

Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke
Abteilung Molekulare Genetik

**Korrelation zwischen
der genetischen und der funktionellen Diversität
humaner Bitterrezeptoren**

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

vorgelegt von
Sophie Thalmann

Potsdam, November 2012

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/2013/6684/>
URN [urn:nbn:de:kobv:517-opus-66845](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-66845)
<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-66845>

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
TABELLENVERZEICHNIS.....	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VI
PUBLIKATIONEN.....	VIII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Geschmack.....	1
1.2 Bittergeschmack.....	2
1.3 Bitterrezeptoren.....	3
1.3.1 Genetische Diversität der Bitterrezeptoren.....	5
1.4 Genetik, Evolution und Ernährung.....	6
1.5 Funktionelle Charakterisierung im heterologen Expressionssystem.....	9
1.6 Zielstellung der Arbeit.....	11
2 MATERIAL.....	13
2.1 Geschmacksstoffe.....	13
2.2 Chemikalien.....	13
2.3 Primer.....	13
2.4 Expressionsvektoren.....	13
2.5 Plasmide.....	14
2.5.1 deorphanisierte TAS2Rs.....	14
2.5.2 orphane TAS2Rs.....	17
2.6 Eukaryotische Zelllinie.....	17
2.7 Medien und Puffer für eukaryotische Zellen.....	18
2.8 Bakterienstamm.....	18

2.9	Bakterienkultur.....	18
2.10	Geräte.....	19
2.11	Software	19
3	METHODEN.....	20
3.1	Molekularbiologische Methoden	20
3.1.1	Genotypisierung und Haplotypbestimmung der Probanden	20
3.1.2	Polymerase-Kettenreaktion	20
3.1.2.1	PCR für Genotypisierung.....	21
3.1.2.2	PCR für Klonierung.....	21
3.1.2.3	Klonierungs-PCR stark homologer Bitterrezeptoren	22
3.1.2.4	PCR bei Klonierung mit alternativen Restriktionsschnittstellen.....	23
3.1.3	Gezielte Mutagenese mittels PCR	23
3.1.4	Agarose-Gelelektrophorese	25
3.1.5	Aufreinigung PCR-Produkte.....	25
3.1.6	Aufreinigung DNA-Fragmente aus Agarosegel.....	25
3.1.7	Isolierung von Plasmid-DNA.....	26
3.1.8	Restriktionsverdau DNA für Klonierung.....	26
3.1.9	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	27
3.1.10	Phosphorylierung von PCR-Fragmenten.....	27
3.1.11	Auffüllen einzelsträngiger DNA.....	28
3.1.12	Ligation.....	28
3.1.13	Transformation kompetenter Bakterien	29
3.1.14	Sequenzierung von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten	29
3.2	Zellbiologische Methoden.....	29
3.2.1	Kultivierung HEK293T _{Gα16Gust44} -Zellen.....	30
3.2.2	transiente Transfektion.....	30
3.2.3	Calcium-Imaging im FLIPR.....	30
3.2.4	Auswertung FLIPR-Daten.....	31
3.2.5	Immunzytochemie	32

4	ERGEBNISSE	33
4.1	Funktionelle Charakterisierung der häufigsten Haplotypen humaner Bitterrezeptoren	33
4.2	Orphane TAS2Rs	33
4.2.1	häufigste Haplotypen orphaner TAS2Rs	34
4.2.1.1	TAS2R41	35
4.2.1.2	TAS2R42	36
4.2.1.3	TAS2R45	37
4.2.1.4	TAS2R48	39
4.2.1.5	TAS2R60	40
4.2.2	Calcium-Imaging der orphanen TAS2R-Haplotypen	41
4.2.3	Funktionelle Charakterisierung der TAS2R41-Haplotypen mit Chloramphenicol	44
4.2.4	Funktionelle Charakterisierung der TAS2R41-Haplotypen mit Strukturanaloga des Chloramphenicols	47
4.3	deorphanisierte TAS2Rs	50
4.3.1	TAS2Rs mit funktionell einheitlichen Haplotypen	50
4.3.1.1	TAS2R4	52
4.3.1.2	TAS2R8	53
4.3.1.3	TAS2R10	53
4.3.1.4	TAS2R40	54
4.3.1.5	TAS2R50	55
4.3.2	Übersicht TAS2Rs mit funktionell unterschiedlichen Haplotypen	56
4.3.3	TAS2Rs mit inaktiven Haplotypen	58
4.3.3.1	TAS2R7	58
4.3.3.2	TAS2R9	60
4.3.3.3	TAS2R44	61
4.3.4	TAS2Rs mit unterschiedlich sensitiven Haplotypen	63
4.3.4.1	TAS2R5	63
4.3.4.2	TAS2R13	64
4.3.4.3	TAS2R16	66
4.3.4.4	TAS2R43	67
4.3.4.5	TAS2R49	69
4.4	Funktionelle Charakterisierung einzelner TAS2Rs	70

4.4.1	TAS2R46 und TAS2R47	70
4.4.2	TAS2R38	75
5	DISKUSSION	79
5.1	Funktionelle Variabilität der TAS2Rs	79
5.2	Funktionelle Diversität der analysierten ethnischen Gruppen.....	81
5.3	Funktionelle Polymorphismen	82
5.3.1	Vergleich der Polymorphismen mit bekannten funktionellen Aminosäurepositionen.....	85
5.4	G-Protein-abhängige Effekte	87
5.4.1	TAS2R43	88
5.4.2	TAS2R44	90
5.5	Funktionelle Redundanz des TAS2R46 und TAS2R47	94
5.6	TAS2R38-Haplotypenanalyse zur Aufklärung der Evolution von TAS2Rs	95
5.7	Deorphanisierung des TAS2R41	96
5.8	orphan TAS2Rs	96
5.9	Korrelation zu phänotypischen Daten	100
5.10	Phänotypische Bedeutung der funktionellen Haplotypen.....	101
6	ZUSAMMENFASSUNG	105
	LITERATURVERZEICHNIS	106
	ANHANG	114
	ERKLÄRUNG.....	124

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Polymorphismen der Haplotypen deorphanisierter TAS2Rs.....	14
Tab. 2: Polymorphismen der Haplotypen orphaner TAS2Rs	17
Tab. 3: Übersicht aller identifizierten und analysierten Haplotypen	35
Tab. 4: Haplotypen des TAS2R41 und ihre Allelfrequenz	36
Tab. 5: Haplotypen des TAS2R42 und ihre Allelfrequenz	37
Tab. 6: Haplotypen des TAS2R45 und ihre Allelfrequenz	38
Tab. 7: Haplotypen des TAS2R48 und deren Häufigkeit	39
Tab. 8: Haplotypen des TAS2R60 und ihre Allelfrequenz	40
Tab. 9: Im Calcium-Imaging der orphanen TAS2Rs getestete Bitterstoffe	42
Tab. 10: Übersicht der EC ₅₀ - und Schwellenwerte von TAS2Rs ohne funktionelle Diversität.....	51
Tab. 11: Übersicht Bitterrezeptoren mit funktioneller Diversität	57
Tab. 12: Haplotypen des TAS2R46 und deren Häufigkeit in Kaukasiern (n=64)	71
Tab. 13: Haplotypen des TAS2R47 und deren Häufigkeit in Kaukasiern (n=64)	71
Tab. 14: Übersicht EC ₅₀ - bzw. Schwellenwerte der TAS2R46/TAS2R47-Haplotypen	73
Tab. 15: Überblick über die TAS2R38-Haplotypen und deren funktionelle Daten.....	77
Tab. 16: Vergleich TAS2R43-Ergebnisse mit publizierten Daten.....	88
Tab. 17: Vergleich TAS2R44-Ergebnisse mit publizierten Daten.....	90
Tab. 18: Vergleich Aminosäuren der 1. intrazellulären Schleife der TAS2Rs	93
Tab. 19: Anzahl Agonisten, die ausschließlich oder am sensitivsten von funktionell homologen TAS2Rs detektiert werden {Meyerhof et al., 2010}.....	102
Tab. 20: Anzahl Agonisten, die ausschließlich oder am sensitivsten von funktionell heterogenen TAS2Rs detektiert werden {Meyerhof et al., 2010}	103

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Geschmackspapillen {Stähler und Meyerhof, 2010}.....	1
Abb. 2: Dendrogramm und Topologie der humanen Bitterrezeptoren.....	4
Abb. 3: Signaltransduktionsweg der TAS2Rs im gustatorischen (A) und heterologen System (B).....	9
Abb. 4: Schematische Darstellung der gezielten Mutagenese.....	24
Abb. 5: Häufigkeit der TAS2R41-Haplotypen in den analysierten ethnischen Gruppen.....	36
Abb. 6: Häufigkeit der TAS2R42-Haplotypen in den analysierten ethnischen Gruppen.....	37
Abb. 7: Amplifizierung des TAS2R45-Locus aus Probanden-DNA.....	38
Abb. 8: Häufigkeit der TAS2R45-Haplotypen in den analysierten ethnischen Gruppen.....	39
Abb. 9: Häufigkeit der TAS2R48-Haplotypen in den analysierten ethnischen Gruppen.....	40
Abb. 10: Häufigkeit der TAS2R60-Haplotypen in den analysierten ethnische Gruppen....	40
Abb. 11: Einfluss steigender Plasmidmengen auf TAS2R-Signale.....	41
Abb. 12: Fluoreszenzsignale des TAS2R41-Pools nach Aktivierung durch Chloramphenicol.....	44
Abb. 13: Dosis-Wirkungskurve der TAS2R41-Haplotypen mit Chloramphenicol.....	45
Abb. 14: Fluoreszenzsignale des TAS2R41 H2 in verschiedenen Expressionsvektoren....	46
Abb. 15: Expressionsrate des TAS2R41 H2 in verschiedenen Expressionsvektoren.....	46
Abb. 16: TAS2R41-Rezeptormodell mit markiertem Polymorphismus.....	47
Abb. 17: Chloramphenicol und Strukturanaloga.....	48
Abb. 18: Fluoreszenzsignale der TAS2R41-Haplotypen mit Strukturanaloga des Chloramphenicols.....	49
Abb. 19: Dosis-Wirkungskurven der TAS2R4-Haplotypen.....	52
Abb. 20: Dosis-Wirkungskurven der TAS2R8-Haplotypen.....	53
Abb. 21: Dosis-Wirkungskurven der TAS2R10-Haplotypen.....	54

Abb. 22: Dosis-Wirkungskurven der TAS2R40-Haplotypen.....	55
Abb. 23: Dosis-Wirkungskurven der TAS2R50-Haplotypen.....	56
Abb. 24: Rezeptormodell des TAS2R7 mit markierten Polymorphismen	59
Abb. 25: Dosis-Wirkungskurve der TAS2R7-Haplotypen.....	59
Abb. 26: Dosis-Wirkungskurve der TAS2R9-Haplotypen.....	60
Abb. 27: Rezeptormodell des TAS2R9 mit markiertem Polymorphismus.....	61
Abb. 28: Dosis-Wirkungskurven der TAS2R44-Haplotypen.....	62
Abb. 29: Rezeptormodell des TAS2R44 mit H4-spezifischen Polymorphismen.....	62
Abb. 30: Dosis-Wirkungskurven der TAS2R5-Haplotypen.....	63
Abb. 31: Rezeptormodell des TAS2R5 mit markierten Polymorphismen	64
Abb. 32: Dosis-Wirkungskurven der TAS2R13-Haplotypen.....	65
Abb. 33: Rezeptormodell des TAS2R13 mit markiertem Polymorphismus.....	65
Abb. 34: Dosis-Wirkungskurven der TAS2R16-Haplotypen.....	66
Abb. 35: Rezeptormodell des TAS2R16 mit markierten Polymorphismen	67
Abb. 36: Dosis-Wirkungskurven der TAS2R43-Haplotypen.....	68
Abb. 37: Rezeptormodell des TAS2R43 mit markierten Polymorphismen	68
Abb. 38: Dosis-Wirkungskurven der TAS2R49-Haplotypen.....	69
Abb. 39: Rezeptormodell des TAS2R49 mit markierten Polymorphismen	70
Abb. 40: Dosis-Wirkungskurven der TAS2R46/TAS2R47-Haplotypen.....	72
Abb. 41: Rezeptormodell des TAS2R46 mit markierten Polymorphismen	74
Abb. 42: Rezeptormodell des TAS2R47 mit markierten Polymorphismen	74
Abb. 43: Dosis-Wirkungskurven der TAS2R38-Haplotypen.....	75
Abb. 44: Rezeptormodell des TAS2R38 mit markierten Polymorphismen	78
Abb. 45: Reaktivität der häufigsten Haplotypen jedes TAS2Rs.....	80
Abb. 46: TAS2R-Modell mit funktionellen Polymorphismen der zehn divergenten TAS2Rs.....	83
Abb. 47: TAS2R-Modell der bislang identifizierten Aminosäuren der Bindungstasche	86
Abb. 48: Vergleich des TAS2R44 H1 und H3 mit und ohne C-terminales HSV-Epitop....	91

Publikationen

Genomic, genetic and functional dissection of bitter taste responses to artificial sweeteners.

Roudnitzky N, Bufe B, Thalmann S, Kuhn C, Gunn HC, Xing C, Crider BP, Behrens M, Meyerhof W, Wooding SP.

Hum Mol Genet. 2011 Sep 1;20(17):3437-49.

Genetics and bitter taste responses to goitrin, a plant toxin found in vegetables.

Wooding S, Gunn H, Ramos P, Thalmann S, Xing C, Meyerhof W.

Chem Senses. 2010 Oct;35(8):685-92.

Modulation of bitter taste perception by a small molecule hTAS2R antagonist.

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.

Curr Biol. 2010 Jun 22;20(12):1104-9.

1 Einleitung

1.1 Geschmack

Der Geschmackssinn dient der ersten Bewertung der aufgenommenen Nahrung in der Mundhöhle. Neben der sensorischen Bewertung durch Geschmack, Geruch und visuelle Reize tragen auch die Textur und Temperatur der Nahrung zum Geschmackseindruck bei {Lindemann, 2001}. Der eigentliche Geschmackssinn setzt sich aus den fünf Geschmacksrichtungen süß, bitter, umami, salzig und sauer zusammen, deren Detektion durch entsprechende Rezeptoren und Kanäle in den Geschmacksrezeptorzellen der Geschmacksknospen erfolgt {Kinnamon und Margolskee, 1996; Lindemann, 2001; Chandrashekar et al., 2006}. Geschmacksknospen sind in Pilz-, Blätter- und Wallpapillen auf der Zungenoberfläche organisiert (siehe Abb. 1) und finden sich vereinzelt auch im Gaumen und Kehldeckel {Bachmanov und Beauchamp, 2007}.

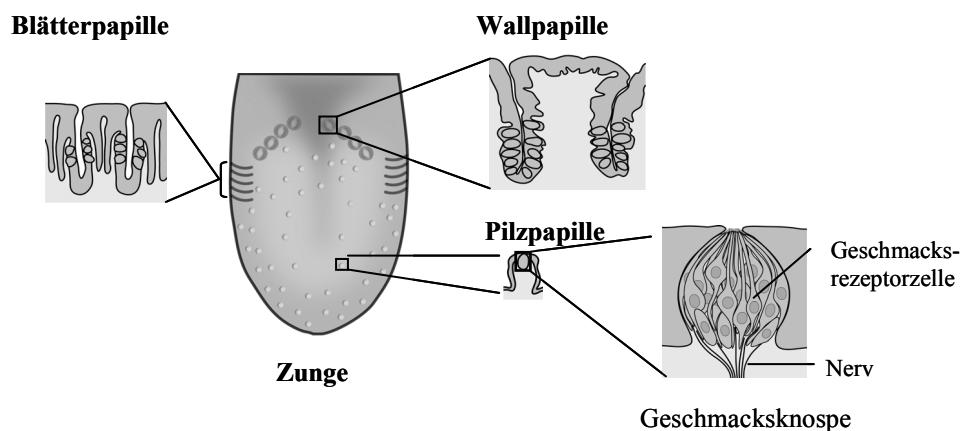


Abb. 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Geschmackspapillen {Stähler und Meyerhof, 2010}

Es gibt Hinweise auf weitere Geschmacksrichtungen, wie zum Beispiel den Fettgeschmack, der derzeit intensiv diskutiert und erforscht wird {Sclafani et al., 2007; Mattes et al., 2009; Galindo et al., 2011}. Während der Süß- und Umamigeschmack attraktive Geschmacksrichtungen sind und für die nötige Nährstoffzufuhr sorgen, warnen der Sauer- und Bittergeschmack vor ungenießbaren oder sogar toxischen Nahrungsbestandteilen. Der Salzgeschmack trägt zur Regulation der Mineralstoffhomöostase bei. Der Geschmack spielt

nicht nur in der Nahrungsauswahl eine entscheidende Rolle, sondern induziert auch physiologische Prozesse die den Organismus auf die Nahrungsverdauung und -absorption vorbereiten. Er beeinflusst zum Beispiel die Sekretion von Magensäure, exokrine und endokrine Sekretion der Bauchspeicheldrüse, die Gallensäuresekretion, die Magenentleerung oder die Darmperistaltik {Giduck et al., 1987; Zafra et al., 2006; Power und Schulkin, 2008}. Das Geschmacksempfinden ist auch genetisch bedingt und kann individuell unterschiedlich sein. Rezeptoren des Süß-, Umami- und Bittergeschmacks weisen Polymorphismen auf {Kim et al., 2005; Kim et al., 2006}, die Rezeptoreigenschaften modifizieren können und damit die individuelle Geschmackswahrnehmung bestimmen {Soranzo et al., 2005; Bufe et al., 2005; Pronin et al., 2007; Roudnitzky et al., 2011}. In Zeiten fortschreitender ernährungsbedingter Gesundheitsprobleme wie Diabetes mellitus Typ-2 oder Adipositas ist ein Ziel der Geschmacksforschung, den Einfluss des genetisch determinierten Geschmacksempfindens auf die Nahrungspräferenz und das Ernährungsverhalten zu bestimmen.

1.2 Bittergeschmack

Bittergeschmack führt zur Ablehnung der Nahrung {Steiner, 1973; Chandrashekar et al., 2006}, was sich schon bei Neugeborenen beobachten läßt {Steiner, 1979}. Er gilt als Sensor potentiell schädlicher Nahrungsbestandteile {Lindemann, 1996; Drewnowski und Gomez-Careros, 2000}. Die angeborene Aversion vermindert sich im Laufe des Lebens durch Gewöhnung an ungefährliche Bitterstoffe und steigende Akzeptanz bestimmter Nahrungsmitteln, aufgrund der gewünschten physiologischen Wirkung vieler Bittersubstanzen {Drewnowski, 2001}. Typische Beispiele sind Bier, Kaffee, verschiedene Kohlsorten oder Grapefruit. Es gibt vermutlich tausende Bitterstoffe, hauptsächlich pflanzlichen Ursprungs, wo sie zum Schutz gegen Fraßfeinde gebildet werden. Bittergeschmack kann jedoch auch als Folge der Verarbeitung und Fermentierung oder durch Alterung von Lebensmitteln auftreten {Maehashi et al., 2008}. Bitterstoffe stellen eine große und chemisch sehr heterogene Substanzgruppe ohne charakteristisches Strukturmerkmal dar, zu denen unter anderem Fettsäuren, Aminosäuren, Amine, N-Heterozyklen, Glykoside, Zuckerderivate, Phenole und Metallionen zählen {Meyerhof et al., 2011}. Zahlreiche Bitterstoffe sind tatsächlich giftig, viele jedoch ungefährlich. Bitterstoffe werden aufgrund ihrer vielfältigen pharmakologischen Wirkung oft auch als Arzneimittel verwendet.

1.3 Bitterrezeptoren

Der Mensch besitzt bis zu 25 funktionelle Bitterrezeptorgene (siehe Abb. 2A) sowie 11 Pseudogene, die in Clustern auf den Chromosomen 5, 7 und 12 lokalisiert sind {Adler et al., 2000; Chandrashekar et al., 2000; Matsunami et al., 2000; Go et al., 2005}. Die Anzahl humaner Bitterrezeptoren, auch TAS2R (für taste receptor family 2) genannt, liegt im Mittelfeld bislang untersuchter Vertebratenspezies. Die funktionelle TAS2R-Genausstattung in Vertebraten reicht von 3 bis 49 und stellt eine starke evolutionäre Anpassung an die jeweiligen Umwelt- und Ernährungsbedingungen dar {Shi und Zhang, 2006; Dong et al., 2009}. Bitterrezeptoren sind heptahelikale Membranproteine die eine eigene Unterfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) bilden {Lagerstrom und Schioth, 2008}. Sie sind ca. 300 Aminosäuren lang und ihre sieben helikalen Transmembrandomänen werden durch extra- und intrazelluläre Schleifen verbunden. Sie haben kurze extrazelluläre N- und intrazelluläre C-Termini {Floriano et al., 2006; Miguët et al., 2006} (siehe Abb. 2B). Die intrazellulären Bereiche des Rezeptors sind stärker konserviert, als die mittleren bis extrazellulären Bereiche, was für eine konservierte intrazelluläre Signalweiterleitung und flexiblere Strukturen im Bereich der Ligandeninteraktion spricht {Meyerhof, 2005; Wooding, 2011}. In der zweiten extrazellulären Schleife befindet sich eine konservierte Glykolysierungsstelle, die eine Rolle in der Proteinreifung und Zelloberflächenexpression spielt (Reichling et al., 2008). An letzterer scheinen auch Proteine der REEP- (*Receptor expression enhancing protein*) und RTP-Familie (*Receptor transport protein*) beteiligt zu sein (Behrens et al., 2006). Die genaue dreidimensionale Struktur der Bitterrezeptoren ist nicht bekannt, da eine Kristallisation dieser Membranproteine für eine Röntgenkristallstrukturanalyse bisher nicht gelang. Um sich der dreidimensionalen Struktur weitestmöglich anzunähern werden die TAS2R-Sequenzen mit denen der wenigen GPCRs verglichen, deren 3D-Struktur ermittelt werden konnten {Rosenbaum et al., 2009; Hanson und Stevens, 2009}. Darauf basierend werden *in silico* Rezeptormodelle erstellt, die anschließend durch gezielte Mutationen und funktionelle Analysen überprüft werden {Miguët et al., 2006; Floriano et al., 2006}.

Bitterrezeptoren besitzen eine Ligandenbindungstasche {Brockhoff et al., 2010} die aus Aminosäuren der Transmembrandomänen 3, 5, 6 und 7 {Sakurai et al., 2010; Biarnes et al., 2010; Brockhoff et al., 2010}, wahrscheinlich unter Beteiligung der 2. extrazellulären Schleife {Dai et al., 2011; Pronin et al., 2004}, gebildet werden. Allgemein weisen die TAS2Rs Sequenzhomologien von 20% bis 90% auf, wobei besonders das Cluster von TAS2R43-50 auf Chromosom 12 ungewöhnlich hohe Sequenzhomologien zeigt.

