----
hTAS2R44	181	TLGNLVPFLLTLLCFLLLI CSLCKHL-----
hTAS2R45	181	MLANLVPFVTLTLLSFLLL VCSLCKHL-----
hTAS2R46	181	ILANLVPFLLTLLSFLLLI CSLCKHL-----
hTAS2R47	181	MLANFVPLTLLTLLSFLLLI CSLCKHL-----
hTAS2R48	181	TLANLIPFLLTLLSFLLLI CSLCKHL-----
hTAS2R49	181	MLANLIPFLLTLLSFLLLI YSLCKHL-----
hTAS2R50	181	TLWSFIPFLLTLLSFLMLI CSLYKHL-----
hTAS2R55	186	SLTSFIPFSLFLLTSLFL FLSLVRHT-----
hTAS2R56	199	MITWTMPTAVFFICMILLI TSLGRHR-----
B2ADR	212	IVSFYVPLVIMV FVYSRVFQEAKRQLNIFEMLRIDEGLRLKIYKDTEGYTIGI GHL LTK
bRho	210	VVHFIIPLIVIFFCYGQLV FTVKEAA-----
B1ADR	183	IISFYIPLLLIMI FVALRVYREAKEQI-----
A2ADR	198	FACVLVPELLMLGVYLRIFLAARQLNIFEMLRIDEGLRLKIYKDTEGYTIGI GHL LTK

hTAS2R1	206	-----
hTAS2R3	212	-----
hTAS2R4	208	-----
hTAS2R5	200	-----
hTAS2R7	213	-----
hTAS2R8	213	-----
hTAS2R9	210	-----
hTAS2R10	205	-----
hTAS2R13	210	-----
hTAS2R14	210	-----
hTAS2R16	206	-----
hTAS2R38	225	-----
hTAS2R39	240	-----
hTAS2R40	225	-----
hTAS2R41	212	-----
hTAS2R43	207	-----
hTAS2R44	207	-----
hTAS2R45	207	-----
hTAS2R46	207	-----
hTAS2R47	207	-----
hTAS2R48	207	-----
hTAS2R49	207	-----
hTAS2R50	207	-----
hTAS2R55	212	-----
hTAS2R56	225	-----
B2ADR	272	SPSLNAAKSELDKAIGRNTNGVITKDEAEKLFNQDVDAAVRGILRNAKLKPVYDSLDAVR
bRho	236	-----

B1ADR	209	-----
A2ADR	258	SPSLNAAKSELDKAIGRNTNGVITKDEAEKLFNQDVDAAVRGILRNAKLKPVYDSLDAVR
hTAS2R1	206	-----RQM ^R RNTVA
hTAS2R3	212	-----RQMLQNGT
hTAS2R4	208	-----QKM ^R QKNAT
hTAS2R5	200	-----KKMKVHSA
hTAS2R7	213	-----RRMQLSAT
hTAS2R8	213	-----KQIKLYAT
hTAS2R9	210	-----KQIRLHAT
hTAS2R10	205	-----RQM ^R QSNVT
hTAS2R13	210	-----QKM ^R QLNYK
hTAS2R14	210	-----KKMQHTVK
hTAS2R16	206	-----QIQHHST
hTAS2R38	225	-----RTMKVYTR
hTAS2R39	240	-----LHMGSNAT
hTAS2R40	225	-----LHMGSNAT
hTAS2R41	212	-----QRMQHNGH
hTAS2R43	207	-----KKMQLRGK
hTAS2R44	207	-----KKMQLHGK
hTAS2R45	207	-----KKMQLHGK
hTAS2R46	207	-----KKMQLHGK
hTAS2R47	207	-----KKMQLHGK
hTAS2R48	207	-----KKMLHSG
hTAS2R49	207	-----KKMQLHGK
hTAS2R50	207	-----KKMQLHGE
hTAS2R55	212	-----RNLKLSL
hTAS2R56	225	-----KKALLTTS
B2ADR	332	RAALINMVFQMGETGVAGFTNSLRMLQQKRWDEAAVNLA ^R KSRWYNQTPNRAKRVITTFRT
bRho	236	-----AQQQESAT
B1ADR	209	-----RKIDRASK
A2ADR	318	RAALINMVFQMGETGVAGFTNSLRMLQQKRWDEAAVNLA ^R KSRWYNQTPNRAKRVITTFRT