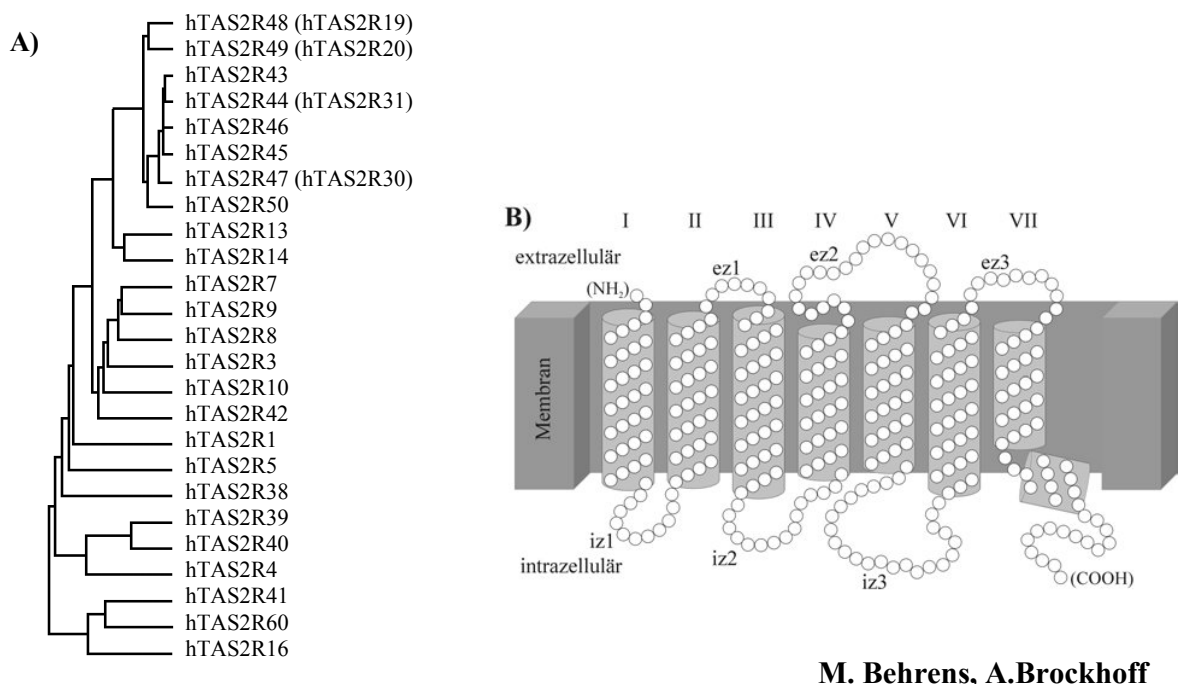


Abb. 2: Dendrogramm und Topologie der humanen Bitterrezeptoren

A: Das Dendrogramm zeigt den Verwandtschaftsgrad der humanen TAS2Rs auf Basis ihrer Aminosäuresequenz. In Klammern angegeben ist die alternative Nomenklatur. B: Stellt die allgemeine Topologie der Bitterrezeptoren dar.

Bitterrezeptoren kommen in einer Subpopulation der Geschmacksrezeptorzellen vor, wo sie in verschiedener Kombination coexprimiert werden {Behrens et al., 2007}. In den vergangenen Jahren war ein Forschungsschwerpunkt die Identifizierung von Rezeptor-Ligandenpaaren. Von den 25 funktionellen Bitterrezeptoren konnten 20 Rezeptoren, überwiegend in heterologen Expressionssystemen, deorphanisiert werden {Meyerhof et al., 2010}. Die funktionelle Analyse erfolgte meist in HEK293-Zellen, die für eine funktionierende Signalweiterleitung entweder das chimäre $G\alpha$ -Protein $G\alpha_{16}$ gust44 {Ueda et al., 2003} oder das $G\alpha_{15}$ der Maus {Bufe et al., 2002; Chandrashekar et al., 2000} exprimierten. Als Indikator der Rezeptoraktivierung wurden der Calciumspiegel oder der Einbau von radioaktivmarkiertem GTP in die Membran gemessen {Chandrashekar et al., 2000; Bufe et al., 2002; Pronin et al., 2004; Sainz et al., 2007}. Die Analyse des Ligandenspektrums deorphanisierter TAS2Rs ergab ein sehr heterogenes Bild {Meyerhof et al., 2010}. Die drei Rezeptoren TAS2R10, TAS2R14, TAS2R46 stellten sich als Generalisten heraus, von denen jeder ca. 30 bekannte Bitterstoffe detektiert. Diese drei Rezeptoren reagierten zusammen auf die Hälfte der 104 getesteten Substanzen. Das andere Extrem bildeten die fünf Spezialisten TAS2R3, TAS2R5, TAS2R13, TAS2R49 und

TAS2R50 von denen jeweils nur ein bis zwei Liganden bekannt sind. Auch die fünf noch orphanen Bitterrezeptoren TAS2R41, TAS2R42, TAS2R45, TAS2R48 und TAS2R60, für die also keine Liganden bekannt sind, könnten zu den Spezialisten zählen. Umgekehrt stimulieren die meisten Bitterstoffe mehr als einen Rezeptor, wobei die Sensitivität der detektierenden TAS2Rs sich meist unterscheidet {Meyerhof et al., 2010; Meyerhof et al., 2011}. Die Aktivierung mehrerer TAS2Rs durch einen Bitterstoff erschwert die Assoziation zwischen beobachtetem Phänotyp und verantwortlichem Bitterrezeptor in sensorischen Studien. Da Subpopulationen der TAS2Rs in den Geschmacksrezeptorzellen coexprimiert werden, wäre eine Erweiterung des Ligandenspektrums durch funktionelle Heterodimere, wie für andere GPCRs bereits beschrieben, denkbar. Die Bildung von TAS2R-Heterodimeren bestätigte sich, jedoch ohne funktionelle Konsequenzen (Kuhn et al., 2010). Neben der Expression in gustatorischen Geweben wurden humane und murine Bitterrezeptoren, sowie Komponenten des gustatorischen Signalweges, auch in anderen Geweben wie im Gastrointestinaltrakt {Bezencon et al., 2007; Dotson et al., 2008; Wu et al., 2002}, im Lungengewebe {Finger et al., 2003} oder im Hoden {Finger et al., 2003; Li und Zhou, 2012} beschrieben. Ihre Bedeutung scheint damit über die initiale gustatorische Wahrnehmung bitterer Substanzen hinauszugehen {Behrens et al., 2011}. Da die exprimierenden Zellpopulationen in diesen Geweben größtenteils noch unbekannt sind, ist auch die physiologische Rolle der TAS2Rs in diesen Geweben unklar. Über lokale parakrine, humorale oder neuronale Signalwege wird die Modifizierung des Verdauungsprozesses {Glendinning et al., 2008} oder die Regulierung metabolischer Parameter durch Bitterrezeptoren {Jang et al., 2007} diskutiert.

1.3.1 Genetische Diversität der Bitterrezeptoren

Die Anzahl an Bitterrezeptoren und ihre funktionellen Eigenschaften können von Mensch zu Mensch unterschiedlich sein. Die TAS2R-Gene weisen durch ungewöhnlich viele Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphism auch SNP) und Indels (Insertionen und Deletionen) ein hohes Maß an genetischer Variabilität auf {Ueda et al., 2001; Kim et al., 2005; Wooding et al., 2004}. Von jedem Rezeptor existieren mehrere weltweit vorkommende Allele, deren individuelle Kombination die molekulare Grundlage der unterschiedlichen Bitterwahrnehmung bilden könnte. Neben Polymorphismen finden sich für den TAS2R43 und TAS2R45 zusätzlich Variationen in der Genanzahl {Pronin et al., 2007; Roudnitzky et al., 2011}, sodass einigen Menschen diese Rezeptoren fehlen.

TAS2R-Sequenzanalysen verschiedener ethnischer Gruppen wiesen nicht nur bis zu 151 verschiedene Varianten der 25 Bitterrezeptoren auf, sondern zeigten auch zwischen ethnischen Gruppen Unterschiede in der Häufigkeit einzelner Varianten {Kim et al., 2005}. Diese genetische und ethnische Diversität könnte in einer entsprechenden funktionellen Diversität resultieren, sodass es statt 25 Bitterrezeptoren ein Mehrfaches an funktionellen TAS2R-Varianten geben könnte. Diese Allele würden angepasst an Umwelt und physiologische Bedingungen die Möglichkeit bieten, Bitterstoffe entweder zu tolerieren oder zu vermeiden. Für einige Bitterrezeptoren wie den TAS2R9 {Dotson et al., 2008}, den TAS2R16 {Soranzo et al., 2005}, den TAS2R43 und TAS2R44 {Pronin et al., 2007; Roudnitzky et al., 2011} konnten bereits funktionell unterschiedliche Allele identifiziert werden. Das bekannteste Beispiel sind der PAV- und der AVI-Haplotyp des TAS2R38. Der funktionelle PAV und nicht-funktionelle AVI bilden die molekulare Grundlage {Kim et al., 2003; Bufo et al., 2005} für den bereits in den 30er Jahren beobachteten Phenylthiocarbamid-Phänotyp {Fox, 1932}. Homozygote Individuen des AVI-Haplotypen empfinden, im Gegensatz zu Individuen mit einem oder zwei PAV-Allelen, die synthetische Substanz Phenylthiocarbamid nicht als bitter. Eine Studie konnte zeigen, dass die Sensitivitätsunterschiede der TAS2R38-Genotypen auch beim Verzehr von komplexen Lebensmitteln, wie bestimmten Gemüsesorten, auftraten. Diese enthielten Glucosinolate, die natürliche Liganden des TAS2R38 sind {Sandell und Breslin, 2006}.

Da TAS2Rs auch extragustatorisch auftreten (siehe 1.3), können funktionell verschiedene Varianten nicht nur die Geschmackswahrnehmung, sondern auch nachgeschaltete physiologische Prozesse im Gastrointestinaltrakt unterschiedlich beeinflussen {Wu et al., 2002}. Für den TAS2R9 wurde in Assoziationsstudien ein allelspezifischer Einfluss auf die Glukose- und Insulinhomöostase nachgewiesen {Dotson et al., 2008}. Auch hier bleibt der zugrunde liegende Mechanismus, nicht zuletzt wegen eines fehlenden natürlichen Liganden, unbekannt. Inwieweit die beobachteten Unterschiede der individuellen Bitterwahrnehmung die Nahrungsmittelauswahl und das Ernährungsverhalten beeinflusst, ist bislang weitestgehend unbekannt und Ziel der aktuellen Forschung.

1.4 Genetik, Evolution und Ernährung

Die Evolution der Bitterrezeptorgene ist bislang kaum verstanden. Die hohe Variabilität der Gen- und Allelzahl, sowie der große Anteil von Pseudogenen in verschiedenen Vertebratenspezies, reflektiert die spezies-abhängige Vermehrung oder den Verlust

funktioneller Gene durch Genduplikationsprozesse, Aminosäureaustausche oder Pseudogenisierung {Go et al., 2005; Dong et al., 2009}. Diese Veränderungen der TAS2R-Gene könnten infolge eines verminderten Selektionsdrucks durch neutrale Kräfte wie Mutation, Rekombination und genetischer Drift entstehen oder Ergebnis einer schnellen adaptiven Evolution auf veränderte Umweltbedingungen sein {Wang et al., 2004; Shi et al., 2003; Wooding et al., 2004}. Für neutrale, wie auch selektive Evolutionsprozesse der TAS2R-Gene gibt es Hinweise. Auf adaptive Prozesse deutet das populationsspezifische Auftreten bestimmter TAS2R-Allele im Menschen hin {Kim et al., 2005; Soranzo et al., 2005}. Für Aminosäurepositionen einzelner Bitterrezeptoren wurden ebenfalls selektive Prozesse nachgewiesen {Soranzo et al., 2005; Wooding et al., 2004}. Zeichen positiver Selektion finden sich auch in einem spezie-spezifischen TAS2R-Cluster von Fledermäusen (Zhou et al., 2009). Die genetische Divergenz der Bitterrezeptorgene des Schimpansen hingegen scheint durch einen verminderten Selektionsdruck entstanden zu sein (Sugawara et al., 2003). Auf der anderen Seite teilen Mensch und Schimpanse den Phänotyp für die Sensitivität von Phenylthiocarbamid, vermittelt durch Allele des TAS2R38, die sich in beiden Spezies jedoch unterscheiden. Sie entwickelten sich unabhängig voneinander, blieben in beiden Spezies durch balancierende Selektion erhalten und bilden ein Beispiel für konvergente Evolution {Fisher et al., 1939; Wooding et al., 2004; Wooding et al., 2006}. Das TAS2R-Genrepertoire resultiert demnach aus einer Anpassung des Ernährungsverhaltens an veränderte Umweltbedingungen. Ob umgekehrt gilt, dass die TAS2R-Ausstattung auch das Ernährungsverhalten bestimmt, bleibt zu untersuchen.

Neben den Bitterrezeptoren ist auch die Evolution des Süßrezeptors bzw. der spezifischen Untereinheit TAS1R2 des Heterodimers ein interessantes Beispiel für die sich wandelnde Bedeutung des (Süß)-Geschmacks. Sequenzanalysen des TAS1R2 in 12 Säugetierspezies, die verschiedene Ernährungsstufen auf dem Weg zum obligatorischen Fleischfresser darstellen, zeigten in 7 Spezies eine unabhängige Pseudogenisierung des TAS1R2 (Jiang et al., 2012). Dasselbe Phänomen fand sich auch in Vampirfledermäusen, die sich statt von Früchten oder Insekten, wie ihre süßsensitiven Artgenossen, von Blut ernähren (Zhao et al., 2010). Ebenso wie Seelöwen oder Delfine, die ihre Nahrung, ohne zu kauen, schlucken, sind diese Fledermäuse bei der Nahrungsauswahl nicht mehr vom Geschmack abhängig. Infolgedessen verminderte sich der Selektionsdruck auf den Geschmacksrezeptor und Pseudogenisierungen traten auf (Zhao et al., 2010; Jiang et al., 2012).

Dass funktionell unterschiedliche Allele zu einer individuellen Wahrnehmung des Bittergeschmacks führen, konnte für einige Bitterrezeptoren bereits gezeigt werden und bleibt Gegenstand der Forschung für weitere (siehe 1.3.1). Assoziationsstudien, die einen

Zusammenhang zwischen dem TAS2R38-Genotyp und dem Ernährungsverhalten {Dotson et al., 2010}, dem Alkoholkonsum {Wang et al., 2007}, der Nikotinabhängigkeit {Cannon et al., 2005; Lou et al., 2008; Mangold et al., 2008}, Adipositas und dem Verzehr von glucosinolathaltigem Gemüse {Gorovic et al., 2011} untersuchten, ergaben bislang widersprüchliche Ergebnisse {Hayes et al., 2011; Feeney et al., 2011; Sausenthaler et al., 2009}. Auch für den TAS2R16 wurden allel-abhängig Assoziationen zur Nikotin- {Lou et al., 2008} bzw. Alkoholabhängigkeit {Hinrichs et al., 2006; Wang et al., 2007} beobachtet. Dass die Bittergeschmackswahrnehmung die Akzeptanz von Nahrungsmitteln beeinflusst, deutet sich jedoch durch die regionale Selektion bestimmter Bitterrezeptorallele, wie beim TAS2R16 beobachtet, an. Als Ligandengruppe des TAS2R16 konnten, die zum Teil toxischen, Glucopyranoside identifiziert werden {Bufe et al., 2002}. Für das weniger sensitive TAS2R16-Allel K172 wurden Anzeichen positiver Selektion in bestimmten Regionen Afrikas beobachtet, während sich in anderen Teilen der Welt vorwiegend neue, sensitivere TAS2R16-Allele verbreiteten {Soranzo et al., 2005; Li et al., 2011}. Diese sensitiveren Allele sorgten für eine minimale Aufnahme der toxischen Glucopyranoside. Das in Afrika häufige K172-Allel zeigte eine regionale Kolokalisation mit anderen Malariaresistenzgenen {Soranzo et al., 2005}. Das weniger sensitive TAS2R16-Allel könnte durch eine erhöhte Akzeptanz zu einem regelmässigen, geringen Verzehr cyanogener Glucopyranoside führen. Diesen Pflanzenmetaboliten wird eine protektive Wirkung gegen Malaria zugesprochen {Soranzo et al., 2005}.

Neben der genetischen Variabilität der Geschmacksrezeptoren bestimmen natürlich weitere Faktoren die Geschmackswahrnehmung, wie die Anzahl an Geschmacksknospen {Bartoshuk et al., 1994; Calo et al., 2011}, möglicherweise die Speichelzusammensetzung {Dsamou et al., 2011} oder nicht-genetische Faktoren wie Gesundheit, Einnahme von Medikamenten oder Hormonstatus. Das Essverhalten hängt darüber hinaus nicht nur von der Geschmackswahrnehmung ab, sondern von einem komplexen Zusammenspiel physiologischer, psychologischer, sozialer und genetischer Faktoren {Grimm und Steinle, 2011}.

1.5 Funktionelle Charakterisierung im heterologen Expressionssystem

Die funktionelle Charakterisierung der verschiedenen TAS2R-Varianten erfolgte mittels Calcium-Imaging in unserem heterologen Expressionssystem, den HEK293_{Gα16gust44}-Zellen {Bufo et al., 2002; Behrens et al., 2004}. Auf Unterschiede zum nativen Geschmackssystem soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

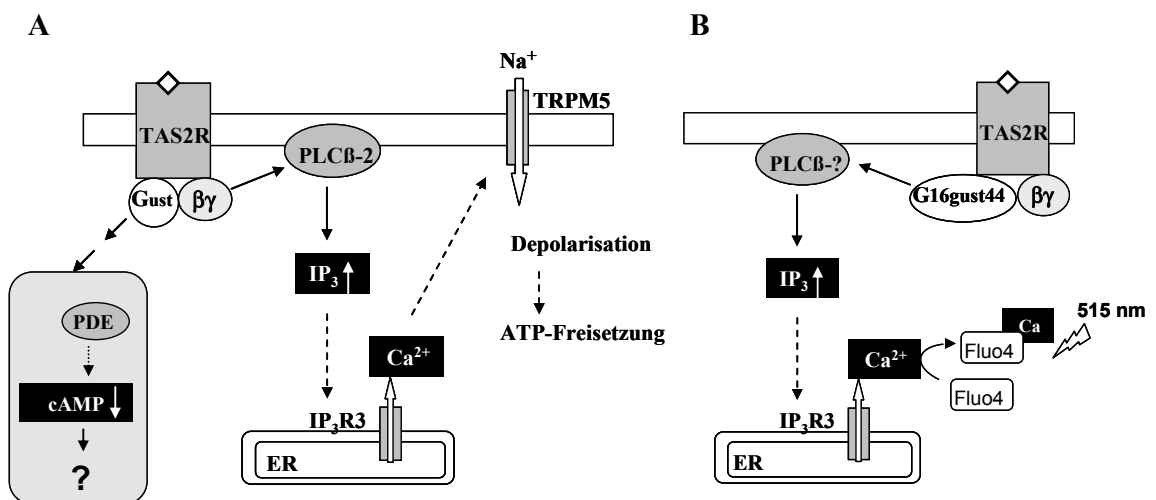


Abb. 3: Signaltransduktionsweg der TAS2Rs im gustatorischen (A) und heterologen System (B)

TRPM5: *transient receptor channel M5*; PLCβ: Phospholipase Cβ; ER: Endoplasmatisches Retikulum; IP₃: Inositol-1,4,5-trisphosphat; IP₃-R3: IP₃-Rezeptor Typ 3; PDE: Phosphodiesterase

Abbildung Abb. 3 stellt die native Signalkaskade dar, die durch Interaktion von Bitterstoff und Rezeptor initiiert wird. Das daraufhin aktivierte heterotrimere G-Protein enthält im gustatorischen System die geschmacksspezifische Gα-Untereinheit Gustducin {McLaughlin et al., 1992}, sowie die Untereinheiten β1 oder β3 und γ13 {Huang et al., 1999}. Eine Besonderheit ist die Aktivierung der geschmacksspezifischen Phospholipase PLCβ-2 durch die βγ-Untereinheit des G-Proteins und nicht, wie in den meisten Systemen, durch die α-Untereinheit des G-Proteins {Katz et al., 1992; Rössler et al., 2000; Yan et al., 2001}. Der resultierende Anstieg von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) öffnet Calciumkanäle im Endoplasmatischen Retikulum (RE) und führt so zu einem intrazellulären Anstieg der Calciumkonzentration {Chaudhari und Roper, 2010}. Dieser sorgt über die Öffnung von

Kationenkanälen in der Plasmamembran für eine Depolarisation der Rezeptorzelle im gustatorischen System und es kommt letztlich zur Freisetzung des Neurotransmitters ATP. Dieser stimuliert afferente gustatorische Nervenfasern und initiiert die Signalweiterleitung zum Gehirn {Chaudhari und Roper, 2010}. Neben der $\beta\gamma$ -Untereinheit scheint auch Gustducin einen Signalweg zu vermitteln, der über die Aktivierung der Phosphodiesterase für eine Reduktion des zyklischen Nukleotidspiegels in den Rezeptorzellen sorgt. Dieser könnte die Inaktivierung von Effektoren des Calciumsignalweges, wie PLC β -2 oder IP $_3$ -Rezeptor Typ 3 (IP $_3$ -R3), durch die Proteinkinase A verhindern {Yan et al., 2001; Clapp et al., 2008; Chaudhari und Roper, 2010}. Der genaue Mechanismus und sein Einfluss auf die Geschmackswahrnehmung sind jedoch noch unklar.

Die geschmacksspezifischen Komponenten der Signalkaskade, Gustducin und PLC β -2, werden in HEK293T-Zellen nicht exprimiert (siehe Abb. 3B). In diesem System fehlt eine G α -Untereinheit, die mit den TAS2Rs interagieren kann und endogene Phospholipasen aktiviert. Es fehlt die Kopplung der TAS2R-Aktivierung an den intrazellulären Calciumanstieg, der im heterologen System als Maß der Rezeptoraktivierung genutzt wird. Das murine G α_{15} und sein humanes Ortholog G α_{16} können durch eine Vielzahl von GPCRs aktiviert werden und ermöglichen die Signalweiterleitung zu endogenen Phospholipasen in heterologen Systemen {Offermanns und Simon, 1995; Krautwurst et al., 1998; Bufe et al., 2002}. Die fehlende Effizienz der Interaktion zwischen G α_{16} und den TAS2Rs konnte in den HEK-Zellen durch stabile Expression einer Proteinchimäre G α_{16} _{gust44}, bestehend aus G α_{16} und einer C-terminalen Gustducinsequenz von 44 Aminosäuren, optimiert werden. Während der G α_{16} -Teil die PLC- β aktiviert, interagiert die Gustducinsequenz mit den Bitterrezeptoren {Ueda et al., 2003}. HEK293-Zellen exprimieren PLC β -1 und -3, die als Effektoren in Frage kommen {Thomas et al., 2005}. Der intrazelluläre Calciumanstieg, ein Zwischenschritt der nativen Signalkaskade, wird dann im heterologen System fluorometrisch durch den fluoreszierenden Ca $^{2+}$ -Indikator Fluo4 nachgewiesen.

Ein weiterer Unterschied zum nativen System stellen die terminalen Modifikationen des Rezeptors dar, die für die Translokation in die Plasmamembran und den immunzytochemischen Nachweis des Rezeptors in den HEK-Zellen notwendig sind. Bis auf wenige Ausnahmen {Behrens et al., 2006} ist für eine erfolgreiche TAS2R-Translokation ein N-terminales Signalpeptid des Somatostatinrezeptors {Ammon et al., 2002} am Rezeptor notwendig {Bufe et al., 2002; Chandrashekar et al., 2000}. Da es bislang kaum spezifische TAS2R-Antikörper gibt {Behrens et al., 2012}, ist das C-terminale HSV-Epitop für immunzytochemische Expressionsnachweise notwendig. Trotz der benannten Unterschiede zeigte sich in den bisherigen Experimenten eine gute Korrelation zwischen

sensorischen Tests und dem *in vitro*-Assay. Die sensorisch und funktionell analysierten Allele der Rezeptoren TAS2R16, TAS2R38, TAS2R43 und TAS2R44 zeigten übereinstimmende Agonisten und Schwellen- bzw. EC₅₀-Werte {Soranzo et al., 2005; Bufe et al., 2005; Pronin et al., 2007; Roudnitzky et al., 2011}. Das heterologe Expressionssystem eignet sich demnach zur Identifizierung von Liganden und zur funktionellen Analyse einzelner Bitterrezeptorallele, bleibt jedoch nur ein Hilfsmodell, dessen Ergebnisse durch sensorische Studien verifiziert werden müssen.

1.6 Zielstellung der Arbeit

Die große genetische Diversität der 25 humanen Bitterrezeptoren (TAS2R) wurde bereits eingehend beschrieben {Ueda et al., 2001; Wooding et al., 2004; Kim et al., 2005}. Durch eine Vielzahl von Polymorphismen gibt es von jedem TAS2R-Gen mehrere Allele, die zum Teil ethnienpezifisch auftreten {Kim et al., 2005; Soranzo et al., 2005}. Die Kombination dieser TAS2R-Varianten bestimmt die individuelle Wahrnehmung des Bittergeschmacks. Funktionell unterschiedliche Allele konnten für die Rezeptoren TAS2R16, TAS2R38, TAS2R43 und TAS2R44 bereits in sensorischen und funktionellen Tests identifiziert werden {Soranzo et al., 2005; Bufe et al., 2005; Pronin et al., 2007; Roudnitzky et al., 2011}. Da der Bittergeschmack vor potenziell schädlichen Substanzen warnt und zur Ablehnung der Nahrung führt, könnten verschiedene Bittersensitivitäten einen direkten Einfluss auf die Nahrungsauswahl haben. In Zeiten von ernährungsbedingten Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2 oder Adipositas ist es, im Hinblick auf eine personenbezogene Beratung bzw. Therapie, ein zentrales Anliegen der Ernährungswissenschaften, genetische Dispositionen eines Menschen zu erkennen.

Der erste Schritt zur Aufklärung der molekularen Grundlage individueller Bitterwahrnehmung und Ziel dieser Arbeit ist die Bestimmung der pharmakologischen Eigenschaften aller häufigen Rezeptorvarianten, dh. mit einer Allelfrequenz von mindestens 5%, *in vitro*. Dazu wurden Rezeptorkonstrukte generiert, in unserem heterologen Zellmodell HEK293T_{Gα16gust44} exprimiert und in Calcium-Imaging-Experimenten durch Stimulation mit verschiedenen Bitterstoffen funktionell analysiert.

Fünf der 25 humanen Bitterrezeptoren sind noch orphan, da sie bislang keine Rezeptoraktivität *in vitro* zeigten {Meyerhof et al., 2010}. Ihre Agonisten und damit ihr Anteil an der Bitterwahrnehmung sind unbekannt. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit

war die Analyse der häufigsten orphanen Haplotypen mit dem Ziel, unter ihnen eine aktive Rezeptorvariante zu identifizieren. Dazu wurden über hundert Bitterstoffe im funktionellen Assay eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen Hinweise darauf geben, inwieweit die große genetische Vielfalt der Bitterrezeptoren auch in einer entsprechend funktionellen Vielfalt resultiert, die die molekulare Grundlage für Geschmacks- und weiterführend Ernährungsunterschiede zwischen Individuen bilden könnte.

2 Material

2.1 Geschmacksstoffe

Die verwendeten Geschmacksstoffe wurden entweder in der Literatur als bitter beschrieben oder bereits sensorisch getestet. Die Mehrheit wurde von Sigma-Aldrich, LGC Standards bezogen oder von Kooperationspartner (T. Hofmann, München; G. Appendino, Novara, Italien) zur Verfügung gestellt. Die Geschmacksstoffe wurden entweder in C1-Puffer oder in einer Mischung aus C1 und Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Wenn eine Endkonzentration von 0,1% (v/v) DMSO überschritten wurde, wurden DMSO-Kontrollen mitgeführt

2.2 Chemikalien

Die Mehrheit der Chemikalien wurde von Sigma, Merck oder VWR bezogen. Ausnahmen sind gekennzeichnet.

2.3 Primer

Primer für die Klonierung, Mutagenese und Genotypisierung bzw. Sequenzierung der Bitterrezeptoren wurden von Eurofins MWG bezogen. Die Sequenzen, Bindungsstellen und Anlagerungstemperaturen befinden sich im Anhang.

2.4 Expressionsvektoren

Die eukaryotischen Expressionsvektoren pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen) und der peak10 Vektor (EdgeBioSystems) wurden für die Modifizierung und Expression der Bitterrezeptoren benutzt {Bufo et al., 2002; Brockhoff et al., 2007}. Die zusätzliche EcoRI-Schnittstelle im Hygromycinresistenzgen des pcDNA5/FRT/TO wurde durch gezielte Mutagenese (Marcel Winning) zerstört. Der pEAK10 Vektor wurde in modifizierter Form freundlicherweise von Thomas Koch (Magdeburg) zur Verfügung gestellt. Durch beide Vektoren wurde den inklonierten, kodierenden Bitterrezeptorsequenzen N-terminal die

Sequenz der ersten 45 Aminosäuren des Ratten Somatostatinrezeptors Typ 3 (SST-Epitop) hinzugefügt, um die Translokation an die Zelloberfläche zu verbessern. C-terminal wurde die Bitterrezeptorsequenz ohne Stopp-Kodon, um das Glykoprotein-D-Epitop des Herpes Simplex Virus (HSV-Epitop) verlängert. Dies ermöglichte immunzytochemische Expressions- und Lokalisationsnachweise der TAS2Rs. Die Vektoren vermittelten eine Ampicillinresistenz, die bei der Vermehrung der Konstrukte in Bakterien genutzt wurde. Alle TAS2R-Konstrukte wurden durch Sequenzierung der kodierenden Region mit ihren terminalen Modifizierungen überprüft

2.5 Plasmide

2.5.1 deorphanisierte TAS2Rs

Tab. 1: Polymorphismen der Haplotypen deorphanisierter TAS2Rs

R1 peak10	nt	A332G C616T								
	as	H111R	R206W	%*						
	H1	R	R	72						PB856 ^{SK}
	H2	H	R	24						PB855 ^{SK}
R3	nt	C349T								
	as	P117S	%*							
	H1	P	99							PB192
R4 peak10	nt	G8A	A17C	T20C	T186A	C221T	G286C	G512A		
	as	R3Q	Y6S	F7S	F62L	T74M	V96L	S171N	%*	
	H1	R	Y	F	F	T	V	S	45	PB678 [§]
	H2	R	Y	S	F	T	L	N	31	PB859 ^{SK}
	H3	R	Y	F	F	T	L	N	11	PB858 ^{SK}
H4	R	Y	F	F	T	L	S	7	PB862	
R5 peak10	nt	G77T	C235T	C338T	A500G	G638A	G881T			
	as	S26I	R79C	P113L	Y167C	R213Q	R294L	%*		
	H1	S	R	P	Y	R	R	43		PB851
	H2	I	R	P	Y	R	R	38		PB847
H3	S	R	P	Y	R	L	6		PB863	
R7	nt	T254C	G538T	C640T		A787T	C788T	G912A		
	as	I85T	A180S	R214Stopp		T263S	T263M	M304I	%*	
	H1	I	A	R		T	T	M	89	PB95 [§]
H2	I	A	Stopp		T	T	I	6	PB864	
R8 peak10	nt	C142T	T370G	A496G	T829C	A922G				
	as	L48F	W124G	R166G	Y277H	M308V	%*			
	H1	L	W	R	Y	M	72			PB846
H2	L	W	R	Y	V	24			PB852	
R9	nt	C201A	C381A	T450A	T560C	G697A	G867T	C880A		

peak10	as	F67L	N127K	D150E	V187A	A233T	L289F	L294M	%*		
	H1	F	N	D	V	A	L	L	58	PB820	
	H2	F	N	D	A	A	L	L	32	PB819	
R10	nt	C467T	A521C	T691C							
	as	T156M	K174T	S231P	%*						
	H1	M	K	S	88					PB104 [§]	
	H2	T	K	S	9					PB865	
R13	nt	A776G									
	as	N259S	%*								
	H1	N	68							PB867	
	H2	S	32							PB128 [§]	
R14	nt	A256G	A589G								
	as	T86A	M197V	%*							
	H1	T	M	97						PB93	
R16	nt	G301A	C481T	T516G	G665A						
	as	V101M	P161S	N172K	R222H	%*					
	H1	V	P	N	H	59				PB91 [§]	
	H2	V	P	N	R	25				PB360 [§]	
	H3	V	P	K	H	14				PB259 [§]	
R38	nt	G145C	T785C	A886G							
	as	A49P	V262A	I296V	% ^{sw}						
	H1	P	A	V	56					PB260 [§]	
	H2	A	V	I	38					PB264 [§]	
	H3	A	A	I	3					PB266 [§]	
		PAV	I36								PB801
		PAV	G51								PB802
		PAV	R139								PB805
		PAV	S190								PB806
		PAV	K226								PB807
		PAV	F251								PB808
		AVI	Q64								PB803
		AVI	N275								PB810
		AAI	G135								PB804
	AAI	C274								PB809	
R39	nt	C578T	A589G								
	as	S193F	K197E	%*							
	H1	S	K	97						PB482 [§]	
R40	nt	C560A	A817G	G871A							
	as	S187Y	T273A	G291S	%*						
	H1	S	T	G	80					PB838 [§]	
	H2	Y	T	G	10					PB839 [§]	
	H3	S	T	S	7					PB867	
R43	nt	C104G	G599T	G635A	A889G	A916C					
	as	S35W	C200F	R212H	M297V	T306P	%*				
	H0	-	-	-	-	-	25				
	H1	S	C	R	M	T	41			PB161 [§]	
	H2	W	C	H	M	T	33			PB498 [§]	
R44	nt	C103T	T484A	G599A	C649G	C656T	C680T	G718A	C827G	G843T	

	as	R35W	L162M	C200Y	Q217E	P219L	A227V	V240I	P276R	W281C	%*	
H1	R	L	C	Q	P	A	V	P	W	41	PB350 [§]	
H2	R	M	C	Q	P	A	V	P	W	26	PB85 [§]	
H3	W	M	C	Q	P	V	I	P	W	25	PB349 [§]	
H4	W	M	C	E	P	V	I	R	W	6	PB756 [§]	
R46	nt	T106G	T682A	G749A	C834G	C862T						
	as	F36V	L228M	W250Stopp	I278M	Q288Stopp	%*	% ^{ST64}				
H1	F	L	W	I	Q		69	49			PB469 [§]	
H2	F	M	W	I	Q		6	26			PB811	
H3	F	M	Stopp	I	Q		21	25			PB812	
R47	nt	A521G	G756T	T842G								
	as	H174R	L252F	L281W	%*	% ^{ST64}						
H1	H	L	L	30	50						PB422 [§]	
H2	H	F	L	67	48						PB421 [§]	
H3	R	L	L	-	1						PB816	
H4	H	F	W	-	1						PB814	
R49	nt	A235G	G421A	C429A	C442A	A706G	T755C	G764T				
	as	K79E	V141I	H143Q	H148N	I236V	F252S	R255L	%*			
H1	K	V	H	H	I	F	R	39			PB868	
H2	E	V	H	H	I	F	R	26			PB563 [§]	
H3	K	V	Q	N	V	S	L	17			PB870	
H4	K	I	Q	N	V	S	L	12			PB869	
R50	nt	C155T	G181T	G608A								
	as	A52V	A61S	C203Y	%*							
H1	A	A	C	65							PB854	
H2	A	A	Y	33							PB94 [§]	

nt: Nukleotid

as: Aminosäure

Allelfrequenz: * = {Kim et al., 2005}; SW = {Wooding et al., 2004 }; ST64 = eigene Probandengruppe

Plasmidgenerierung: § = bereits in Abteilung vorhanden; SK = S.Kohl

laborinterne Bezeichnung: PB+Nr.

Expressionsvektor: pcDNA5 wenn nicht angegeben

2.5.2 orphane TAS2Rs

Tab. 2: Polymorphismen der Haplotypen orphaner TAS2Rs

R41 peak10	nt	C380T	T584A								
	as	P127L	V195D	%*	%#						
	H1	P	V	76	66						PB832
	H2	L	V	23	29						PB830
R42	nt	T524A	C587T	T763G	G782A	A794G	G875A	G931C			
	as	F175Y	S196F	W255G	W261Stopp	Y265C	R292Q	A311P	%*	%#	
	H1	F	S	W	W	Y	R	P	47	68	PB822
	H2	Y	F	G	W	Y	R	A	27	21	PB823
	H3	F	S	W	W	Y	R	A	21	7	PB544 [§]
R45 peak10	nt	A227G	G394A	G509A	G630C	T703C	T712C	G893C	A900G		
	as	Y76C	V132M	R170H	Q210H	F235L	C238R	R298T	Stopp	300W	%#
	H0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	> 17
	H1	C	M	R	H	L	C	T	W	≤ 42	PB824
	„	H2	Y	V	R	Q	F	R	Stopp	≤ 25	PB826
	„	H3	Y	V	R	Q	F	C	Stopp	≤ 11	PB845
pcDNA5	H4	C	M	H	H	L	C	T	W	≤ 2,5	PB825
R48 peak10	nt	G94A	A376C	C895T							
	as	V32I	K126Q	R299C	%*	%#					
	H1	V	K	R	46	49					PB827
	H2	V	K	C	31	45					PB828
	H3	I	K	R	11	4					PB829
R60 peak10	nt	C251T	A595T								
	as	P84L	M199L	%*	%#						
	H1	P	M	96	95						PB831

nt: Nukleotid

as: Aminosäure

Allelfrequenzen:

*= {Kim, 2005 #1}; # eigene Probandengruppe

Plasmidgenerierung:

§ = bereits in Abteilung vorhanden

laborinterne Bezeichnung: PB+Nr.

Expressionsvektor:

pcDNA5 wenn nicht angegeben

2.6 Eukaryotische Zelllinie

Die funktionellen Untersuchungen der Rezeptoren wurden in den humanen, embryonalen Nierenkrebszellen HEK293T durchgeführt. Die modifizierten Zellen exprimierten stabil und konstitutiv ein chimäres Ga16-Protein, dessen C-terminale Aminosäuren mit 44

Aminosäuren des Gustducins ausgetauscht waren (J.Slack/Givaudan Flavors Corp.). Das führte zu einer verbesserten Interaktion mit dem intrazellulären C-Terminus der Bitterrezeptoren {Ueda et al., 2003}.

2.7 Medien und Puffer für eukaryotische Zellen

Kultivierung:

DMEM 4,5 g/L Glukose (Invitrogen): FCS 10% (v/v); 2 mM Glutamin; 100 U/ml Penicillin; 100 mg/ml Streptomycin (alle Biochrom)

Waschen der Zellen und Lösen von Substanzen:

PBS (pH 7,4): 140 mM NaCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2,7 mM KCl; 1,76 mM KH₂PO₄

Waschen der Zellen und Lösen der Liganden beim Calcium-Imaging:

C1-Puffer (pH 7,4): 130 mM NaCl; 5 mM KCl; 10 mM HEPES; 2 mM CaCl₂; 10 mM Glucose

2.8 Bakterienstamm

Für die Transformation wurden chemisch kompetente *E.coli* TOP10 von Invitrogen verwendet.

2.9 Bakterienkultur

Medium (pH 7,2): 12,5 g Pepton; 7,5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; ad 1L H₂O

LB-Agarplatten (pH 7,2): 15 g Agar; 10 g Pepton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; ad 1L H₂O

SOC-Medium (pH 7,0): 2% Pepton; 0,5% Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 20 mM Glukose

2.10 Geräte

Elektrophoresekammer	Biometra
FLIPR ^{TETRA}	Molecular Devices
Geldokumentation	Syngene
Brutschrank	Heraeus
Mikroskop	Zeiss
Konfokales Mikroskop	Leica Microsystems
pH-Meter	Metrohm
Photometer	Thermo Scientific
Plattenwaschgerät	BioTek
Thermocycler	Biometra
Thermoschüttler	Eppendorf
Zentrifugen	Heraeus / Eppendorf
UV-Tisch	Stratagene

2.11 Software

Vector NTI 9	InforMax Inc. Europe, Oxford, UK
ContigExpress	InforMax Inc. Europe, Oxford, UK
Screenworks	Molecular Devices, München
CorelDraw 10	Corel Corporation, Unterschleissheim 17
ChemDraw Ultra 8.0	CambridgeSoft
Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems GmbH, München
SigmaPlot9	Systat Software GmbH
Netprimer	PREMIER Biosoft
Primer3	http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
PHASE2.0	http://www.stephenslab.uchicago.edu/software.html

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Genotypisierung und Haplotypbestimmung der Probanden

Aus den in 0,5 ml Speichel enthaltenen Zellen rekrutierter Probanden wurde genomische DNA (gDNA) mittels des *peQGOLD Blood DNA Mini Kits* (peQLab) nach Anweisung des Herstellers isoliert und die Konzentration anschließend spektrophotometrisch bestimmt. Die gezielte Amplifizierung der kodierenden TAS2R-Sequenz erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die aufgereinigten Rezeptorfragmente wurden extern durch die Firma Eurofins MWG sequenziert. Die resultierenden Sequenzchromatogramme wurden mit Hilfe der Software ContigExpress des VectorNTI-Softwarepaketes auf Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP) untersucht und der Genotyp des jeweiligen Probanden bestimmt. Resultierende Haplotypen konnten problemlos in homozygoten Probanden bestimmt werden. Bei heterozygoten Probanden ermöglichte entweder eine Klonierung des Rezeptors oder die Sequenzanalyse mittels PHASE2.0 die Haplotypenbestimmung.

3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) diente der Vervielfältigung der TAS2R-Loci für deren Sequenzierung oder anschließende Klonierung in einen Expressionsvektor. Da humane Bitterrezeptoren aus nur einem, etwa 1kb langen Exon bestehen, konnte die Vervielfältigung direkt aus gDNA erfolgen. Für die Klonierung neuer Bitterrezeptorvarianten wurde die PCR mit der Pfu-Polymerase (Promega) durchgeführt, die aufgrund ihrer 3'→5'-Exonukleaseaktivität eine sehr geringe Fehlerrate aufweist. Die Amplifizierung der Rezeptorgene für die Genotypisierung der Probanden erfolgte mit der *Advantage-Taq*-Polymerase (Clontech), die eine effiziente Vervielfältigung besonders aus genomischer DNA ermöglichte.

3.1.2.1 PCR für Genotypisierung

Zur Allelbestimmung des TAS2R41, -R42, -R45, -R46, -R47, -R48 und -R60 in den Probanden, wurde eine PCR mit der *Advantage-Taq*-Polymerase aus gDNA durchgeführt. Um eine fehlerfreie Sequenzierung der vollständigen kodierenden TAS2R-Region zu ermöglichen, wurden für die Vervielfältigung Primer eingesetzt, die mit flankierenden DNA-Bereichen des jeweiligen TAS2R-Locus hybridisierten (Primer siehe Anhang).

PCR Programm:

94°C	2 min	} 39 Zyklen
94°C	1 min	
Ta°C	1 min	
68°C	1 min	
Ta°C	5 min	
68°C	5 min	
4°C	∞	

Ansatz:

genomische DNA		20-100 ng
10 x Puffer		5,0 µl
dNTPs	[je 25 mM]	0,4 µl
P _{vorwärts}	[5 µM]	1,0 µl
P _{rückwärts}	[5 µM]	1,0 µl

Ta: Anlagerungstemperatur

3.1.2.2 PCR für Klonierung

Die PCR für eine spätere Klonierung neuer Rezeptorvarianten des TAS2R41, TAS2R42, TAS2R45, TAS2R46, TAS2R47, TAS2R48 und TAS2R49 H3/4 wurde mit der Pfu-Polymerase durchgeführt. Die Primer waren komplementär zum 5'- bzw 3'-Ende der kodierenden Region des jeweiligen TAS2R-Gens ohne terminales Stoppkodon. Der Vorwärtsprimer führte eine *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende und der Rückwärtsprimer eine *NotI*-Schnittstelle am 3'-Ende ein (Primer siehe Anhang). Dies ermöglichte die Klonierung des Rezeptorfragmentes in den Expressionsvektor mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen.



<u>PCR-Programm:</u>			<u>Ansatz:</u>	
94°C	2 min	} 38 Zyklen	genomische DNA	20-100 ng
94°C	1 min		10 x Puffer	5,0 µl
Ta°C	1 min		dNTPs [je 25 mM]	0,4 µl
72°C	2 min		P _{vorwärts} [5 µM]	4,0 µl
Ta°C	5 min		P _{rückwärts} [5 µM]	4,0 µl
72°C	5 min		Pfu-Polymerase	2 U
4°C	∞		H ₂ O ad	50,0 µl

3.1.2.3 Klonierungs-PCR stark homologer Bitterrezeptoren

Da die Gene des TAS2R45, -R46 und -R47 in ihren 5'- und 3'-Enden starke Sequenzhomologien aufweisen, war die spezifische Amplifizierung dieser TAS2Rs mit komplementären Primern aus gDNA nicht möglich. Es erfolgte zunächst eine Vervielfältigung des gewünschten TAS2R-Locus mit Primern, die in den deutlich heterogenen, flankierenden DNA-Bereichen der TAS2R-Gene banden (Primer Genotypisierung). Für eine effiziente Vervielfältigung in wenigen Zyklen, wurde diese PCR mit der *advantageTaq*-Polymerase durchgeführt. Dann folgte aus 5 µl dieses PCR-Ansatzes eine *nested*-PCR mit den, zum 5'- und 3'-Ende, komplementären Primern, der unter 3.1.2.2 beschriebenen Klonierungs-PCR.

<u>PCR-Programm:</u>			<u>Ansatz:</u>	
94°C	2 min	} 4 Zyklen	genomische DNA	20-100 ng
94°C	1 min		10 x Puffer	5,0 µl
Ta°C	1 min		dNTPs [je 25 mM]	0,2 µl
68°C	1 min		P _{vorwärts} [5 µM]	1,0 µl
4°C	∞		P _{rückwärts} [5 µM]	1,0 µl
			a. Taq-Polymerase	0,5 µl
			H ₂ O ad	25,0 µl

<u>PCR-Programm:</u>		<u>Ansatz:</u>	
36 Zyklen (siehe 3.1.2.2)		advantageTaq-PCR	5,0 µl
		10 x Puffer	5,0 µl
		dNTPs [je 25 mM]	0,4 µl
		P _{vorwärts} [5 µM]	4,0 µl
		P _{rückwärts} [5 µM]	4,0 µl
		Pfu-Polymerase	2 U
		H ₂ O ad	50,0 µl

3.1.2.4 PCR bei Klonierung mit alternativen Restriktionsschnittstellen

Es traten keine endogenen *NotI*-Schnittstellen in TAS2R-Genen auf, die die Klonierung aus gDNA behindert hätten. Die Allele des TAS2R42 und des TAS2R49 H3 und H4 besaßen jedoch endogene *EcoRI*-Restriktionsstellen. Statt durch den Vorwärtsprimer eine 5'-terminale *EcoRI*-Schnittstelle für die spätere Klonierung einzuführen, mussten für deren Amplifizierung aus gDNA und folgende Klonierung andere Strategien gewählt werden.

Beim TASR49 wurde 5'-terminal eine *MunI*-Schnittstelle eingeführt, die sich in einer Base von der *EcoRI*-Restriktionssequenz unterscheidet. Das Rezeptorfragment konnte anschließend in den *EcoRI*-verdauten Vektor ligiert werden, wobei die resultierende *EcoRI/MunI*-Schnittstelle nicht mehr verdaut werden kann. Das 3'-Ende wurde wie beschrieben über eine *NotI*-Schnittstelle mit dem Vektor ligiert. Die abweichende Base im Vorwärtsprimer führte zu einem Austausch der letzten Aminosäure des Somatostatin-Epitops von Phenylalanin zu Leucin.

Mit dem TASR42 musste aufgrund einer zusätzlichen endogenen *MunI*-Schnittstelle, anders verfahren werden. Es wurde eine 5'-*blunt*-/3'-*NotI*-Klonierung durchgeführt. Für die Vervielfältigung aus gDNA wurde ein Vorwärtsprimer benutzt, der mit einem Cytosin vor dem Startkodon beginnt (CATG...). Ligierte man das resultierende 5'-*blunt*-Ende in einen Vektor, dessen *EcoRI*-Schnittstelle durch das Klenowfragment aufgefüllt wurde, ergab sich eine intakte *EcoRI*-Stelle, wie in den anderen Rezeptorkonstrukten.