6.50

		↓
hTAS2R1	214	GSRVP---GRGAPISALLSILSFLILYFS---HCKIKVFL-SSLKFHIR--RFIFLFFI
hTAS2R3	220	SSRDP---TTEAHKRAIRIILSFFFLFL---YFLAFLIASFGNFKPT--KMAKMIGE
hTAS2R4	216	GFWNP---QTEAHVGAMKLMVYFLILYIP---YSVATLVQYLPFYAGMD--MGTKSICL
hTAS2R5	208	GRRDV---RAKAHITALKSLGCFLLHLV---YIMASPF ^S ITSKTYPPD--LTSVFIWE
hTAS2R7	221	GCRDP---STEAHVRALKAVISFLLLFIA---YLSFLIATSSYFMPET--ELAVIFGE
hTAS2R8	221	GSRDP---STEVHVRAIKTMSFIFFFFL---YYISSILMTFSYLMTKY--KLAVEFGE
hTAS2R9	218	GFRDP---STEAHMRAIKAVIIFLLLLIV---YYPVFLVMTSSALIPQG--KLVLMIGD
hTAS2R10	213	GLRDS---NTEAHVKAMKVLISFIIILFIL---YFIGMAIEISCFTVREN--KLLLMFGM
hTAS2R13	218	GHRDP---RTKVHTNALKIVISFLLFYAS---FFLCVLI ^S SWIS-ELYQN--TVIYMLCE
hTAS2R14	218	ISGDA---STKAH-RGVKSVITFFLLYAI---FSLSFFISVWTSERLEE--N-LIILSQ
hTAS2R16	213	GHCNP---SMKARFTALRSLAVLIVFTS---YFLTILLITIIGTLFD-K--RCWLWVWE
hTAS2R38	233	NSRDP---SLEAHIKALKSLVSFFCFVFI---SSCAAFISVPLILLWRD--KIGVMVCV
hTAS2R39	248	GSNDP---SMEAHMGAIKAI ^S YFLILYIF---NAVALFIYLSNM-FDIN--SLWNNLCQ
hTAS2R40	233	GSRDP---SMKAHIGAIKATS ^S YFLILYIF---NAIALFLSTSNI-FDTY--SSWNILCK
hTAS2R41	220	SLQDP---STQAHTRALKSLISFLILYAL---SFLSLIIDAAKFISMQN--DFY-WPWQ
hTAS2R43	215	GSQDP---STKVHIKALQTVISFLLLCAI---YFLS ^I MSVWSFGSLEN--KPVFMFCK
hTAS2R44	215	GSQDP---STKVHIKALQTVIFFLLCAV---YFLS ^I MSVWSFGSLEN--KPVFMFCK
hTAS2R45	215	GSQDP---STKVHIKVLQTVISFFLLRAI---YFVSVIISVWSFKNLEN--KPVFMFCQ
hTAS2R46	215	GSQDP---SMKVHIKALQTVTSFLLLCAI---YFLS ^I MSVWSFESLEN--KPVFMFCE
hTAS2R47	215	GSQDP---STKVHIKALQTVTSFLLLCAI---YFLSMIISVCNLRLEK--QPVFMFCQ
hTAS2R48	215	GSQDP---STKVHIKALQTVTSFLLMLFAI---YFLCIIITWNLR ^T QQS--KLVLLL ^C Q
hTAS2R49	215	GSQDP---STKIH ^I KALQTVTSFLLLLAI---YFLCLII ^S FWNFKMRPK--EIVLMLCQ
hTAS2R50	215	GSQDL---STKVHIKALQTLISFLLLCAI---FFLFLIVSVWSPRRLRN--DPVVMVSK
hTAS2R55	220	GSRDS---STEAHRRAMK ^M VMSF ^L FLFIV---HFFSLQVANGIFFMLWN--NKYIKFVM
hTAS2R56	233	GFREP---SVQAHIKALLALLSFAMLFIS---YFLSLVFS ^A AGIFPPL--DFKFWVWE
B2ADR	392	GTWDAYKFKLKE-HKALKTLGIIMGTFTLCWL ^E FFIVNIVHVIQDNLIR---KEYVILLN
bRho	244	-TQKA---EKEVTRMVIIMVIAFLICWL ^E ---YA-GVAFYIFTHQGSDF--GPIFMTIP
B1ADR	217	RKRVM---LMRE-HKALKTLGIIMGVFTLCWL ^E FFLVNIVNVFNRLVLP---DWL ^F VAFN
A2ADR	378	GTWDAYRSTLQKEVHAAKSLAIIIVGLFALCWL ^E LH---INCFTFFCPDCSHAPLWLMYL