3.1.3 Gezielte Mutagenese mittels PCR

Statt einer Vervielfältigung aus gDNA mit anschließender Klonierung (siehe 3.1.2.2 und 3.1.2.3) wurden beschriebene Rezeptorvarianten der fehlenden TAS2Rs {Kim et al., 2005} durch die gezielte Einführung einer Punktmutation in bereits vorhandene Rezeptorkonstrukte generiert. Der Austausch einer DNA-Base erfolgte durch Amplifizierung mit Primern, die komplementär zur Rezeptorsequenz waren, jedoch statt der ursprünglichen, die einzubauende Base enthielten. In einer ersten PCR wurde ein 5'- und 3'-Fragment des TAS2R-Gens amplifiziert, die in einigen Basen komplementär waren. Das 5'-Fragment reichte vom Vektor-bindenden Vorwärts-Primer bis zum mutierenden Rückwärts-Primer, der in der zu modifizierenden, kodierenden Region band. Das 3'-Fragment ergab sich aus dem Vorwärts-Primer, der in derselben zu modifizierenden Region band und dem Rückwärtsprimer, der *downstream* mit dem Vektor hybridisierte (siehe Abb.

4). Beide Fragmente wurden durch Gelaufreinigung isoliert. In einer zweiten PCR wurden, die zum Teil komplementären 5'- und 3'-Rezeptorfragmente zusammengelagert und mittels Pfu-Polymerase verlängert. Anschließend erfolgte die Vervielfältigung der gesamten TAS2R-Sequenz mit flankierenden Bereichen durch die Vektorprimer. Das Rezeptorfragment wurde erneut aufgereinigt, konnte dann mit *EcoRI* und *NotI* verdaut und in einen Expressionsvektor ligiert werden.

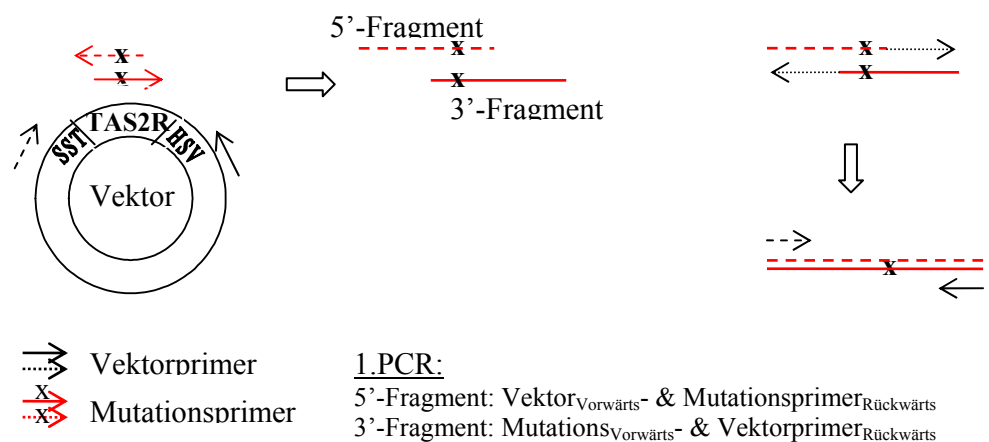
1. PCR2. PCR

Abb. 4: Schematische Darstellung der gezielten Mutagenese

1. PCR:PCR-Programm:

94°C	2 min	} 18 Zyklen
94°C	1 min	
Ta°C	1 min	
72°C	2 min	
Ta°C	5 min	
72°C	5 min	
4°C	∞	

Ansatz: je Fragment:

Plasmid	10 ng
10 x Puffer	5,0 µl
dNTPs [je 25 mM]	0,4 µl
P _{vorwärts} [5 µM]	4,0 µl
P _{rückwärts} [5 µM]	4,0 µl
Pfu-Polymerase	2 U
H ₂ O ad	50,0 µl

2. PCR:

TAS2R-Fragment: Vektorprimer
 Programm (siehe 1. PCR)

Ansatz Rezeptorfragment:

5'- & 3'-Fragment	10 ng
10 x Puffer	5,0 µl
dNTPs [je 25 mM]	0,4 µl
P _{vorwärts} [5 µM]	4,0 µl
P _{rückwärts} [5 µM]	4,0 µl
Pfu-Polymerase	2 U
H ₂ O ad	50,0 µl

3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Größe und Qualität der PCR-Produkte wurde stets durch eine elektrophoretische Auftrennung (25 min; 90 V) und Anfärbung in einem 1% Agarosegel (0,25 g Agarose in 25 ml TAE-Puffer) mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid überprüft. 5 µl PCR-Produkt wurden mit 1,2 µl 6 x Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurden 175 ng *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Fermentas) eingesetzt. Die Visualisierung der aufgetrennten DNA-Banden im Gel war durch die verstärkte Fluoreszenzintensität des interkalierten Ethidiumbromids unter UV-Licht möglich (Geldokumentation Gene Genius, Syngene).

TAE-Puffer (pH 8,0):

Tris-Base	4,84 g
Eisessig	11,42 ml
EDTA [0,5 M]	2,0 ml
H ₂ O	ad 1 L

6 x Ladepuffer:

Bromphenolblau	25 mg
Glycerin	3 ml
H ₂ O	7 ml

3.1.5 Aufreinigung PCR-Produkte

Für einen anschließenden Restriktionsverdau oder für die Sequenzierung, mussten die erhaltenen PCR-Produkte zunächst unter Einsatz des *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche) nach Herstellerangaben aufgereinigt werden.

3.1.6 Aufreinigung DNA-Fragmente aus Agarosegel

Um unerwünschte DNA wie unspezifische Banden, Fragmentenden nach Restriktion oder den Ursprungsvektor bei der Mutagenese vom gewünschten PCR-Produkt zu entfernen, wurden die PCR-Produkte zunächst elektrophoretisch aufgetrennt. Die gewünschte PCR-Bande konnte dann unter UV-Licht durch Größenvergleich mit dem Standard identifiziert und aus dem Gel geschnitten werden. Für die DNA-Aufreinigung aus dem Gel wurde der *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) nach Anweisung des Herstellers benutzt.

3.1.7 Isolierung von Plasmid-DNA

Aus 5 ml LB-Übernachtskulturen (50 µg/ml Ampicillin) wurde für analytische Zwecke (1-10 µg) Plasmid-DNA unter Einsatz des *JETquick Plasmid Miniprep Spin Kits* (Genomed) nach Anleitung des Herstellers isoliert. Präparative Plasmidmengen (100-500 µg) wurden aus 100 bis 200 ml Übernachtskulturen (50 µg/ml Ampicillin) unter Anwendung des *NucleoBond PC500 Plasmid Purification Kit* (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben isoliert.

3.1.8 Restriktionsverdau DNA für Klonierung

Für eine spätere Ligation wurden aufgereinigte Rezeptorfragmente, sowie die Expressionsvektoren pcDNA5/FRT/PM und peak10 mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NotI* (Fermentas) für mindestens 2 h bei 37°C nach Angaben des Herstellers verdaut und anschließend aufgereinigt.

EcoRI/NotI-Restriktion:

DNA	≤ 5,0 µg
10 x Puffer 0	4,0 µl
<i>EcoRI</i>	15 U
<i>NotI</i>	25 U
H ₂ O ad	40 µl

In die Rezeptorfragmente des TAS2R49 H3/4 mit endogenen *EcoRI*-Schnittstellen wurde bei der Vervielfältigung aus gDNA eine 5'-terminale *MunI*-Schnittstelle eingeführt. Der *MunI*-Verdau erfolgte nach Angaben des Herstellers Fermentas. Nach einer anschließenden Aufreinigung folgte ein *NotI*-Verdau wie zuvor beschrieben.

MunI-Restriktion:

DNA	≤ 5,0 µg
10 x Puffer G	4,0 µl
<i>MunI</i>	30 U
H ₂ O ad	40 µl

Rezeptorfragmente mit endogenen *EcoRI*-Schnittstellen (TAS2R8, TAS2R13), die durch gezielte Mutagenese gewonnenen wurden, enthielten terminal noch Vektorbereiche, deren Schnittstellen zur Klonierung genutzt werden konnten. Am 5'-Ende wurde, statt der *EcoRI*-Stelle nach der Somatostatinsequenz, die *HindIII*-Stelle vor dieser Sequenz genutzt. Auch

das Expressionsplasmid wurde für die Klonierung mit *Hind*III (Fermentas) nach Herstellerangaben verdaut. Nach einer anschließenden Aufreinigung folgte der *Not*I-Verdau wie beschrieben.

<i>Hind</i> III	<i>Not</i> I	<i>Eco</i> RI	<u><i>Hind</i>III-Restriktion:</u>	
SST	TAS2R	HSV	DNA	≤ 5,0 µg
			10 x Puffer G	4,0 µl
			<i>Hind</i> III	30 U
			H ₂ O ad	40 µl

3.1.9 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Um die Religation des Expressionsvektors zu verhindern, erfolgte eine Dephosphorylierung der 5'-Enden für 45 min bei 37°C durch die *shrimp alkaline phosphatase* (SAP, Roche) nach Herstellerangaben.

Dephosphorylierungsansatz:

Plasmid-DNA	≤ 5 µg
10 x SAP-Puffer	3,7 µl
SAP	3,6 U
H ₂ O ad	37 µl

3.1.10 Phosphorylierung von PCR-Fragmenten

Unverdaute PCR-Fragmente besitzen keine Phosphatgruppe am 5'-Terminus, die für eine Ligation in den dephosphorylierten Vektor notwendig ist. Deshalb musste bei der 5'*blunt*-Klonierung des TAS2R42 mit Hilfe der T4-Polynukleotid Kinase (USB) auf die 5'-Hydroxygruppe des Rezeptorfragmentes eine Phosphatgruppe übertragen werden. Die Durchführung entsprach den Herstellerangaben.

Phosphorylierungsansatz:

DNA	≤ 2 µg
T4-Kinase	90 U
ATP	75 µM
T4-Puffer	1 x

3.1.11 Auffüllen einzelsträngiger DNA

Für die 5'-blunt- und 3'-NotI-Klonierung des TAS2R42, musste der Einzelstrangbereich der EcoRI-Schnittstelle im Expressionsvektor aufgefüllt werden, indem der 5'→3'-Strang durch das Klenow-Fragment (Fermentas) verlängert wurde. Da das Klenow-Fragment im Restriktionspuffer 0 des EcoRI-Verdaus vollständig aktiv ist, konnte die Verlängerung direkt im Restriktionsansatz erfolgen. Die Durchführung entsprach den Herstellerangaben.

Klenow-Ansatz:

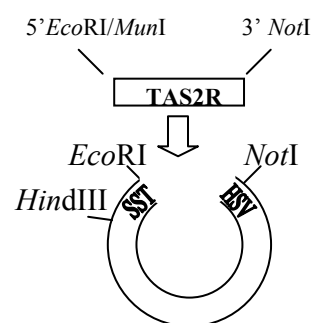
DNA-Verdau	5 µg
Klenow	6 U
dNTPs	je 38 µM

3.1.12 Ligation

Die verdauten und aufgereinigten Rezeptorfragmente wurden in die verdauten, dephosphorylierten Expressionsvektoren pcDNA5/FRT/PM oder peak10 mit entsprechenden Schnittstellen ligiert. Für die Ligation von Vektor und Rezeptor wurde der *Fast link DNA Ligation Kit* (Epicentre) nach Herstellerangaben verwendet, wobei diese in einem molaren Verhältnis von 1 zu 3 eingesetzt wurden.

Ligationsansatz:

Vektor	30 ng
Rezeptor	18 ng
10 x Puffer	1,5 µl
ATP [10 mM]	0,75 µl
Ligase	1,0 µl
H ₂ O ad	15,0 µl



3.1.13 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation von 20 µl chemisch kompetenten ($\sim 10^9$ Kolonien/µg DNA) *E.coli* TOP10 (Invitrogen) wurden entweder 0,6 µl Ligationsansatz ($\sim 1,2$ ng Plasmid) oder entsprechende Mengen vorhandener Plasmide eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min auf Eis, folgte für 30 sec ein Hitzeschock bei 42°C, der die Passage der DNA durch die bakterielle Zellmembran bewirkte. Nach kurzem Abkühlen wurden 150 µl SOC-Medium zum Ansatz gegeben und dieser für 1,5 h bei 37°C geschüttelt. Auf 2 LB-Agarplatten (50 µg/ml Ampicillin) wurden je Transformationsansatz 20 µl bzw. 130 µl ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert. Für die Isolierung von Plasmid-DNA konnten dann aus einzelnen Klonen 5 ml LB-Übernachtskulturen angeimpft werden. Um die Insertion der Rezeptorfragmente zu überprüfen, wurde ein Kontrollverdau des aufgereinigten Plasmids mit den entsprechenden Restriktionsenzymen durchgeführt und mittels Agarosegelelektrophorese auf das TAS2R-Fragment überprüft.

3.1.14 Sequenzierung von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten

Plasmide und die zu genotypisierenden Rezeptorfragmente wurden extern durch die Firma Eurofins MWG sequenziert. Der Sequenzierungsansatz (15 µl) enthielt entweder 150 ng Rezeptorfragment oder 1 µg Plasmid-DNA, sowie 30 pmol Primer. Die erhaltenen Sequenzchromatogramme wurden mit Hilfe der Software ContigExpress des VectorNTI-Softwarepaketes Vector NTI überprüft.

3.2 Zellbiologische Methoden

Die funktionellen Untersuchungen der TAS2Rs fanden in HEK293T-Zellen statt, die für eine effiziente Signalübertragung vom Rezeptor auf endogene Phospholipasen stabil die G-Proteinchimäre Gα16Gust44 exprimierten.

3.2.1 Kultivierung HEK293T_{Gα16Gust44}-Zellen

Die HEK293T_{Gα16Gust44}-Zellen wurden mit serumhaltigem DMEM, unter Zugabe von 200 µg/ml G418 (Calbiochem), bei 37°C, 5% CO₂-Partialdruck und in gesättigter Wasserdampfatosphäre in Brutschränken kultiviert. Passagiert wurden die Zellen wöchentlich unter Einsatz von Trypsin (0,05% (w/v) Trypsin; 0,5 EDTA in PBS). Die gelösten Zellen wurden abzentrifugiert (200xg; 5 min), in Medium resuspendiert und neu ausgesät.

3.2.2 transiente Transfektion

Für funktionelle Untersuchungen der Bitterrezeptoren wurden HEK293T_{Gα16Gust44}-Zellen in 96-well-Platten (schwarz/klarer Boden; Greiner) ausgesät. Für eine bessere Haftung der Zellen wurden die Platten zuvor 20 min mit Poly-D-Lysin (10 µg/ml in PBS) beschichtet und anschließend mit sterilem, bidestilliertem Wasser gewaschen. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Zellen bzw. das Einbringen der verschiedenen Bitterrezeptorkonstrukte mit dem Transfektionsreagenz *Lipofectamine2000* (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Das serumhaltige Medium auf den Zellen wurde durch 50 µl serumfreies DMEM je well ausgetauscht und dann mit 25 µl Transfektionsansatz (0,15 µg DNA; 0,3 µl *Lipofectamine* in serumfreien DMEM) je well versetzt. Bei allen Versuchen diente die Transfektion des entsprechenden Leervektors als Negativkontrolle. Nach 3-4 h erfolgte ein Mediumwechsel mit serumhaltigem Medium. Die Zellen wurden für weitere 20-24 h kultiviert.

3.2.3 Calcium-Imaging im FLIPR

Im HEK293-basierten *in vitro*-Modell wurde der intrazelluläre Calciumanstieg als Maß der Aktivierung des untersuchten Rezeptors genutzt. Durch den Einsatz eines calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fluo4-AM konnte in einem FLIPR^{Tetra} (*Fluorometric imaging plate reader*, Molecular Devices) die Rezeptoraktivierung fluorometrisch vermessen werden. Fluo4-AM chelatiert Ca²⁺-Ionen was zu einer Verstärkung der Fluoreszenzintensität führt. Das Calcium-Imaging-Experiment wurde 20-24 h nach transients Transfektion der Zellen

in den 96-*well*-Platten durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen mit serumfreiem DMEM, das 2 μM Fluo4-AM (Molecular Probes) und 2,5 μM Probenicid (Sigma-Aldrich) enthielt, beladen und für 1 h im Brutschrank kultiviert. Probenicid ist ein Inhibitor der zellulären, organischen Anionentransporter und verhindert das Ausschleusen des freien Farbstoffes nach intrazellulärer Spaltung durch Esterasen. Überschüssiger Farbstoff wurde durch dreimaliges Waschen mit C1-Puffer entfernt. Anschließend erfolgte die automatische Applikation der in C1 gelösten Bitterstoffe auf die Zellen unter Aufzeichnung der Fluoreszenzsignale (Anregung: 488 nm; Emission: 515 nm) im FLIPR^{Tetra}. Als Vitalitätskontrolle diente eine zweite Applikation von 100 nM Somatostatin-14 (SST-14; Bachem), welches den endogenen Somatostatinrezeptor Typ 2 {Law et al., 1993; Kagimoto et al., 1994} aktiviert. Als Negativkontrolle wurden die Bitterstoffe auf sogenannte Mock-Zellen appliziert, die lediglich mit dem Leervektor transfiziert waren. Da bei der Applikation auf die Zellen eine Verdünnung der Bitterstoffe erfolgte, wurden sie in entsprechend höheren Konzentrationen angesetzt.

Mess-Programm FLIPR^{Tetra}:

Aufzeichnung Basislinie:	10 Bilder à 2 s
Applikation Agonisten:	100 μl [flow 20 $\mu\text{l/s}$] 70 Bilder à 2 s
Aufzeichnung 2. Basislinie:	18 Bilder à 2 s
Applikation Kontrolle (SST-14):	50 μl [flow 25 $\mu\text{l/s}$] 70 Bilder à 2 s
Aufzeichnung 3. Basislinie:	12 Bilder à 10 s

3.2.4 Auswertung FLIPR-Daten

Daten wurden von mindestens zwei unabhängigen Experimenten, die im Duplikat durchgeführt wurden, ermittelt. Für die Berechnung von Dosis-Wirkungskurven wurden die maximalen Fluoreszenzänderungen der Mock-Zellen nach Applikation der Bitterstoffe von denen, der entsprechenden TAS2R-exprimierenden Zellen, abgezogen. Die Signale wurden für jedes *well* auf ihre Hintergrundfluoreszenz normiert ($\Delta F/F = (F-F_0)/F_0$) und Schwankungen der Basislinie ($\Delta F/F_{\text{Ligand}} - \Delta F/F_{\text{C1}}$) wurden abgezogen. Die Experimente wurden mit der FLIPR-Software Screenworks und anschließend mit SigmaPlot 9.0 ausgewertet. Durch das Auftragen der Fluoreszenzamplitude gegen den Logarithmus der entsprechenden Ligandenkonzentration ergaben sich Dosis-Wirkungskurven. Die halbmaximale effektive Ligandenkonzentration EC_{50} konnte daraus unter Anwendung der nichtlinearen Regressionsfunktion $f(x) = (a-d)/[1+(x/\text{EC}_{50})^{nH}] + d$ berechnet werden, wobei a

das Minimum, d das Maximum, x die Ligandenkonzentration und nH der Hill-Koeffizient ist.

3.2.5 Immunzytochemie

Mangels spezifischer TAS2R-Antikörper, wurde die Expression der verschiedenen Rezeptorvarianten und deren Lokalisation in der Plasmamembran durch den Nachweis des C-terminalen HSV-Epitops der Rezeptoren immunzytochemisch überprüft. Dazu wurden HEK293T_{G16Gust44}-Zellen in 24-well-Platten auf Poly-D-Lysin-beschichteten (10 µg/ml in PBS), runden Deckgläschen ausgesät und nach 24 h transient transfiziert (0,8 µg DNA; 3,2 µl Lipofectamine je well). Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 30 min auf Eis inkubiert. Die Färbung der Zelloberfläche erfolgte ebenfalls auf Eis. Die Zellen wurden für 1h mit biotinyliertem Concanavalin A (0,5 µg/ml in PBS; Sigma-Aldrich) inkubiert, welches an Glykoproteine der Zellmembran bindet. Nach Waschen mit eiskaltem PBS wurden die Zellen 2 min mit einem Methanol/Acetongemisch (v/v = 1:1) fixiert und permeabilisiert. Nun folgende Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Lösungsmittelreste wurden durch Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen wurden für 1 h mit Blockierlösung (PBS mit 4% Ziegen Serum) und anschließend mit dem monoklonalen Primärantikörper Maus anti-HSV Glykoprotein D Epitope (1:15.000 in Blockierlösung, Novagen) für 1 h inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Inkubation mit Alexa Fluor633-markiertem Streptavidin (1:1000, Molecular Probes) und dem Sekundärantikörper Alexa Fluor 488-markiertem Ziegen anti-Maus Immunglobulin G (1:2000, Molecular Probes) in Blockierlösung für den Zelloberflächen- bzw. Rezeptornachweis. Vor dem Fixieren mit Eindeckmedium (Fluorescent Mounting Medium, Dako) auf Objektträgern, wurden die Zellen mit PBS und abschließend mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Fluoreszenzbilder wurden an einem inversen, konfokalen Mikroskop (Leica DM IRE2) mit Laserlichtquelle (Leica TCS SP2), mit einem 40fachen Objektiv und einer Auflösung von 1024x1024 Bildpunkten aufgenommen. Alexa Fluor 488 wurde bei 488 nm angeregt und die emittierte Strahlung bei 500-530 nm detektiert. Alexa Fluor633 wurde bei 633 nm angeregt und bei 670-720 nm detektiert. Die beiden resultierenden Bilder wurden überlagert und deren Kontrast und Helligkeit mit dem Programm Adobe Photoshop optimiert.

4 Ergebnisse

4.1 Funktionelle Charakterisierung der häufigsten Haplotypen humaner Bitterrezeptoren

Bitterrezeptoren zeigen eine ungewöhnlich große genetische Diversität, die zu einer Vielzahl von funktionell unterschiedlichen Rezeptorvarianten führen könnte. Neben den resultierenden interindividuellen Unterschieden innerhalb einer ethnischen Gruppe, unterscheiden sich diese teilweise stark in der Häufigkeit verschiedener TAS2R-Allele {Ueda et al., 2001; Kim et al., 2005}. Das Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Analyse der häufigsten Varianten jedes Bitterrezeptors, um Aussagen über deren funktionelle Eigenschaften treffen zu können. Die Identifizierung der häufigsten Varianten bzw. Haplotypen für die fünf orphanen TAS2R-Loci erfolgte durch Genotypisierung einer Probandengruppe, die verschiedene Ethnien repräsentierte. Für die deorphanisierten TAS2Rs basierte die Auswahl auf der Datengrundlage von Kim et al. {2005}. Ausgewählt wurden alle Rezeptorvarianten, die eine Allelfrequenz von mindestens 5% aufwiesen, mit dem Ziel zusammen möglichst ~95% der sequenzierten Allele zu repräsentieren. Die neuen Varianten wurden zur funktionellen Analyse mittels Calcium-Imaging in Expressionsvektoren kloniert. Alle verwendeten Konstrukte wurden immunzytochemisch auf korrekte Rezeptorexpression und -lokalisierung untersucht (siehe Anhang). Die eingesetzten Bitterstoffe wurden auf der Grundlage der Veröffentlichung von Meyerhof et al. {2010} ausgewählt.

4.2 Orphane TAS2Rs

Aufwendige Untersuchungen mit zahlreichen Bittersubstanzen führten zur Deorphanisierung der meisten TAS2Rs. Für die fünf Rezeptoren TAS2R41, TAS2R42, TAS2R45, TAS2R48 und TAS2R60 blieb die Suche nach Liganden bislang jedoch erfolglos {Meyerhof et al., 2010}. Die Ergebnisse von Kim et al. {Kim et al., 2005} legten die Vermutung nahe, dass in vergangenen Experimenten möglicherweise mit nicht-funktionellen Varianten dieser Rezeptoren gearbeitet wurde. Um diese Möglichkeit zu untersuchen und unter der Annahme, dass es für jeden TAS2R mindestens eine funktionelle

Variante gibt, wurden im Folgenden die weltweit häufigsten Haplotypen dieser orphanen Rezeptoren funktionell analysiert.