7.50

↓

hTAS2R1	264	L-V--IGIYPSGHS	LILILGNPKLQNAKKFLLHSK-----CCQ
hTAS2R3	271	V-M--TMFYPAHSGHS	FILILGNPKLQTFVVMRLRCESGHLKPG-----SKGPIFS
hTAS2R4	267	I-F--ATLYSPGHS	VLIIITHPKLKTAKKILCF-----KK
hTAS2R5	259	T-L--MAAYPSLHSL	LILIMGIPRVKQTCQKILWKTVCAR-----RCWGP
hTAS2R7	272	S-I--ALIYPSHSHS	FILILGNPKLQNAKKFLLHSK-----FQQHKQI
hTAS2R8	272	I-A--AILYPLGHS	LILIVLNNKLRQTFVRLTSCRK-----IACMI
hTAS2R9	269	I-V--TVIFPSHSHS	FILIMGNSKLRQAFLLVAAKV-----KPFVP
hTAS2R10	264	T-T--TAIYPWGHSGHS	FILILGNPKLQNAKKFLLHSK-----NLRVT
hTAS2R13	268	T-I--GVFSPSSHSGHS	FILILGNPKLQNAKKFLLHSK-----WAKR
hTAS2R14	267	V-M--GMAYPSCSHS	CVLILGNPKLQNAKKFLLHSK-----HKEFRESS
hTAS2R16	263	A-F--VYAFILMHST	SMLSSPTLKRILK-----GKC
hTAS2R38	284	G-I--MAACPSGHAA	IILISGNPKLQNAKKFLLHSK-----DHKADSRITLC
hTAS2R39	298	I-I--MAAYPAHSHS	ILILIQDNPGLRAWKRLQLRLHLYP-----KEWTL
hTAS2R40	283	I-I--MAAYPAHSGHS	VQLILGNPKLQNAKKFLLHSK-----KGQTL
hTAS2R41	270	I-A--VYLCISVHP	FILIFSNLKLRSVFSQQLLLAR-----GFWVA
hTAS2R43	266	A-I--RFSYPSIHP	FILIWGNKKLQTFLSVFWQMRVWVKGEK-----TSSP
hTAS2R44	266	A-I--RFSYPSIHP	FILIWGNKKLQTFLSVLRQVRVWVKGEK-----PSSP
hTAS2R45	266	A-I--GFSCSAHP	FILIWGNKKLQTYLSVLWQMR-----Y
hTAS2R46	266	A-I--AFSYPSIHP	FILIWGNKKLQTFLSVLWHVRYWVKGEK-----PSSS
hTAS2R47	266	A-I--IFSYPSTHP	FILILGNKKLQIFLSVLRHVRYWVKDRSLRLH--RFTRAALCKG
hTAS2R48	266	T-V--AIMYPSFHS	FILIMGSRKLRQTFLSVLWQM-----TR
hTAS2R49	266	A-F--GIIYPSFHS	FILIWGNKTLKQTFLSVLWQVTCWAKGQN-----QSTP
hTAS2R50	266	A-V--GNIYLAFD	SFILIWRTKKLKHTFLLILCQIR-----C
hTAS2R55	271	L-A--LNAFPSCHS	FILILGNPKLQNAKKFLLHSK-----NALPL
hTAS2R56	283	S-V--IYLCAAVHPI	IILFNSNCLRAVLKSR--SS-----RCGTP
B2ADR	448	W-I--GYVNSGFN	FLIY-CRSPDFRIAFQELLCRRSSSLKAYNGYS--SNGTGEQSG
bRho	293	AFF--AKTSAVYN	EVYIMMNKQFRNCMVTTLCGKKNPLGDDEASTTVSKTETSQVAPA
B1ADR	270	W-L--GYANSAMN	PII-YCRSPDFRKAFKRLLAFPRKADR-----LHHHHHH
A2ADR	435	A-I-VLSHTNSV	VNPFIIYAYRIRERFQTFRKILRSHV--LRQEQEPFKA--HHHHHHHHHH

Abb. 50: Multiples Sequenz-Alignment der Bittergeschmacksrezeptoren zur Bestimmung hochkonservierter Positionen nach Ballesteros und Weinstein

Das Alignment aller Bittergeschmacksrezeptoren, sowie des bovinen Rhodopsin (bRho), des auf β 2-adrenergen Rezeptors (B2ADR), des β 21-adrenergen Rezeptors (B1ADR) und des AdenosineA_{2A} Rezeptors (A2ADR). Zur Erstellung des Alignments wurde der Expresso (3D coffee)- Algorithmus verwendet.

Tab. 20: Aminosäuren mit Einbuchstabencode

Die 20 kanonischen Aminosäuren mit dem dazugehörigen Einbuchstabencode.