4.2.1 häufigste Haplotypen orphaner TAS2Rs

In einer Gruppe aus europäischen, asiatischen und afrikanischen Probanden wurden durch Genotypisierung der fünf orphanen TAS2R-Loci alle auftretenden Haplotypen (H) bestimmt. Für den TAS2R41, TAS2R45 und TAS2R60 bestand diese Gruppe aus 3 Europäern, 12 Asiaten und 5 Afrikanern. Der TAS2R42- und TAS2R48-Locus wurde zusätzlich in 20 Europäern analysiert. Für den TAS2R41 und TAS2R45 misslang die Genotypisierung je eines Probanden, für den TAS2R42 betraf das 2 Probanden. Genomische DNA wurde aus Speichel der Probanden isoliert, die Gene mittels PCR amplifiziert und extern sequenziert. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen führte zur Identifizierung von synonymen und nichtsynonymen Einzelnukleotidpolymorphismen (sSNP bzw. nsSNP). Da sSNPs zu keinem Aminosäureaustausch führen, wurden diese im folgenden nicht berücksichtigt und in den Sequenzauswertungen weggelassen. Tab. 3 zeigt eine Zusammenfassung über die Anzahl aller vorkommenden Haplotypen, die Zahl der davon analysierten Haplotypen und deren Häufigkeit in den untersuchten Probanden.

Tab. 3: Übersicht aller identifizierten und analysierten Haplotypen

Dargestellt sind die Anzahl aller, in den genomischen DNA-Proben, identifizierten Haplotypen der orphanen Rezeptoren und die Anzahl dominierender Haplotypen. Letztere wurden kloniert und funktionell analysiert. In Prozent ist die Allelhäufigkeit im Probenpool angegeben. Die analysierten Haplotypen sollten mindestens 90% der der sequenzierten Allele repräsentieren.

	Haplotypen gesamt	Haplotypen analysiert	Frequenz [%]
TAS2R41	3	H1	68
		H2	<u>29</u>
		Σ	95
TAS2R42	5	H1	67
		H2	21
		H3	<u>07</u>
Σ	95		
TAS2R45*	6	(H0)	15
		H1	40
		H2	23
		H3	10
		H4	<u>03</u>
Σ	91		
TAS2R48	4	H1	49
		H2	45
		H3	<u>04</u>
Σ	98		
TAS2R60	3	H1	95

* Frequenzabweichungen wegen fehlender Nullallelbestimmung möglich (siehe 4.2.1.3)

Von den insgesamt 21 identifizierten TAS2R-Haplotypen, wurden die 13 häufigsten funktionell analysiert. Gezeigt sind im Folgenden für jeden einzelnen Rezeptor alle identifizierten nsSNPs (nt), der resultierende Aminosäureaustausch (as), alle identifizierten Haplotypen (H) und deren Allelfrequenz im gesamten Probenpool.

4.2.1.1 TAS2R41

Der TAS2R41 Locus wies die zwei nsSNPs C380T und C704A auf, woraus sich drei verschiedene Haplotypen ergaben. H1 und H2 waren in allen drei Bevölkerungsgruppen dominierend und wurden funktionell untersucht. Der H3 trat nur einmal heterozygot auf und wurde nicht analysiert. TAS2R41 H1 und H2 unterschieden sich im SNP C380T und damit in der 127. Aminosäure. H1 enthielt an dieser Position ein Prolin und H2 ein Leucin. Tab. 4

stellt zusammenfassend die polymorphen Positionen des TAS2R41 auf DNA- und Aminosäureebene dar, sowie die identifizierten Haplotypen. Die Allelfrequenz der häufigsten Haplotypen in der gesamten Probandengruppe und in den einzelnen ethnischen Gruppen ist prozentual dargestellt. Der Anteil an Allelen die weitere, seltene Haplotypen tragen, ist unter „andere“ dargestellt.

Tab. 4: Haplotypen des TAS2R41 und ihre Allelfrequenz

TAS2R41	nt as	C380T P127L	C704A S235Y	%
H1		P	S	68.4
H2		L	S	29
H3		P	Y	2,6

Die zwei analysierten TAS2R41-Varianten fanden sich in 95% der sequenzierten Allele. Ihre Verteilung in den verschiedenen ethnischen Gruppen ist in Abb. 5 dargestellt.

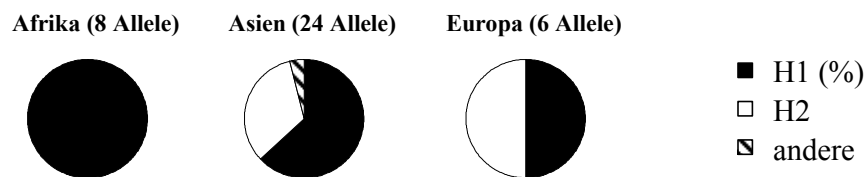


Abb. 5: Häufigkeit der TAS2R41-Haplotypen in den analysierten ethnischen Gruppen

Die analysierten Gruppen unterschieden sich in ihrer Allelfrequenz. Während beide vorherrschenden Varianten fast gleich stark in den asiatischen und europäischen Probanden auftraten, waren die afrikanischen Probanden alle homozygot für den TAS2R41 H1.

4.2.1.2 TAS2R42

Der TAS2R42 wies sechs nsSNPs und ein *nonsense*SNP, welches zu einem vorzeitigen Stoppkodon führte, auf. Diese Polymorphismen resultierten in fünf Haplotypen, von denen drei besonders häufig waren und für die funktionelle Analyse kloniert wurden. Diese Haplotypen wiesen vier der sechs polymorphen Positionen auf, die in der folgenden Tabelle genauer dargestellt sind. Der H1 war durch F175/S196/W255/P311, der H2 durch Y175/F196/G255/A311 und der H3 durch F175/S196/W255/A311 definiert (siehe Tab. 5).

Die seltenen Varianten H4 und der verkürzte H5 des TAS2R42 wurden nicht analysiert. Die drei häufigsten TAS2R42-Varianten H1 bis 3 stellten 95% der analysierten Allele dar.

Tab. 5: Haplotypen des TAS2R42 und ihre Allelfrequenz

TAS2 R42	nt as	T524A F175Y	C587T S196F	T763G W255G	G782A W261Stopp	A794G Y265C	G875A R292Q	G931C A311P	%
H1		F	S	W	W	Y	R	P	67
H2		Y	F	G	W	Y	R	A	21
H3		F	S	W	W	Y	R	A	7
H4		Y	F	W	W	C	Q	P	2,6
H5		Y	F	G	Stopp	Y	R	A	1,4

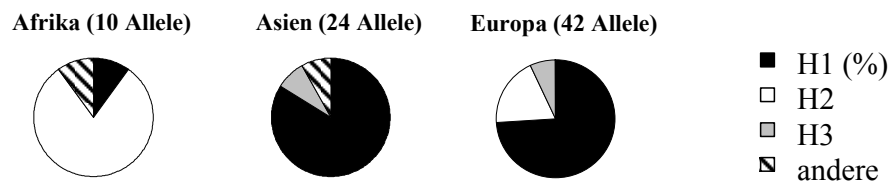


Abb. 6: Häufigkeit der TAS2R42-Haplotypen in den analysierten ethnischen Gruppen

Wie das Diagramm deutlich zeigt, war das Auftreten der vier TAS2R42-Haplotypen in den drei analysierten ethnischen Gruppen sehr unterschiedlich. Während in der asiatischen und europäischen Gruppe der H1 mit einer Frequenz von mindestens 75% überwog, war dies in den afrikanischen Probanden der H2. Der TAS2R42 H2 trat nicht bei den asiatischen Probanden auf und der H3 fand sich nur bei den asiatischen und europäischen Probanden.

4.2.1.3 TAS2R45

Der TAS2R45 wies mit acht nsSNPS und fünf resultierenden Haplotypen unter den orphanen Rezeptoren die größte genetische Variabilität auf. Das folgende Gelbild zeigt den, zur Genotypisierung aller Probanden, amplifizierten TAS2R45-Locus. Bei drei (Nr. 5, 10, 13) von sechs afrikanischen Probanden trat kein PCR-Produkt auf. Sie besaßen demnach kein TAS2R45-Allel und waren somit homozygot für das Nullallel (H0). Die Proben Nr.12 und 17 zeigten sehr schwache Banden, deren Sequenzierung nicht möglich war. Diese Probanden wurden nicht berücksichtigt. Die Degradierung der DNA als Ursache für

fehlende PCR-Banden konnte ausgeschlossen werden, da die Amplifizierung der anderen vier TAS2Rs aus derselben DNA-Probe möglich war.

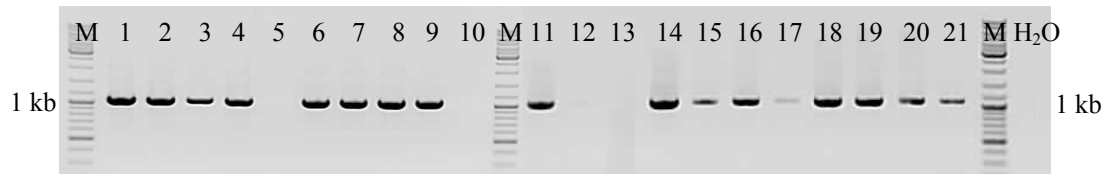


Abb. 7: Amplifizierung des TAS2R45-Locus aus Probanden-DNA

Dargestellt ist das PCR-Produkt der TAS2R45-Amplifizierung aus gDNA bei ca. 1100 bp nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 1,5% Agarosegel.

Die Deletion des TAS2R45-Gens wurde bereits in der Literatur beobachtet und analysiert {Pronin et al., 2007; Roudnitzky et al., 2011}. Aufgrund eines fehlenden *copy-number*-Assays, der eine Bestimmung der TAS2R45-Allelanzahl jedes Probanden mittels quantitativer PCR ermöglicht, war die Frequenz des Nullallels in der Probandengruppe nicht bekannt. Deshalb können die tatsächlichen Häufigkeiten von den angegebenen abweichen und wurden in Tab. 6 nur näherungsweise dargestellt. Von den fünf Haplotypen wurden vier kloniert und funktionell analysiert. Sie wiesen alle identifizierten Polymorphismen auf.

Tab. 6: Haplotypen des TAS2R45 und ihre Allelfrequenz

TAS2R 45	Nt A227G As Y76C	G394A V132M	G509A R170H	G630C Q210H	T703C F235L	T712C C238R	G893C R298T	A900G Stopp300 W
H0	-	-	-	-	-	-	-	-
H1	C	M	R	H	L	C	T	W
H2	Y	V	R	Q	F	R	R	Stopp
H3	Y	V	R	Q	F	C	R	Stopp
H4	C	M	H	H	L	C	T	W
H5	C	M	R	H	L	C	R	W

TAS2R45	%
H0	>15
H1	≤ 40
H2	≤ 23
H3	≤ 10
H4	≤ 2,5
H5	≤ 2,5

Auffällig war, dass sich jeweils zwei Haplotypen, der H1 vom H4 und der H2 vom H3, in nur einer Position unterschieden, während beide Rezeptorpaare voneinander in fast allen

polymorphen Positionen abwichen. Eine Besonderheit des TAS2R45 ist das nsSNP A900G, welches das Stoppkodon in ein Tryptophankodon umwandelt. Statt einer Länge von 299 As wiesen der H1, H4 und H5 ein um zehn Aminosäuren verlängertes Protein auf. Dies entsprach, mit einer Länge von 309 As, den stark homologen Rezeptoren TAS2R43, TAS2R44 und TAS2R46. Die zusätzlichen Aminosäuren stimmten in neun von zehn Positionen ebenfalls mit der Sequenz dieser Rezeptoren überein.

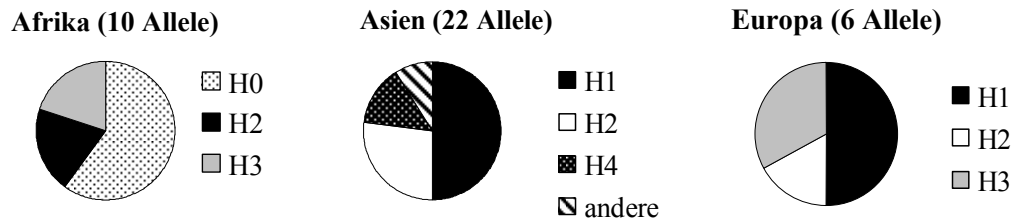


Abb. 8: Häufigkeit der TAS2R45-Haplotypen in den analysierten ethnischen Gruppen

Die Allelfrequenzen der vorherrschenden TAS2R45-Varianten unterschieden sich stark in den analysierten Gruppen. Das Nullallele (H0) trat homozygot nur in der afrikanischen Gruppe auf. Während der H1, gefolgt vom H2, die Mehrheit der asiatischen und europäischen Allele darstellte, traten in den zwei afrikanischen Probanden nur die kurzen varianten H2 und H3 des TAS2R45 auf. Der H4 kam zu einem geringen Anteil ausschließlich in den asiatischen Probanden vor.

4.2.1.4 TAS2R48

Die Sequenzanalysen des TAS2R48 ergaben drei nsSNPs G94A, A376C und C895T. Daraus resultierten vier Haplotypen, von denen drei vorherrschend waren und funktionell analysiert wurden. Der H1 war durch V32/K126/R299, der H2 durch V32/K126/C299 und der H3 durch I32/K126/R299 definiert (siehe Tab. 7).

Tab. 7: Haplotypen des TAS2R48 und deren Häufigkeit

TAS2R48	nt as	G94A V32I	A376C K126Q	C895T R299C	%
H1		V	K	R	49
H2		V	K	C	45
H3		I	K	R	4
H4		V	Q	R	2

Die drei häufigsten Haplotypen stellten zusammen 98% der sequenzierten Allele dar.

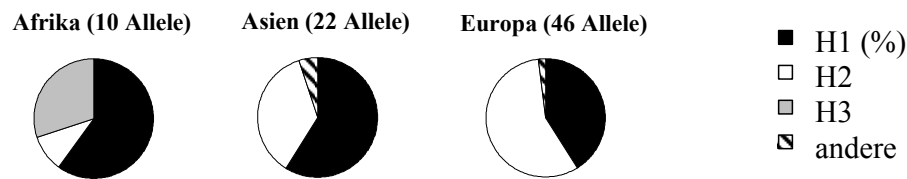


Abb. 9: Häufigkeit der TAS2R48-Haplotypen in den analysierten ethnischen Gruppen

Der TAS2R48 H1 und H2 bildeten die Mehrheit aller Allele in den drei Gruppen. Der H3 trat ausschließlich bei den afrikanischen Probanden auf, während sich seltene, zusätzliche Haplotypen in den asiatischen und europäischen Probanden fanden.

4.2.1.5 TAS2R60

Für den TAS2R60 wurden die zwei polymorphen Stellen C251T und A595T identifiziert, die in drei Haplotypen resultierten. Der H1 war durch P84/M199, der H2 durch L84/L199 und der H3 durch P84/L199 definiert.

Tab. 8: Haplotypen des TAS2R60 und ihre Allelfrequenz

TAS2R60	nt as	C251T P84L	A595T M199L	%
H1		P	M	95
H2		L	L	2,5
H3		P	L	2,5

Der H1 fand sich in 95% der sequenzierten Allele und stellt die weltweit dominierende TAS2R60-Variante dar (siehe Abb. 10).

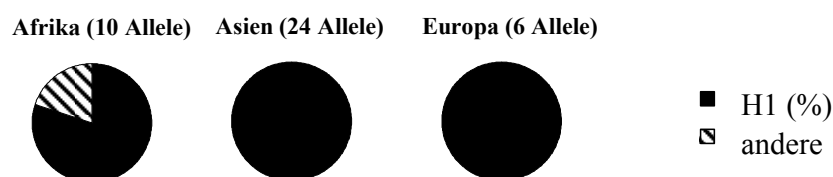


Abb. 10: Häufigkeit der TAS2R60-Haplotypen in den analysierten ethnische Gruppen

Die beiden seltenen TAS2R60-Varianten H2 und H3 traten nur bei wenigen afrikanischen Probanden auf und wurden nicht analysiert.

4.2.2 Calcium-Imaging der orphanen TAS2R-Haplotypen

Die Konstrukte der häufigsten Haplotypen wurden generiert und für jeden Bitterrezeptor gepoolt. Je *well* wurden insgesamt 150 ng des TAS2R-Pools in HEK293T_{G16Gust44}-Zellen transfiziert. Bei maximal vier gepoolten Haplotypen für TAS2R45 ergaben sich damit in jedem *well* 37,5 ng je Konstrukt. Für TAS2R42 und TAS2R48 mit je drei Varianten ergaben sich 50 ng und von den beiden TAS2R41 Haplotypen wurden jeweils 75 ng transfiziert. Vom TAS2R60 wurde nur der einzelne, häufigste Haplotyp analysiert. Zunächst wurde überprüft, ob die Reduktion der üblichen Plasmidmenge von 150 ng einen Einfluss auf die Signalstärke im Calcium-Imaging-Experiment hat. Dazu wurden steigende Plasmidmengen des TAS2R38 transfiziert und das resultierende Fluoreszenzsignal nach Applikation von 100 μ M Phenylthiocarbamid (PTC) bestimmt.

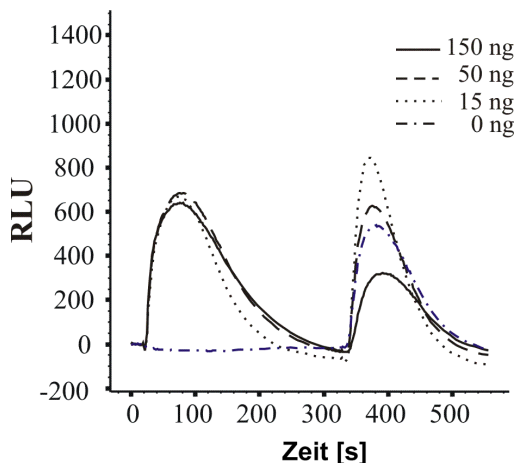


Abb. 11: Einfluss steigender Plasmidmengen auf TAS2R-Signale

HEK293T_{G16Gust44}-Zellen wurden mit 0, 15, 50 oder 150 ng TAS2R38 Plasmid je *well* transfiziert. Nach 24 h wurden Calcium-Imaging-Experimente im FLIPR^{TETRA} durchgeführt. Dargestellt sind die Fluoreszenzsignale nach Applikation von 100 μ M Phenylthiocarbamid gefolgt von 100 nM Somatostatin-14 als Vitalitätskontrolle.

Abb. 11 zeigt deutlich, dass die Reduktion der Plasmidmenge von 150 ng auf 15 ng zu keiner Verringerung des TAS2R38-Signals, nach Aktivierung durch 100 μ M PTC, führte.

Somit konnten die Pools, statt der einzelnen TAS2R-Konstrukte, ohne Signalverluste eingesetzt werden.

In den Calcium-Imaging-Experimenten wurden die fünf TAS2R-Pools auf eine Aktivierung durch 106 synthetische und natürliche Bitterstoffe untersucht. Diese repräsentierten die verschiedensten Substanzgruppen wie Alkaloide, Glycoside, Phenole, *N*-Heterozyklen, Aminosäuren, Peptide, Kronenether oder Metallionen (Auflistung siehe Tab. 9). Es wurden 30 Bittersubstanzen eingesetzt, deren zugehöriger TAS2R bislang unbekannt war und unter den Allelen der orphanen TAS2Rs vermutet wurde. Für die anderen Substanzen waren aktivierbare TAS2Rs bekannt, welche als Positivkontrolle dienten. Alle Bitterstoffe wurden in der höchsten Konzentration eingesetzt, die nicht zu Rezeptor-unspezifischen Signalen (Artefakten) führte. Für fünf Substanzen (Arglabin, Humolon, 4-Hydroxyanisol, Kreatinin und Tatrudin A) zeigten die, zuvor als aktivierbar bezeichneten TAS2Rs kein Signal {Meyerhof et al., 2010; nicht veröffentlicht}. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit 150 ng Leervektor transfiziert waren.

Tab. 9: Im Calcium-Imaging der orphanen TAS2Rs getestete Bitterstoffe

Die Bitterstoffe wurden in angegebener Konzentration [mM] auf HEK293T_{G16Gust44}-Zellen appliziert, die jeweils einen TAS2R-Pool exprimierten oder den Kontrollrezeptor. (K+ = Positivkontrolle; n = kein aktivierbarer TAS2R als K+ bekannt; - = kein Signal)

Substanz	Konz. [mM]	K+	TAS2R	Substanz	Konz. [mM]	K+	TAS2R
Absinthin	0,1	+	-	Hydrocortison	0,03	+	-
2-Acetylpyrazin	3,3	n	-	4-Hydroxyanisol	3	-	-
Aloin	0,03	+	-	3-(2-Hydroxyethyl)-indol	3	+	-
Allylisothiocyanat	1	+	-	Kreatinin	30	-	-
Amarogentin	1	+	-	Limonin	0,3	+	-
Amygdalin D	10	+	-	L-Lysin	30	n	-
Antipyrin	0,1	n	-	Magnesiumsulfat	10	n	-
Acesulfam-K	10	+	-	Methimazol	3	+	-
Arbutin	1	+	-	Naringin	0,03	n	-
Arglabin	0,3	-	-	Natriumbenzoat	10	+	-
Atropin	0,1	+	-	Natriumcyclamat	30	+	-
Benzamid	0,3	n	-	Neohesperidin	0,1	n	-
Brucin	0,1	+	-	Nikotin	0,1	n	-
Campher	1	+	-	Nikotinsäure	40	n	-
Caprolactam	10	+	-	Noscapin	0,01	n	-
Carisoprodol	0,1	+	-	Ofloxacin	3	+	-
Cascarillin	0,05	+	-	Orphenadrin	0,03	+	-
Chinin-HCl	0,01	+	-	Ouabain	3	n	-

Substanz	Konz. [mM]	K+	TAS2 R	Substanz	Konz. [mM]	K+	TAS 2R
Absinthin	0,1	+	-	Hydrocortison	0,03	+	-
Chininsulfat	0,03	+	-	Pantothensäure	3	+	-
Chloramphenicol	0,3	+	41	Papaverin	0,03	+	-
Chlorogensäure	1	n	-	2-Phenylethylisothiocyanat	0,1	+	-
Chlorpheniramin	0,1	+	-	Penicillin G	20	+	-
Chloroquin	1	+	-	Phenanthrolin	1	+	-
Coffein	3	+	-	Phenylbutazon	0,1	+	-
Colchicin	3	+	-	Picrotin	3	+	-
Costunolid	0,2	+	-	Picrotoxinin	1	+	-
Coumarin	1	+	-	Piperonylsäure	3	+	-
Cromolyn	10	+	-	Phenylthiocarbamid	0,1	+	-
Crotalin	0,3	n	-	Pyrocatechol	3	n	-
Curcubitacin B	66	+	-	Quassin	0,1	+	-
Curcubitacin E	66	+	-	Quinacrin	0,01	n	-
Cycloheximid	1	+	-	Saccharin	10	+	-
Dapson	0,1	+	-	Sucroseoctaacetat	0,5	+	-
Denatonium Benzoat	1	+	-	Salicin	10	+	-
Dextromethorphan	0,01	+	-	Sinigrin	1	+	-
Dibenzo-18-Krone-6	0,2	n	-	Sparteïn	1	+	-
Dicyclomin	0,3	+	-	Spiro nolacton	0,03	+	-
Digitonin	0,00003	n	-	Solanin	0,01	n	-
Dihydrophenanthren	0,1	n	-	Solanidin	0,03	n	-
Diphenhydramin	0,03	+	-	Strychnin	0,03	+	-
Diphenidol	0,1	+	-	Sulfobromophthaleïn	0,3	n	-
Doxepin	0,01	n	-	Sulforaphan	0,3	n	-
Emetin	0,03	n	-	Sulfisoxazol	3	n	-
Epicatechin	1	+	-	Tanninsäure	0,03	+	-
Epigallocatechingallat	0,1	+	-	Tatridin A	1	-	-
Erythromycin	0,3	+	-	Theobromin	2	n	-
Ethylpyrazin	3	+	-	Thiamin	6	n	-
Goitrin	0,3	+	-	a-Thujon	0,1	+	-
Grossheimin	0,1	+	-	Tributyryn	20	n	-
Guaiacolglyzerinether	10	+	-	Trigonellin	6	n	-
Harnstoff	10	n	-	L-Tryptophan	20	+	-
Helicin	3	+	-	Trp-Trp-Trp	0,3	+	-
Humolon	0,003	-	-	Xanthotoxin	0,3	+	-

Die Applikation des Antibiotikums Chloramphenicol führte zu einer Aktivierung des TAS2R41-Pools. Als Positivkontrolle diente der TAS2R46 H1.