Aminosäure	Buchstabe	Aminosäure	Buchstabe	Aminosäure	Buchstabe
Alanin	A	Glycin	G	Prolin	P
Argenin	R	Histidin	H	Serin	S
Asparagin	N	Isoleucin	I	Threonin	T
Asparaginsäure	D	Leucin	L	Tryptophan	W
Cystein	C	Lysin	K	Tyrosin	Y
Glutamin	Q	Methionin	M	Valin	V
Glutaminsäure	E	Phenylalanin	F		

Publikationen

Originalartikel

Behrens M., **Born S.**, Redel U., Voigt N., Schuh V., Raguse J.-D., Meyerhof W.
Immunohistochemical Detection of TAS2R38 Protein in Human Taste Cells
PLoS One. 2012 Jul 6, doi:10.1371/journal.pone.0040304

Biarné X, Marchiori A, Giorgetti A, Lanzara C, Gasparini P, Carloni P, **Born S**, Brockhoff A, Behrens M, Meyerhof M
Insights into the binding of Phenyltiocarbamide (PTC) agonist to its target human TAS2R38 bitter receptor.
PLoS One. 2010 Aug 25; 5(8):e12394

Slack JP, Brockhoff A, Batram C, Menzel S, Sonnabend C, **Born S**, Galindo MM, Kohl S, Thalmann S, Ostopovici-Halip L, Simons CT, Ungureanu I, Duineveld K, Bologna CG, Behrens M, Furrer S, Oprea TI, Meyerhof W
Modulation of Bitter Taste Perception by a Small Molecule hTAS2R Antagonist
Current Biology. 2010 Jun 22; 20(12):1104-9.

Weitere Artikel

Meyerhof W, **Born S**, Brockhoff A, Behrens M
Molecular biology of mammalian bitter taste receptors.
Flavour and Fragrance Journal. 2011 Feb 22; DOI: 10.1002/ffj.2041

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei vielen Menschen bedanken, die mich bei meiner Promotion in unterschiedlichster Form unterstützt haben.

Zunächst bedanke ich mich bei meinem Abteilungsleiter Prof. Dr. Meyerhof für die Möglichkeit meine Promotion in der Abteilung Molekulare Genetik durchzuführen, für die Bereitstellung der sehr guten Arbeitsbedingungen, für das Zurverfügungstellen der finanziellen Mittel und für die konstruktive Kritik.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinem Betreuer Dr. Maik Behrens, der durch seine sehr gute Betreuung und sein Engagement viel zum Gelingen der Promotion beigetragen hat.

Ein besonderes Dankschön geht auch nach Israel und die *Hebrew University of Jerusalem*, zu unseren Kooperationspartnern Anat Levit und Dr. Masha Niv. Insbesondere bedanke ich mich bei Anat Levit für die tatkräftige Unterstützung bei der *In-silico*-Modellierung der Rezeptoren und den hilfreichen Diskussionen zu möglichen Agonisten-Rezeptor-Interaktionen.

Ich bedanke mich auch bei der Arbeitsgruppe von Giovanni Appendino aus Novara, Italien für das Zurverfügungstellen der unterschiedlichsten natürlichen Bitterstoffe.

Natürlich bedanke ich mich auch bei der Abteilung Molekulare Genetik, insbesondere bei der AG Behrens für die Unterstützung und für die nette Zusammenarbeit. Ich bedanke mich bei Dr. Anne Brockhoff und Ulrike Redel für die Einführung in die Geheimnisse des „FLIPRns“ mit allem was dazu gehört. Außerdem bedanke ich mich bei Ulrike Redel für die technische Unterstützung während meiner Arbeit. Für die Korrektur der zahlreichen kleineren und größeren Fehlerchen in dieser Arbeit, sowie die Diskussionen, neben wissenschaftlichen auch zu weltpolitischen Themen, bedanke ich mich bei Jonas Töle. Für die vielen hilfreichen Tipps und den wissenschaftlichen Gedankenaustausch bedanke ich mich bei Sophie Thalmann, Anja Voigt und Kristina Loßow. Außerdem bedanke ich mich bei allen anderen Mitarbeitern, die hier nicht einzeln aufgezählt wurden, jedoch einen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und für ein nettes Arbeitsklima gesorgt haben.

Ich bedanke mich auch bei meinen Freunden aus Berlin, Hamburg und Wismar für ihre Aufmunterung, welche mir immer wieder Energie für den wissenschaftlichen Alltag gegeben hat.

Zu guter Letzt geht auch ein ganz großer Dank an meine Eltern und Großeltern, sowie meinem Bruder und seine Familie, die mich auch in diesem Lebensabschnitt größtmöglich unterstützt haben.

Erklärung

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

Potsdam, den 2012-08-28

(Stephan Born)