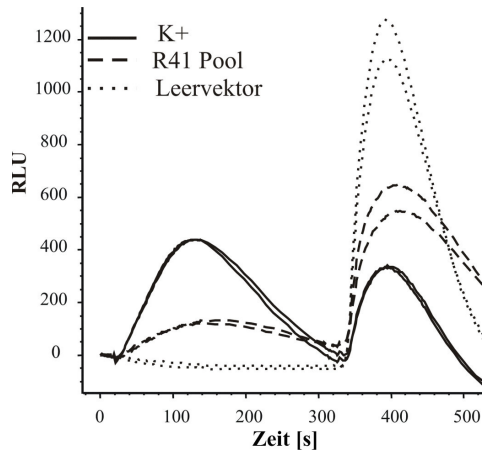


Abb. 12: Fluoreszenzsignale des TAS2R41-Pools nach Aktivierung durch Chloramphenicol

HEK293T_{G16Gust44}-Zellen wurden mit 150 ng Leervektor, 50 ng TAS2R46 H1 als Positivkontrolle oder mit 150 ng TAS2R41-Pool transfiziert. Dargestellt sind Calcium-Signale nach Applikation von 0,3 mM Chloramphenicol und 100 nM Somatostatin-14, als Vitalitätskontrolle.

Alle anderen Substanzen führten weder zu einer Aktivierung der TAS2R41-Haplotypen, noch zu Signalen in den anderen TAS2R-Pools. Für die 30 Bitterstoffe ohne bekannten TAS2R konnte unter den getesteten Haplotypen der orphanen TAS2Rs kein aktivierbarer Rezeptor identifiziert werden. Die häufigsten Haplotypen der Bitterrezeptoren TAS2R42, TAS2R45, TAS2R48 und TAS2R60 blieben orphan.

4.2.3 Funktionelle Charakterisierung der TAS2R41-Haplotypen mit Chloramphenicol

Für eine genauere funktionelle Charakterisierung wurden von beiden TAS2R41-Haplotypen Dosis-Wirkungskurven erstellt. Aufgrund von Artefakten in höheren Konzentrationen, konnte Chloramphenicol nur bis zu einer Konzentration von 1 mM eingesetzt werden. Da keine Sättigung des Signals erreicht wurde, wurden Schwellenwerte ermittelt.

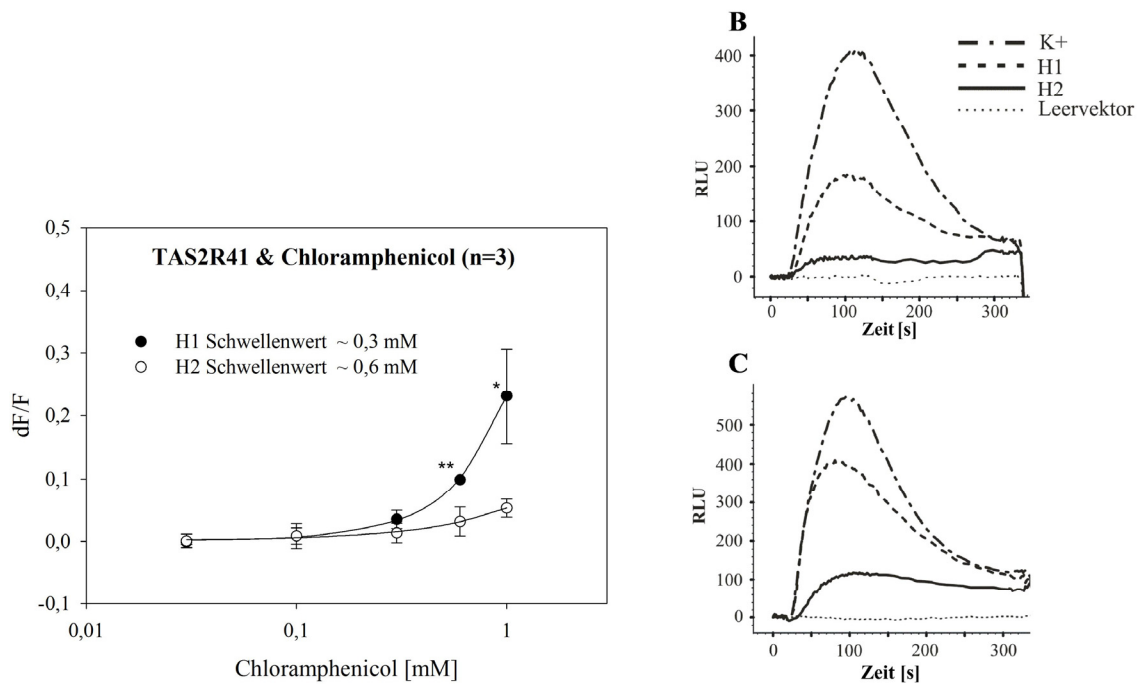


Abb. 13: Dosis-Wirkungskurve der TAS2R41-Haplotypen mit Chloramphenicol

HEK293T_{G16Gust44}-Zellen wurden mit 150 ng Plasmid transfiziert. Dargestellt sind Dosis-Wirkungskurven der beiden TAS2R41-Haplotypen mit Chloramphenicol, sowie repräsentative Fluoreszenzsignale bei 0,3 mM (B) bzw. 1 mM (C) Chloramphenicol. Aufgetragen wurden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Auswertung T-Test.

Beide Haplotypen konnten durch Chloramphenicol aktiviert werden, zeigten jedoch unterschiedliche Signalamplituden und Sensitivitäten. Bei 1 mM Chloramphenicol erreichte die Amplitude des H1 $0,23 \pm 0,08$ und die des H2 $0,05 \pm 0,01$. Der Schwellenwert lag für den H1 bei 0,3 mM und für den H2 bei 0,6 mM. Der TAS2R41 H1 war die sensitivere und reaktivere Variante. Die Signalhöhe des H1 bei 0,3 mM Chloramphenicol entsprach auch der Amplitude des TAS2R41-Pool, sodass kein Verdünnungseffekt durch die halbierte Plasmidmenge auftrat.

Der weniger sensitive TAS2R41 H2 entsprach der Rezeptorvariante, die in vorherigen Versuchen, unter anderem auch mit Chloramphenicol, bereits eingesetzt wurde {Meyerhof et al., 2010}. Dass sich in dieser Arbeit eine Aktivierung zeigte, lag wahrscheinlich an den unterschiedlichen Expressionsplasmiden, peak10-Vektor in dieser Arbeit und pcDNA5 in der zitierten Publikation. Das TAS2R41 H2-Konstrukt im pcDNA5-Vektor führt zu sehr kleinen Signalen, die nah am Detektionslimit lagen, während mit dem peak10-Vektor höhere Signale erreicht wurden (siehe Abb. 14). Derselbe Effekt zeigte sich auch beim TAS2R9 (Daten nicht gezeigt).

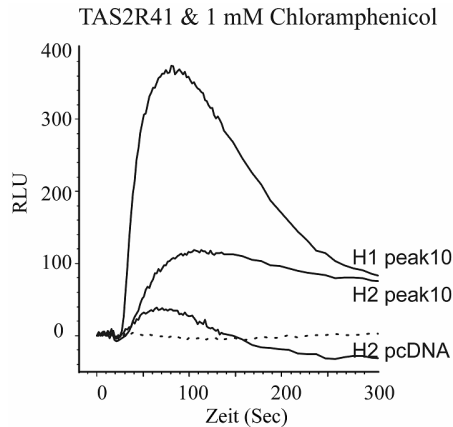


Abb. 14: Fluoreszenzsignale des TAS2R41 H2 in verschiedenen Expressionsvektoren

A: Dargestellt sind Fluoreszenzsignale von HEK293T_{G16gust44}-Zellen die mit Konstrukten des TAS2R41 H2 im peak10- oder pcDNA5-Vektor transfiziert wurden, sowie mit dem TAS2R41 H1 und dem Leervektor (gepunktet). Das Calcium-Imaging-Experiment wurde mit 1 mM Chloramphenicol durchgeführt.

Eine mögliche Ursache für die höheren Signale könnte eine höhere Transfektionseffizienz des peak10-Konstrukts oder eine höhere Expression des Rezeptors in den transfizierten Zellen sein. Der immunzytochemische Nachweis der Rezeptorexpression, zeigt etwas mehr TAS2R41-exprimierende Zellen und damit eine etwas stärkere Effizienz des peak10- gegenüber dem pcDNA5-Konstrukt (Abb. 15).

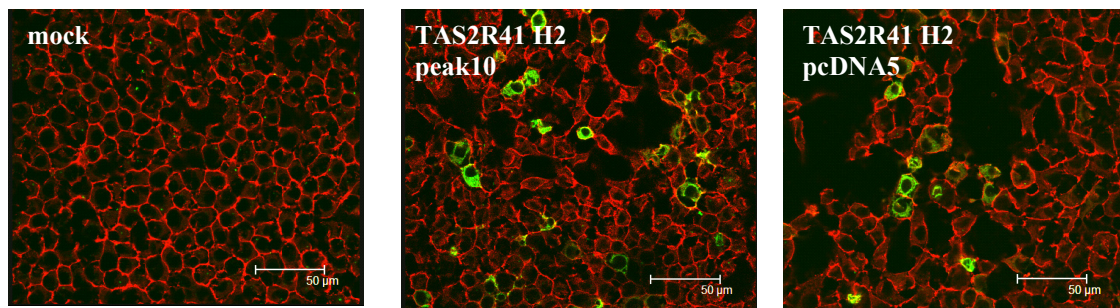


Abb. 15: Expressionsrate des TAS2R41 H2 in verschiedenen Expressionsvektoren

Dargestellt ist die Expression des TAS2R41 H2 in HEK293T_{G16gust44}-Zellen die mit einem peak10- oder pcDNA5-Konstrukt transfiziert wurden. Der Nachweis erfolgte immunzytochemisch. Der Rezeptor ist grün und die Zellmembran rot dargestellt. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden (mock).

Ob diese Unterschiede ausreichen, um höhere Signale zu produzieren bleibt unklar. Abbildung Abb. 16 stellt das Rezeptormodell des TAS2R41 mit markiertem Polymorphismus dar.

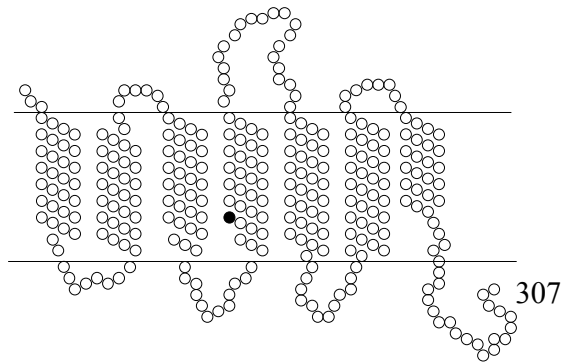


Abb. 16: TAS2R41-Rezeptormodell mit markiertem Polymorphismus

Markiert ist der Aminosäureaustausch P127L, der in den beiden häufigsten TAS2R41-Haplotypen vorkam.

Der konservative Austausch der 127. Aminosäure in der vierten Transmembrandomäne von Prolin im H1 zu Leucin im H2, bewirkte eine verminderte Sensitivität und Signalamplitude. Auffällig war die unterschiedlich Allelfrequenz in den ethnischen Gruppen. Während beide Varianten in den Proben der europäischen und asiatischen Probanden vorkamen, waren alle Afrikaner homozygot für den sensitiveren H1.

4.2.4 Funktionelle Charakterisierung der TAS2R41-Haplotypen mit Strukturanaloga des Chloramphenicols

Da von den strukturell sehr unterschiedlichen 106 getesteten Bittersubstanzen nur Chloramphenicol eine Aktivierung der TAS2R41-Haplotypen zeigte, war der nächste Schritt auf der Suche nach weiteren Agonisten der Einsatz von Strukturanaloga. Chloramphenicol wurde als neues Antibiotikum aus dem Stamm *Streptomyces venezuelae* 1947 erstmals erwähnt. Inzwischen wurden auch das potentere Thiamphenicol, ein Methylsulfonyl-Analogon und dessen fluorinierte Variante, Florfenicol, synthetisch hergestellt. Diese Substanzen gehören, wie Chloramphenicol, zur Klasse der Phenylpropanoide. Weitere Vertreter dieser großen Klasse von pflanzlichen und mikrobiellen Sekundärstoffen sind die Kaffeesäure und Derivate der Zimtsäure. Diese vier Substanzen wurden in den Calcium-Imaging-Experimenten eingesetzt. Thiamphenicol unterschied sich von Chloramphenicol nur durch die Methylsulfonylgruppe, statt der

Nitrogruppe am Phenylring. Florfenicol unterschied sich zusätzlich durch eine Fluor- statt einer Hydroxygruppe. Die im Vergleich zu Chloramphenicol strukturell stark vereinfachten Substanzen *p*-Nitrozimtsäure und Kaffeesäure wurden eingesetzt, um grundlegende funktionelle Gruppen zu identifizieren, die für eine Aktivierung notwendig bzw. ausreichend waren. Sie enthielten beide das Phenylpropanoidgrundgerüst, die *p*-Nitrozimtsäure mit Nitrogruppe wie im Chloramphenicol, die Kaffeesäure mit einer Hydroxygruppe.

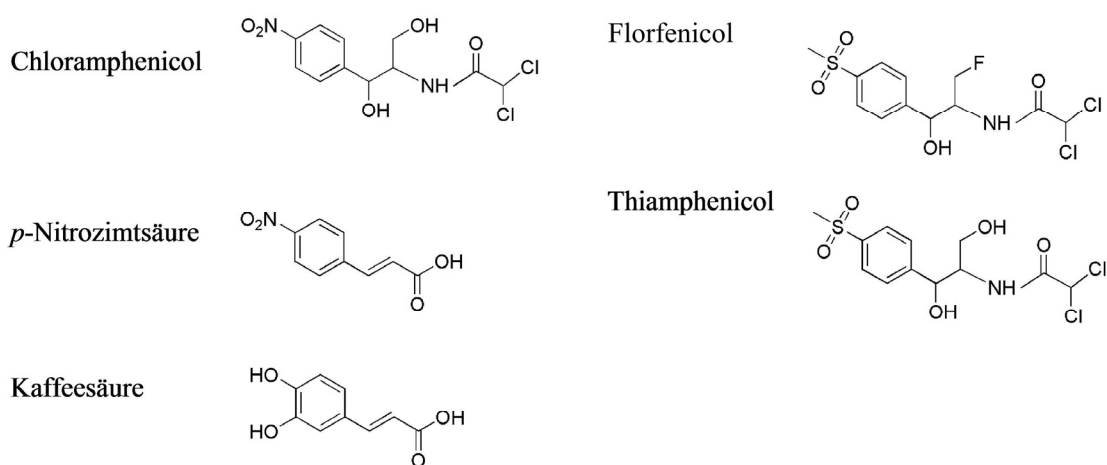


Abb. 17: Chloramphenicol und Strukturanaloga

Chemische Strukturformeln von Chloramphenicol und den strukturell am nächsten verwandten Antibiotika Thiamphenicol und Florfenicol. Als weitere Substanzen mit einem Phenylpropanoidgrundgerüst wurden die *p*-Nitrozimtsäure und die Kaffeesäure untersucht.

Da Florfenicol und Thiamphenicol zunächst in DMSO gelöst werden mussten, wurde auch eine DMSO-Kontrolle mitgeführt. Für die beiden Antibiotika konnte, wie auch schon für Chloramphenicol, der TAS2R46 H1 als Positivkontrolle eingesetzt werden. Für die *p*-Nitrozimtsäure und die Kaffeesäure waren keine aktivierbaren TAS2Rs bekannt, sodass hier die Positivkontrolle fehlte.

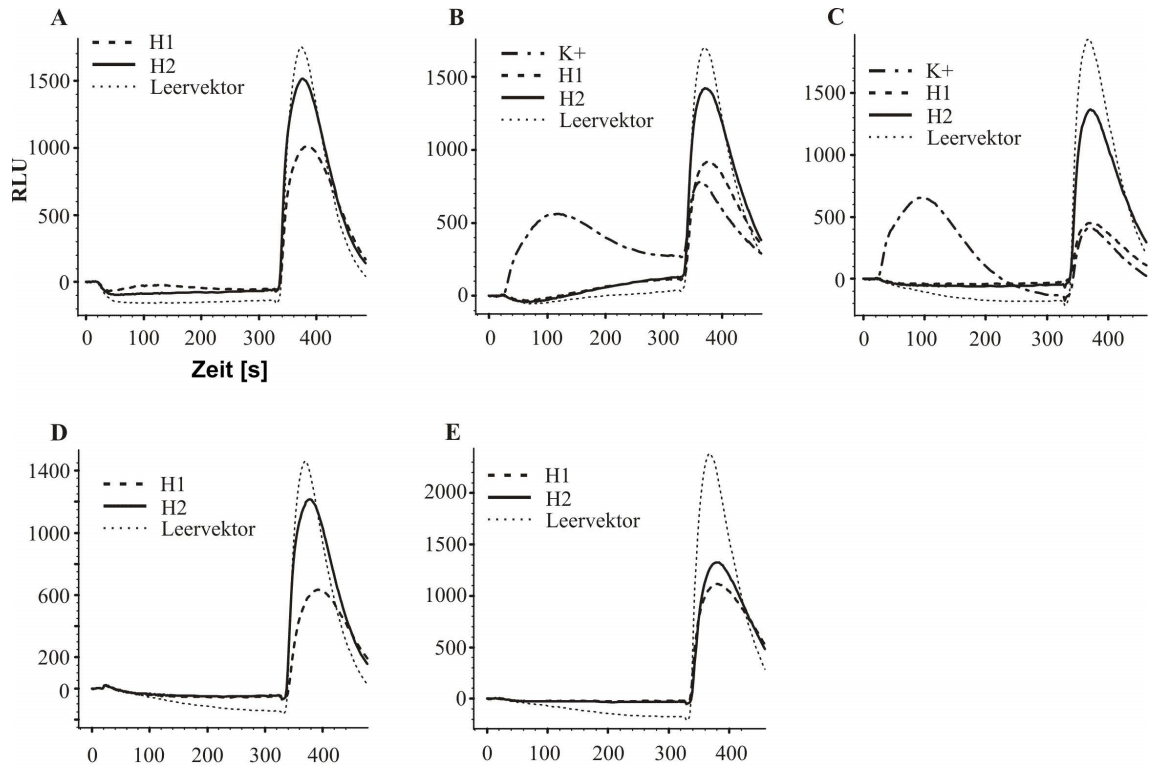


Abb. 18: Fluoreszenzsignale der TAS2R41-Haplotypen mit Strukturanaloga des Chloramphenicols

Fluoreszenzsignale von HEK293T_{G16Gust44}-Zellen, die den TAS2R41 H1, H2 oder K⁺ exprimierten. Die Negativkontrolle bildeten Leervektor-transfizierte Zellen. Appliziert wurden **A:** 2 mM *p*-Nitrozimtsäure; **B:** 4 mM Florfenicol (0,8% DMSO); **C:** 8 mM Thiamphenicol (1,6% DMSO); **D:** 3 mM Kaffeesäure; **E:** 2% DMSO als Lösungsmittelkontrolle.

Von allen getesteten Strukturanaloga zeigte nur die *p*-Nitrozimtsäure (A) eine sehr schwache, aber reproduzierbare Aktivierung des sensitiveren TAS2R41 H1. Obwohl Florfenicol und Thiamphenicol dem Chloramphenicol strukturell sehr ähnlich sind und beide ebenfalls den TAS2R46 aktivieren konnten, führten sie zu keiner Aktivierung der TAS2R41-Haplotypen. Wie Abb. 18 E zeigt, gab es auch keinen DMSO-Einfluss. Im Thiamphenicol schien die Substitution der Nitro- mit einer Methylsulfonylgruppe am Phenylring ursächlich für eine fehlende Aktivierung zu sein. Auch das schwache Signal des H1 durch die *p*-Nitrozimtsäure deutete auf die Notwendigkeit dieser funktionellen Gruppe hin. Für eine gute Rezeptoraktivierung fehlten der *p*-Nitrozimtsäure offensichtlich weitere wichtige Strukturmerkmale. Die Kaffeesäure führte, als strukturell am stärksten abweichende Substanz, zu keiner Aktivierung des Rezeptors.

4.3 deorphanisierte TAS2Rs

Für die verbleibenden zwanzig Bitterrezeptoren war kein aufwändiges Screening verschiedener Bittersubstanzen notwendig, da für alle Rezeptoren zumindest ein Agonist bekannt war {Meyerhof et al., 2010}. Auch hier war das Ziel die funktionelle Analyse der weltweit häufigsten Haplotypen. Da die Ergebnisse der orphanen TAS2Rs, sowohl für die identifizierten Haplotypen, als auch für deren Häufigkeit in den verschiedenen Bevölkerungsgruppen gute Übereinstimmungen mit den Ergebnissen von Kim et al. zeigten, wurden die häufigsten Haplotypen der deorphanisierten TAS2Rs auf der Datengrundlage dieser Veröffentlichung bestimmt {Kim et al., 2005}. Auf eine eigene Genotypisierung der deorphanisierten TAS2Rs wurde in dieser Arbeit verzichtet. Neben den drei ethnischen Gruppen, Europäer, Asiaten und Afrikaner, die schon für die orphanen TAS2Rs analysiert wurden, beinhaltete diese Studie auch nordamerikanische Probanden. Methodisch von den orphanen TAS2Rs abweichend, wurden die fehlenden Haplotypen nicht aus genomischer DNA kloniert, sondern durch gezielte Einführung von Punktmutationen in bereits vorhandene Rezeptorvarianten generiert. Eine Übersicht der von Kim et al. identifizierten Polymorphismen der TAS2Rs und den daraus resultierenden häufigsten Haplotypen und Allelfrequenzen sind in Tab. 1 dargestellt.

4.3.1 TAS2Rs mit funktionell einheitlichen Haplotypen

Die analysierten Haplotypen der sechs Bitterrezeptoren TAS2R1, TAS2R4, TAS2R8, TAS2R10, TAS2R40 und TAS2R50 zeigten keine funktionellen Unterschiede in den Calcium-Imaging-Experimenten. Die Anzahl der analysierten Haplotypen, ihre Polymorphismen auf Aminosäureebene und die resultierenden funktionellen Daten beider Agonisten werden in Tab. 10 zusammenfassend dargestellt.

Tab. 10: Übersicht der EC₅₀- und Schwellenwerte von TAS2Rs ohne funktionelle Diversität

TAS2	Substanz	Haplotyp	EC ₅₀ / Schwellenwert [#]	Amplitude	p T-Test/ Anova
R1	Hydroxyethylindol/ Trp-Trp-Trp	H1 R111 H2 H111	H1 = H2 Dissertation S. Kohl	→	
R4	Colchicin	H1 F7/V96/S171 H2 S7/L96/N171 H3 F7/L96/N171 H4 F7/L96/S171	0,9 ± 0,3 mM 0,6 ± 0,3 mM 0,9 ± 0,7 mM 0,8 ± 0,5 mM	0,39 ± 0,2 → → →	0,35 0,88 0,82
R8	Spironolakton	H1 M308 H2 V308	63 ± 6 µM 59 ± 4 µM	0,44 ± 0,04 →	0,52
	Chloramphenicol	H1 H2	0,18±0,01 mM 0,22±0,02 mM	0,35 →	0,13
R10	Strychnin	H1 M156 H2 T156	42 ± 5 µM 47 ± 13 µM	0,24 ± 0,1 →	0,85
	Denatonium- benzoat	H1 H2	139 ± 44 µM 130 ± 37 µM	0,44 ± 0,16 →	0,66
R40	Chinin-HCl	H1 S187/G291 H2 Y187/G291 H3 S187/S291	22 ± 5 µM 23 ± 7 µM 20 ± 1 µM	0,48 ± 0,16 → →	0,85 0,53
	Colupolon	H1 H2 H3	1 µM [#] 1 µM [#] 1 µM [#]		0,83 0,71
R50	Andrographolid	H1 C203 H2 Y203	43 ± 16 µM 32 ± 4 µM	1,1 ± 0,5 →	0,31
	Amarogentin	H1 H2	300 µM [#] 300 µM [#]		0,93

Die statistische Auswertung der EC₅₀- bzw. Schwellenwerte erfolgte mit dem T-Test bei zwei Haplotypen und dem Anova bei drei Haplotypen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Haplotypen dieser Bitterrezeptoren. Der TAS2R1 wurde in der Abteilung innerhalb der Dissertation von S.Kohl kloniert und analysiert. Alle anderen Bitterrezeptoren werden im Folgenden detaillierter dargestellt.

4.3.1.1 TAS2R4

In den vier häufigsten Haplotypen des TAS2R4 traten die nsSNPs T20C, G286C und A512G auf. Daraus ergaben sich die Aminosäurekombinationen F7/V96/171S für den H1, 7S/96L/N171 für den H2, F7/96L/N171 für den H3 und F7/96L/171S für den H4. Die Klonierung des H2 und H3, sowie die Identifizierung des Hydroxyethylindols als Ligand, erfolgte innerhalb der Abteilung im Rahmen ihrer Dissertation durch Susann Kohl. Als Agonisten für die Calcium-Imaging-Experimente wurden das toxische Alkaloid der Herbstzeitlosen, Colchicin, und das Indolderivat 3-(2-Hydroxyethyl)indol eingesetzt.

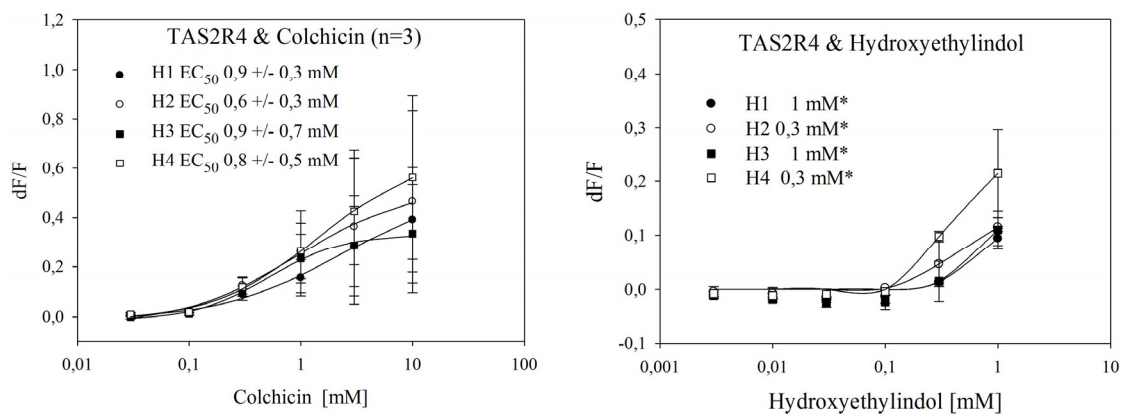


Abb. 19: Dosis-Wirkungskurven der TAS2R4-Haplotypen

Aus Fluoreszenzsignalen von TAS2R4 H1 bis 4 exprimierenden HEK293T_{G16Gust44}-Zellen, wurden nach Applikation steigender Konzentrationen von Colchicin und Hydroxyethylindol Dosis-Wirkungskurven erstellt und EC₅₀- bzw. Schwellenwerte* ermittelt.

Obwohl für den TAS2R4 neun natürliche und fünf synthetische Agonisten bekannt waren, erreichten die meisten Substanzen keine Sättigung der Rezeptorantwort {Meyerhof et al., 2010}. Für Colchicin konnten EC₅₀-Werte von 0,9 mM, 0,6 mM, 0,9 mM und 0,8 mM ermittelt werden. Es zeigten sich keine deutlichen Unterschiede in der Sensitivität (siehe Abb. 19). Die Signalamplituden von 0,4; 0,5; 0,3 und 0,6 unterschieden sich geringfügig, allerdings mit hohen Standardabweichungen zwischen den Experimenten. Für Hydroxyethylindol wurde keine Sättigung erreicht, sondern Schwellenwerte von 0,3 mM für H2 und H4 und 1 mM für H1 und H3 ermittelt. Auch hier zeigte der TAS2R4 H4 tendenziell die höchsten Signale. Durch die aufgetretenen Schwankungen kann jedoch kein sicherer Rückschluss auf funktionelle Diversität geschlossen werden.

4.3.1.2 TAS2R8

Die zwei analysierten Haplotypen des TAS2R8 unterschieden sich in dem nsSNP G922A, das zu einem Austausch an der Position 308 von Methionin zu Valin im H2 führte. Als Agonisten wurden im Calcium-Imaging-Experiment das Antibiotikum Chloramphenicol und das synthetische Diuretikum Spironolakton eingesetzt.

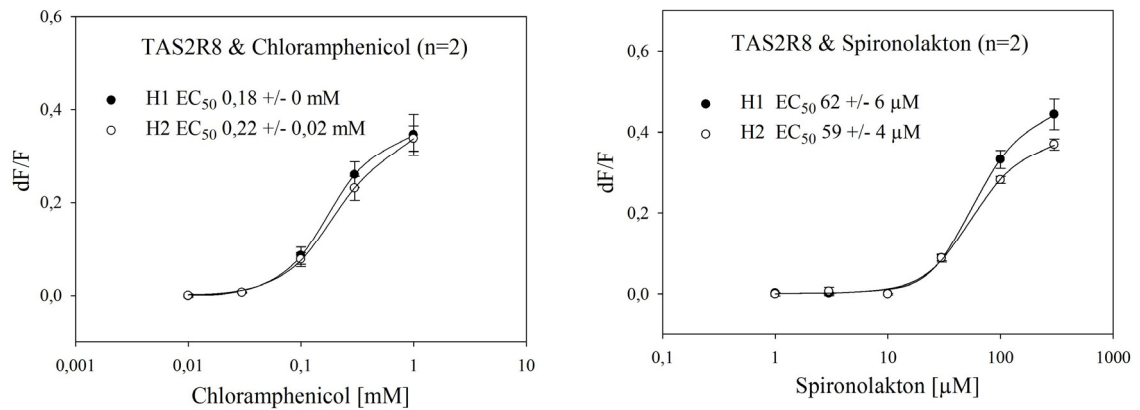


Abb. 20: Dosis-Wirkungskurven der TAS2R8-Haplotypen

Aus Fluoreszenzsignalen zweier unabhängiger Experimente von TAS2R8 H1- oder H2-exprimierenden HEK293T_{G16Gust44}-Zellen, wurden nach Applikation steigender Konzentrationen Chloramphenicol bzw. Spironolakton, Dosis-Wirkungskurven erstellt und EC₅₀-Werte berechnet.

Für beide Agonisten zeigten die ermittelten Dosis-Wirkungskurven der TAS2R8-Haplotypen Rezeptorantworten mit vergleichbaren Signalamplituden und Sensitivitäten (siehe Abb.20). Für H1 und H2 ergaben sich für Chloramphenicol Amplituden von 0,35 bzw. 0,34 und EC₅₀-Werte von 0,18 bzw. 0,22 mM. Für Spironolakton ergaben sich Amplituden von 0,44 und 0,37 und EC₅₀-Werte von 63 µM und 59 µM. Der Polymorphismus der vorletzten Aminosäure des Rezeptors hatte demnach keinen Einfluss auf die Rezeptoreigenschaften.

4.3.1.3 TAS2R10

Die zwei häufigsten Haplotypen des TAS2R10 unterschieden sich im nsSNP T467C, was einen Austausch der 156. Aminosäure von Methionin zu Threonin im H2 zur Folge hatte.

Als Agonisten wurden das sehr giftige, natürliche Alkaloid Strychnin und die synthetische Ammoniumverbindung Denatonium ausgewählt.

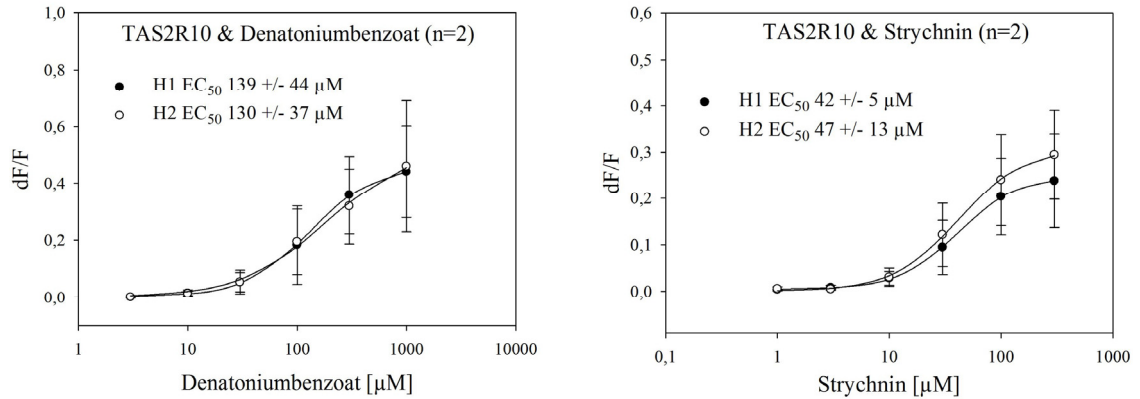


Abb. 21: Dosis-Wirkungskurven der TAS2R10-Haplotypen

Aus Fluoreszenzsignalen zweier unabhängiger Experimente von TAS2R10 H1- oder H2-exprimierenden HEK293T_{G16Gust44}-Zellen wurden nach Applikation steigender Konzentrationen Denatoniumbenzoat bzw. Strychnin Dosis-Wirkungskurven erstellt und EC_{50} -Werte ermittelt.

Auch für den TAS2R10 zeigten die Dosis-Wirkungskurven beider Agonisten keine funktionellen Unterschiede der Haplotypen (siehe Abb. 21). Für H1 und H2 betragen die EC_{50} -Werte für Denatoniumbenzoat 139 μ M bzw. 130 μ M und die Amplituden 0,44 bzw. 0,46. Für Strychnin ergaben sich EC_{50} -Werte von 42 μ M bzw. 47 μ M und Amplituden von 0,24 und 0,29.

4.3.1.4 TAS2R40

Der TAS2R40 ist in der Gruppe der funktionell homogenen Bitterrezeptoren der einzige Rezeptor, der drei häufige Varianten aufweist. Die Haplotypen unterschieden sich in den Aminosäuren S178Y und G291 die in der fünften bzw. siebten Transmembrandomäne lagen. Der H1 war durch die Kombination S187/G291, der H2 durch 187Y/G291 und der H3 durch S187/291S definiert. Als Agonisten wurden in den Calcium-Imaging-Experimenten das natürliche Alkaloid Chinin und Colupolon, ein Bitterstoff des Hopfens, ausgewählt {Intelmann et al., 2009}.

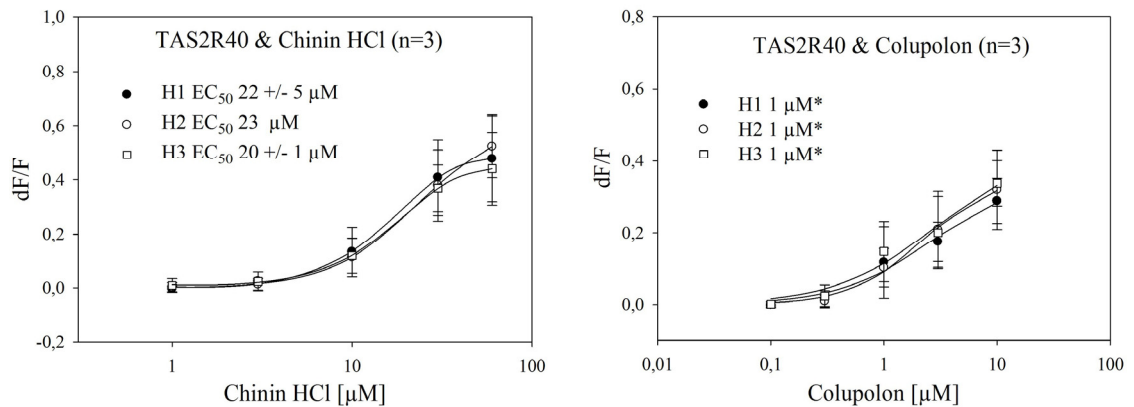


Abb. 22: Dosis-Wirkungskurven der TAS2R40-Haplotypen

Aus Fluoreszenzsignalen dreier unabhängiger Experimente wurden nach Applikation steigender Konzentrationen Chinin-HCl bzw. Colupolon auf TAS2R40 H1-, H2- oder H3-exprimierende HEK293T_{G16Gust44}-Zellen, Dosis-Wirkungskurven erstellt und EC_{50} - bzw. Schwellenwerte* ermittelt.

Für Chinin-HCl ergaben die Dosis-Wirkungskurven der drei TAS2R40-Haplotypen ähnliche EC_{50} -Werte und Signalamplituden, wobei die Sättigung für den H2 nur in einem von drei Experimenten erreicht wurde (siehe Abb. 22). Die EC_{50} -Werte für den H1, H2 und H3 betragen 22 μ M, 23 μ M und 20 μ M. Die Amplituden lagen bei 0,48; 0,50 und 0,44. Aufgrund unspezifischer Signale bei höheren Konzentrationen konnten für Colupolon keine vollständigen Dosis-Wirkungskurven erstellt werden. Der Schwellenwert aller drei Haplotypen lag bei 1 μ M

4.3.1.5 TAS2R50

Für den TAS2R50 wurden die zwei vorherrschenden Haplotypen analysiert, die sich in G608A unterschieden. Der H1 war durch C203 und der H2 durch 203Y definiert. Für den TAS2R50 waren bislang nur die beiden natürlichen Bitterterpenoide Andrographolid, das in Akanthusgewächsen enthalten ist, und Amarogentin, das in Enzian enthalten ist, als Agonisten bekannt {Behrens et al., 2009}. Diese wurden in den folgenden Calcium-Imaging-Experimenten eingesetzt.

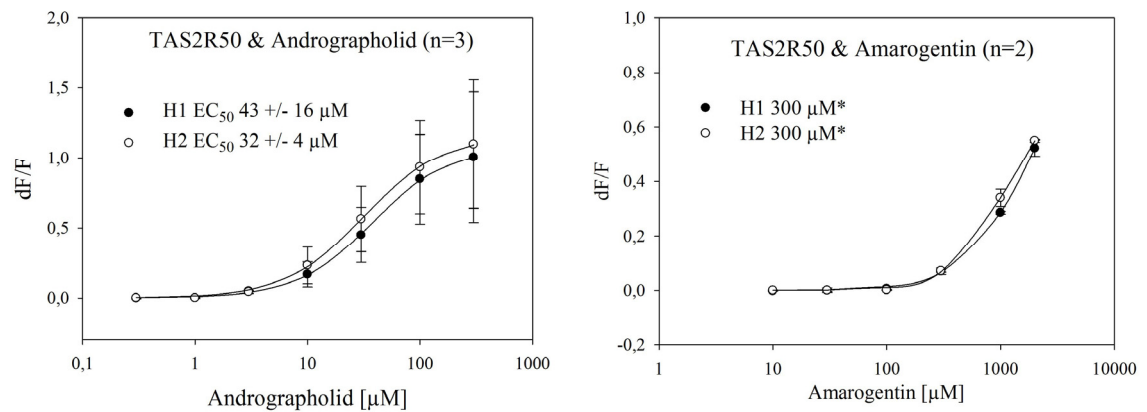


Abb. 23: Dosis-Wirkungskurven der TAS2R50-Haplotypen

Aus Fluoreszenzsignalen von TAS2R50 H1- oder H2-exprimierenden HEK293T_{G16Gust44}-Zellen wurden nach Applikation steigender Konzentrationen Andrographolid bzw. Amarogentin Dosis-Wirkungskurven erstellt und EC₅₀- bzw. Schwellenwerte* ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte aus zwei bis drei Experimenten.

Auch bei diesem Rezeptor zeigten sich keine funktionellen Unterschiede der beiden Haplotypen (siehe Abb. 23). Andrographolid ergab für H1 und H2 EC₅₀-Werte von 43 μM bzw. 32 μM, wobei durch die Standardabweichungen des H1 kein signifikanter Unterschied vorhanden war. Die Amplituden betragen im Mittel 1,1 und 1,0. Die Dosis-Wirkungskurven für Amarogentin erreichten, aufgrund unspezifischer Signale in hohen Konzentrationen, keine Sättigung. Der Schwellenwert lag für beide TAS2R50-Haplotypen bei 300 μM.

4.3.2 Übersicht TAS2Rs mit funktionell unterschiedlichen Haplotypen

Zusätzlich zum deorphanisierten Bitterrezeptor TAS2R41 wurden weitere elf Bitterrezeptoren mit funktioneller Diversität in ihren 29 weltweit häufigsten Haplotypen identifiziert. Um einen vollständigen Überblick aller Bitterrezeptoren zu geben, wurden in diese Arbeit auch Rezeptoren einbezogen und analysiert, deren funktionelle Diversität bereits bekannt und veröffentlicht war. Dies wurde an den entsprechenden Stellen deutlich gemacht. Tab. 11 zeigt zusammenfassend alle TAS2Rs mit funktioneller Diversität, die Anzahl der analysierten Haplotypen und deren funktionelle Daten für beide Agonisten.

Tab. 11: Übersicht Bitterrezeptoren mit funktioneller Diversität

TAS2	Substanz	Haplotyp	EC ₅₀ / SW [#]	Amplit.	P _{T-Test/Anova}
R5	Phenanthrolin	H1 S26/R294 H2 I26/R294 H3 S26/L294	0,1 mM [#] 0,16 ± 0,07 mM 0,1 mM [#]	0,25 ± 0,1	0,003** _{3 mM} 0,97 _{3 mM}
	2-Mercapto- benzimidazol	H1 H2 H3	0,1 mM [#] 0,19 ± 0,02 mM 0,1 mM [#]	0,5 ± 0,03	0,02* _{0,3 mM} 0,12 _{0,3 mM}
R7	Quinine HCl	H1 R214/M304 H2 214 _{Stopp} /I304	30 μM [#] -		
	Cromolyn	H1 H2	10 mM [#] -		
R9	Ofloxacin	H1 V187 H2 A187	- 1,3 ± 0,1 mM	- 0,6 ± 0,02	
R13	Denatonium- benzoat	H1 N259 H2 S259	3 mM [#] 3,3 ± 0,7 mM	0,06 ± 0,02 ↑	0,02* _{6 mM}
	Diphenidol	H1 H2	- 0,1 mM [#]		
R16	Arbutin	H1 N172/H222 H2 N172/R222 H3 K172/H222	3,5 ± 0,2 mM 3,6 ± 0,1 mM 7,5 ± 1,3 mM	1,6 ± 0,2 → →	0,90 0,013*
	Helicin	H1 H2 H3	1,2 ± 0,1 mM 1,4 ± 0,2 mM 2,2 ± 0,7 mM	1,5 ± 0,1 → ↓	0,33 0,18
R38	Allylisothio- cyanat	H1 P49/A262/V296 H2 A49/V262/I296	315 ± 61 μM -	0,2 ± 0,07 -	
R41	Chloramphenicol	H1 P127 H2 L127	0,3 mM [#] 0,6 mM [#]		0,007** _{0,6 mM}
R43	Aloin	H1 S35/R212 H2 W35/H212	2,1 ± 0,1 μM 1,4 ± 0,3 μM	0,6 ± 0,1 ↑	0,06
	Helicin	H1 H2	4,8 ± 0,21 mM 4,3 ± 0,05 mM	0,3 ± 0,1 ↑	0,08
R44	Saccharin	H1 R35/L162/Q217/ A227/V240/P276	1,5 ± 0,1 mM	0,5 ± 0,1	
		H2 R35/M162/Q217/ A227/V240/P276	2,1 ± 0,1 mM	→	0,005**
		H3 W35/M162/Q217/ V227/I240/P276	1,3 ± 0,0 mM	→	0,08
		H4 W35/M162/E217/ V227/I240/R276	-	-	-
	Diphenidol	H1 H2 H3 H4	30 μM 100 μM 30 μM -		0,19 _{100 μM} 0,22 _{100 μM} 0,08 _{100 μM}

TAS2	Substanz	Haplotyp	EC ₅₀ / SW [#]	Amplit.	P _{T-Test/Anova}
R46	Absinthin	H1 L228/W250 H2 M228/W250 H3 M228/250 _{Stopp}	11,7 ± 0,6 μM 16,7 ± 0,8 μM -	0,6 ± 0,03 ↓ -	< 0,001** - -
	Quassin	H1 H2 H3	74 ± 7 μM 92 ± 4 μM -	0,5 ± 0,02 ↓ -	0,02*
R47	Denatonium-benzoat	H1 H174/L252 H2 H174/F252	1,3 ± 0,7 μM 1 mM [#]	0,1 ± 0,01	0,012* _{100 μM}
R49	Cromolyn	H1 K79/V141/H143/ H148/I236/F252/R255	44 ± 36 μM	0,5 ± 0,3	0,94 0,003** 0,003**
		H2 E79/V141/H143/ H148/I236/F252/R255	49 ± 20 μM	→	
		H3 K79/V141/Q143/ N148/V236/S252/L255	305 ± 118 μM	↓	
		H4 K79/I141/Q143/ N148/V236/S252/L255	305 ± 80 μM	↓	

T-Test bei 2 Haplotypen (H) / Anova bei mehr als 2 Haplotypen

p * < 0,05; ** < 0,01

SW: Schwellenwert; Amplit.: Signalamplitude

p-Wert: wenn Rezeptorsättigung nicht erreicht, bei angegebener Ligandenkonzentration ermittelt

4.3.3 TAS2Rs mit inaktiven Haplotypen

Von den zwanzig deorphanisierten Bitterrezeptoren besaßen der TAS2R7, TAS2R9, TAS2R44 und TAS2R46 einen nicht-funktionellen Haplotypen. Im Fall des TAS2R7 und TAS2R46 handelte es sich um einen verkürzten Rezeptor aufgrund eines *nonsense*-Polymorphismus. Bei dem TAS2R9 und TAS2R44 waren Aminosäureaustausche ursächlich für die fehlende Rezeptoraktivität. Auch für die folgenden Calcium-Imaging-Experimente wurden, soweit nicht anders kenntlich gemacht, zwei Agonisten für jeden Rezeptor aus der Veröffentlichung von Meyerhof et al. {Meyerhof et al., 2010} ausgewählt.

4.3.3.1 TAS2R7

Die zwei vorherrschenden Haplotypen des TAS2R7 unterschieden sich im nsSNP C640T und G912A. Der H1 war durch die Aminosäurekombination R214/M304 und der H2 durch 214_{Stopp}/I304 definiert. Der erste Austausch führte zu einer Änderung des Argininkodons in

ein vorzeitiges Stoppkodon im H2, so dass dieser Rezeptor statt 318 nur 213 Aminosäuren lang war.

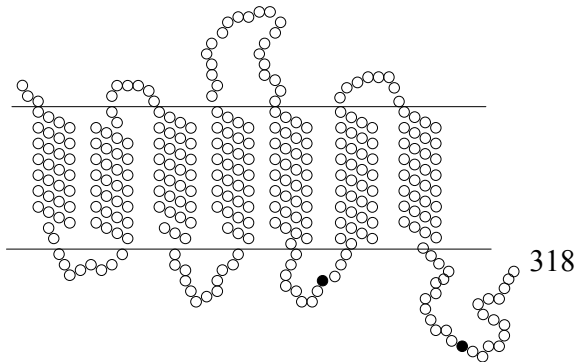


Abb. 24: Rezeptormodell des TAS2R7 mit markierten Polymorphismen

Dargestellt sind die beiden Aminosäureaustausche R241Stopp und M304I, die im TAS2R7 H1 und H2 auftreten.

Als Agonisten für das Calcium-Imaging-Experiment wurden das natürliche Alkaloid Chinin und der synthetische Arzneistoff Cromolyn ausgewählt.

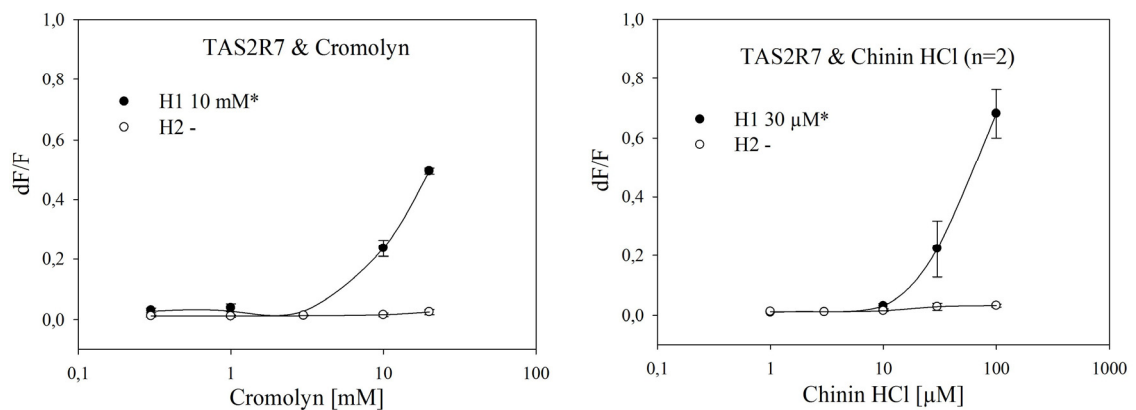


Abb. 25: Dosis-Wirkungskurve der TAS2R7-Haplotypen

Aus Fluoreszenzsignalen von TAS2R7 H1 oder H2-exprimierenden HEK293T_{G16Gust44}-Zellen wurden nach Applikation steigender Konzentrationen Cromolyn bzw. Chinin-HCl Dosis-Wirkungskurven erstellt und Schwellenwerte* ermittelt.

Obwohl sechs natürliche und synthetische Agonisten für den TAS2R7 bekannt waren, erreichte kein Ligand eine Sättigung der Rezeptorantwort, meist aufgrund unspezifischer Signale in höheren Konzentrationen. Auch für Cromolyn und Chinin wurden für den TAS2R7 H1 nur Schwellenwerte ermittelt, der für Cromolyn 10 mM und für Chinin 30 µM betrug (siehe Abb. 25). Der verkürzte TAS2R7 H2, der ausschließlich in der

nordamerikanischen Probandengruppe auftrat, zeigte für beide Agonisten keine Aktivierung und war somit nicht funktionell.

4.3.3.2 TAS2R9

Für den TAS2R9 gab es zwei vorherrschende Haplotypen. Sie unterschieden sich in der 187. Aminosäure, die in der fünften Transmembrandomäne liegt. Der H1 war durch V187 und der H2 durch 187A definiert. Als Ligand wurde das Antibiotikum Ofloxacin eingesetzt, das in Calcium-Imaging-Experimenten bereits funktionelle Unterschiede der beiden häufigsten Haplotypen gezeigt hatte {Dotson et al., 2008}.

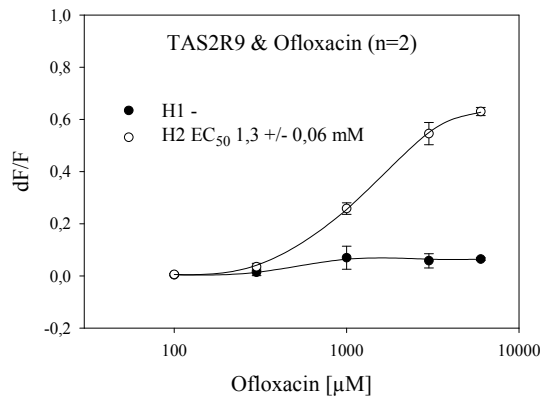


Abb. 26: Dosis-Wirkungskurve der TAS2R9-Haplotypen

Aus Fluoreszenzsignalen von TAS2R9 H1- oder H2-exprimierenden HEK293T_{G16Gust44}-Zellen wurden nach Applikation steigender Konzentrationen Ofloxacin Dosis-Wirkungskurven erstellt und Schwellenwerte ermittelt.

Die in Abb. 26 dargestellten Dosis-Wirkungskurven bestätigten die funktionellen Unterschiede. Während der TAS2R9 H1 keine Aktivierung zeigte, konnte für den H2 ein EC_{50} -Wert von 1,3 mM und eine Signalamplitude von 0,6 ermittelt werden.

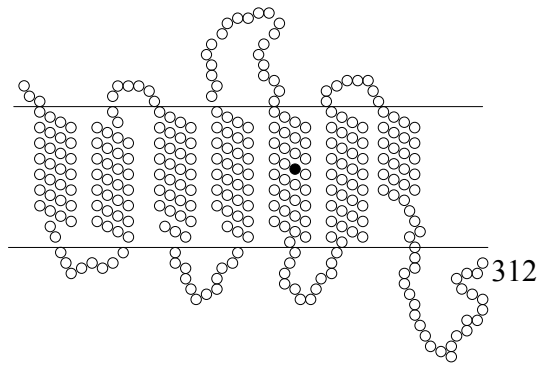


Abb. 27: Rezeptormodell des TAS2R9 mit markiertem Polymorphismus

Dargestellt ist der, im TAS2R9 H1 und H2 auftretende, Aminosäureaustausch V187A.

Der in Abb. 27 dargestellte konservative Austausch von Valin zu Alanin bedeutet keine Änderung von Ladungen oder funktionellen Gruppen.

4.3.3.3 TAS2R44

In den vier häufigsten Haplotypen des TAS2R44 traten die sechs Aminosäureaustausche R35W, L162M, Q217E, A227V, V240I und P276R auf. Daraus ergaben sich für den H1 die Aminosäurekombination RLQAVP, für den H2 RMQAVP, für den H3 WMQVIP und für den H4 WMEVIR. Als Agonisten für die Calcium-Imaging-Experimente wurden der künstliche Süßstoff Saccharin und das Arzneimittel Diphenidol ausgewählt. Der bittere Nachgeschmack von Saccharin und die Aktivierung des TAS2R44 wurde bereits in der Literatur beschrieben {Kuhn et al., 2004; Pronin et al., 2007}.

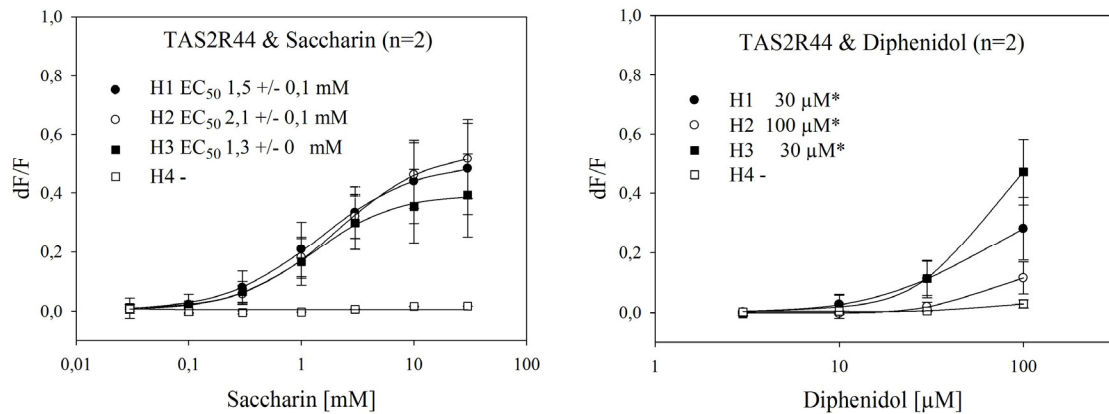


Abb. 28: Dosis-Wirkungskurven der TAS2R44-Haplotypen

Aus Fluoreszenzsignalen von TAS2R44 H1 bis 4 exprimierenden HEK293T_{G16Gust44}-Zellen, wurden nach Applikation steigender Konzentrationen von Saccharin bzw. Diphenidol Dosis-Wirkungskurven erstellt und EC_{50} - bzw. Schwellenwerte* ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die Aktivierung der TAS2R44 Haplotypen 1 bis 3 durch Saccharin konnte in diesen Experimenten bestätigt werden (siehe Abb. 28). Die resultierenden EC_{50} -Werte von 1,5 mM, 2,1 mM, 1,3 mM und die Amplituden von 0,5; 0,5 und 0,4 zeigten Haplotypen mit ähnlichen Rezeptoreigenschaften, wobei der H2 eine etwas geringere Sensitivität aufwies. Die Dosis-Wirkungskurven für Diphenidol erreichten keine Sättigung. Die ermittelten Schwellenwerte von 30 μ M für H1 und H3 und 100 μ M für H2 bestätigten die geringere Sensitivität des H2. Der TAS2R44 H4 konnte durch keinen der beiden Agonisten aktiviert werden und war somit nicht funktionell.

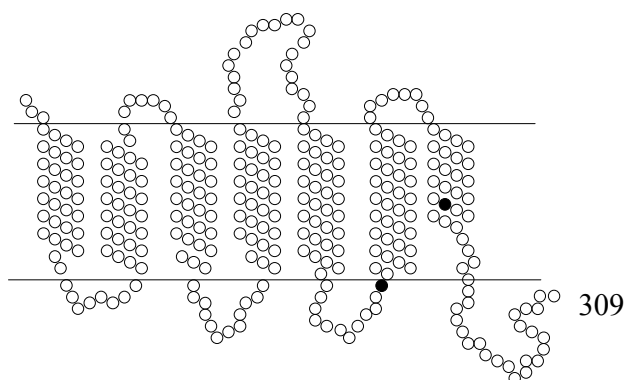


Abb. 29: Rezeptormodell des TAS2R44 mit H4-spezifischen Polymorphismen

Markiert sind lediglich die beiden Aminosäureaustausche Q217E und P276R, die den inaktiven TAS2R44 H4 von den drei funktionellen Haplotypen unterscheiden.

Das Rezeptormodell des TAS2R44 zeigt die beiden Aminosäurepositionen Q217E in der dritten intrazellulären Schleife und P276R in der siebten Transmembrandomäne, die den nicht-funktionellen H4 vom funktionellen H3 unterschieden (Abb. 29). Bei beiden handelte es sich um nichtkonservative Austausche die polare gegen geladene Gruppen austauschten.

4.3.4 TAS2Rs mit unterschiedlich sensitiven Haplotypen

Die charakterisierten Haplotypen der vier Bitterrezeptoren TAS2R5, TAS2R16, TAS2R43 und TAS2R49 waren alle funktionell, wiesen jedoch unterschiedliche Sensitivitäten und oft auch Signalhöhen auf. Sie werden im Folgenden einzeln aufgeführt.

4.3.4.1 TAS2R5

In den drei häufigsten Haplotypen des TAS2R5 traten die Polymorphismen S26I und R294L auf. Der H1 war durch S26/R294, der H2 durch I26/R294 und der H3 S26/L294 definiert. Für die Calcium-Imaging-Experimente wurden die synthetischen Agonisten Phenanthrolin und 2-Mercaptobenzimidazol ausgewählt.

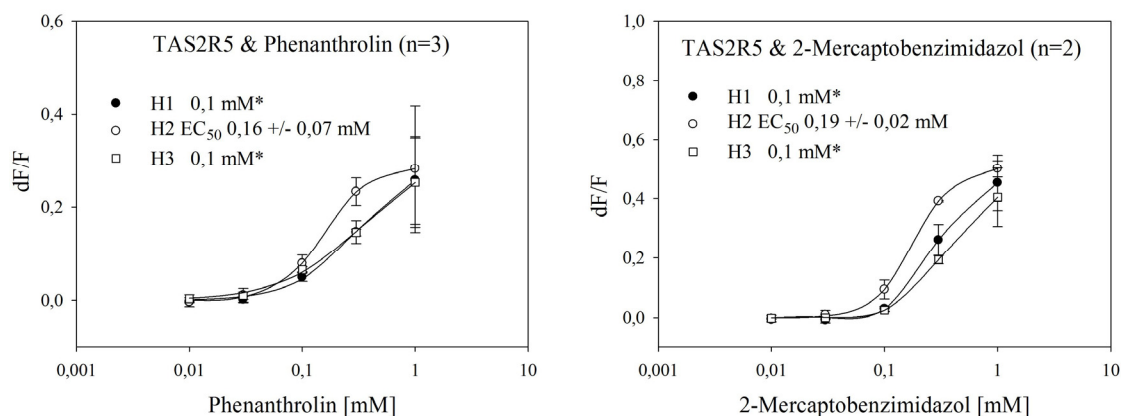


Abb. 30: Dosis-Wirkungskurven der TAS2R5-Haplotypen

Aus Fluoreszenzsignalen von TAS2R5 H1 bis 3 exprimierenden HEK293T_{G16Gust44}-Zellen, wurden nach Applikation steigender Konzentrationen von Phenanthrolin und 2-Mercaptobenzimidazol Dosis-Wirkungskurven erstellt und EC₅₀- bzw. Schwellenwerte* ermittelt.

Alle drei TAS2R5-Haplotypen waren durch beide Agonisten aktivierbar (siehe Abb. 30). Nur der H2 erreichte für beide Substanzen eine Sättigung, was auf eine höhere Sensitivität dieser Variante hinweisen könnte. Die EC_{50} -Werte betragen für Phenanthrolin 0,16 mM und für 2-Mercaptobenzimidazol 0,19 mM. Wegen fehlender EC_{50} -Werte des H1 und H3 ist ein Vergleich der drei Haplotypen schwierig. TAS2R5 H1 und H3 zeigten jedenfalls gleiche Rezeptoreigenschaften. Ihr Schwellenwert lag für Phenanthrolin und für 2-Mercaptobenzimidazol bei 0,1 mM.

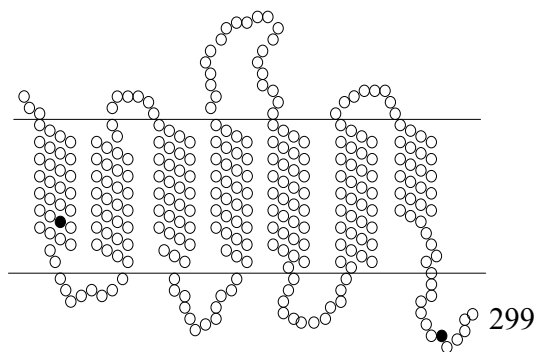


Abb. 31: Rezeptormodell des TAS2R5 mit markierten Polymorphismen

Markiert sind die Aminosäureaustausche S26I und R294L, die in den drei häufigsten TAS2R5-Haplotypen auftraten.

Da es keinen funktionellen Unterschied zwischen dem TAS2R5 H1 und H3 gab, hatte der Aminosäureaustausch R294L im C-Terminus des Rezeptors keinen Einfluss auf die Rezeptorfunktion (siehe Abb. 30). Der Austausch von Serin an der Position 26 gegen Isoleucin führte zu einer erhöhten Sensitivität des H2.

4.3.4.2 TAS2R13

Der TAS2R13 wies einen Polymorphismus auf, der zu einem Aminosäureaustausch der Position 259 von Asparagin im H1 zu Serin im H2 führte. Für den TAS2R13 sind nur zwei synthetische Agonisten bekannt die in den Calcium-Imaging-Experimenten eingesetzt wurden, der synthetische Bitterstoff Denatoniumbenzoat und das Arzneimittel Diphenidol.

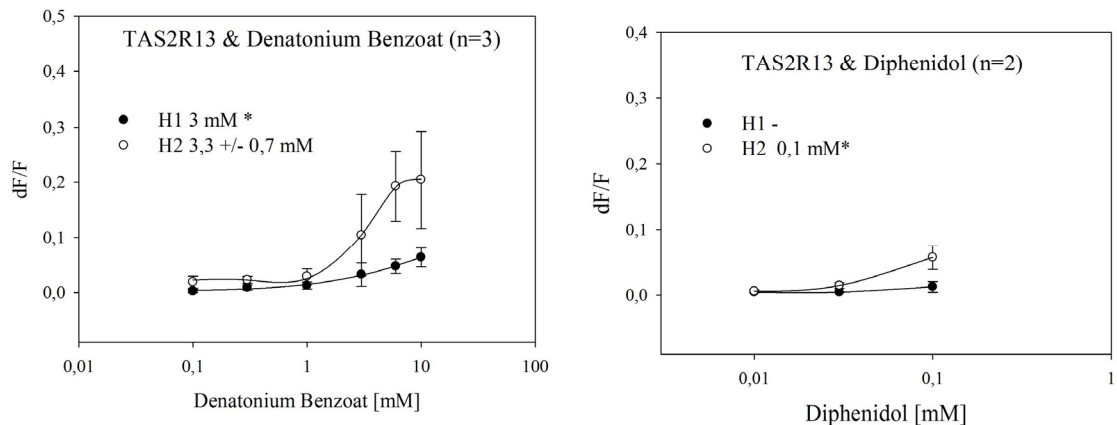


Abb. 32: Dosis-Wirkungskurven der TAS2R13-Haplotypen

Aus Fluoreszenzsignalen von TAS2R13 H1- und H2-exprimierenden HEK293T_{G16Gust44}-Zellen wurden nach Applikation steigender Konzentrationen Denatoniumbenzoat und Diphenidol Dosis-Wirkungskurven erstellt und Schwellenwerte* ermittelt.

Beide Substanzen waren keine guten Aktivatoren des TAS2R13 und führten nur zu kleinen Signalen (siehe Abb. 32), was besonders beim H1 die Bestimmung der Sensitivität erschwerte. Während der H1 kein Signal für Diphenidol zeigte, wurde für Denatoniumbenzoat ein Schwellenwert von 3 mM ermittelt. Der TAS2R13 H2 war mit einem EC₅₀-Wert von 3,3 mM für Denatoniumbenzoat und einem Schwellenwert von 0,1 mM für Diphenidol sensitiver und zeigte deutlich höhere Signalamplituden. Die Amplituden für Denatoniumbenzoat betragen 0,06 für den H1 und 0,2 für den H2. Die scheinbar niedrigere Sensitivität des H1 könnte auch an der geringen Signalthöhe liegen, die schon für den aktiveren H2 nah am Detektionslimit lag.

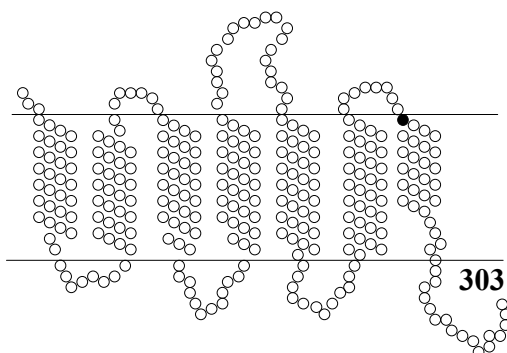


Abb. 33: Rezeptormodell des TAS2R13 mit markiertem Polymorphismus

Markiert ist der Aminosäureaustausch N259S der zu zwei TAS2R13-Haplotypen führte.

Den Experimenten mit Denatoniumbenzoat zufolge, führte der Austausch N259S an der extrazellulären Seite der 7. Transmembrandomäne im H2 (Abb. 33) zu einer effizienteren Rezeptoraktivierung. Für eine genauere Analyse der Rezeptoreigenschaften wären potentere Agonisten dieses Rezeptors notwendig.

4.3.4.3 TAS2R16

In den drei vorherrschenden Haplotypen des TAS2R16 traten die Aminosäureaustausche N172K und R222H auf. Der H1 war durch die Kombination N172/H222, der H2 durch N172/R222 und der H3 durch K172/H222 definiert. Der TAS2R16 ist als β -Glucopyranosid-Bitterrezeptor beschrieben, der durch zahlreiche Vertreter dieser sekundären Pflanzenstoffe aktivierbar ist {Bufo et al., 2002}. Für die Calcium-Imaging-Experimente wurden die beiden Vertreter Arbutin und Helicin ausgewählt.

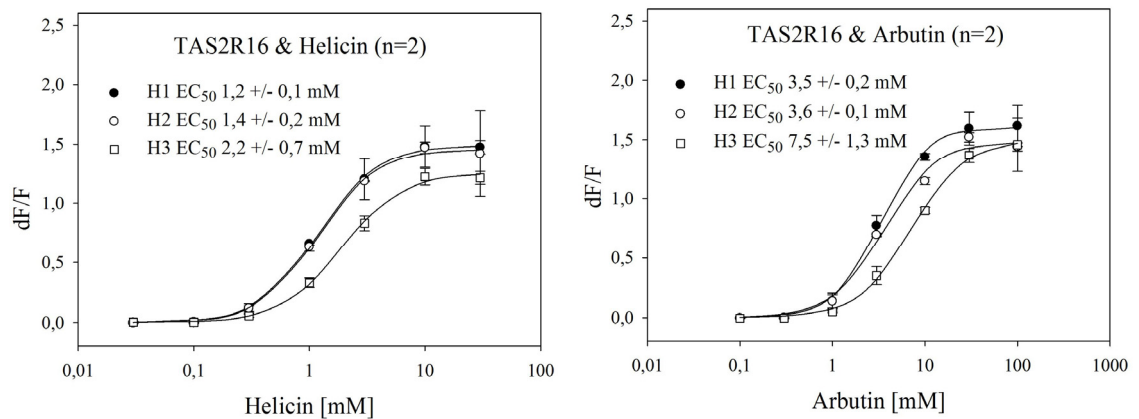


Abb. 34: Dosis-Wirkungskurven der TAS2R16-Haplotypen

Aus Fluoreszenzsignalen von TAS2R16 H1 bis H3-exprimierenden HEK293T_{G16Gust44}-Zellen wurden nach Applikation steigender Konzentrationen von Helicin und Arbutin Dosis-Wirkungskurven erstellt und EC₅₀-Werte ermittelt.

Wie Abb. 34 zeigt, wurden alle TAS2R16-Haplotypen durch beide Agonisten aktiviert. Helicin ergab für den H1 und H2 vergleichbare EC₅₀-Werte von 1,2 mM und 1,4 mM, sowie ähnliche Amplituden von 1,5 und 1,4. Der H3 war weniger sensitiv mit einem EC₅₀-Wert von 2,2 mM, aber vergleichbarer Signalamplitude von 1,2. Für Arbutin lagen die EC₅₀-Werte für H1 und H2 bei 3,5 mM und 3,6 mM und die Amplituden bei 1,6 und 1,4. Der EC₅₀-Wert des H3 für Arbutin lag bei 7,5 mM und die Amplitude vergleichbar bei 1,5. Der TAS2R16 H3 unterschied sich von den funktionell gleichen H1 und H2, durch eine fast

zweifach geringere Sensitivität für beide Agonisten. Die beobachteten funktionellen Unterschiede dieser TAS2R16 Haplotypen bestätigten bereits publizierte Daten {Soranzo et al., 2005}.

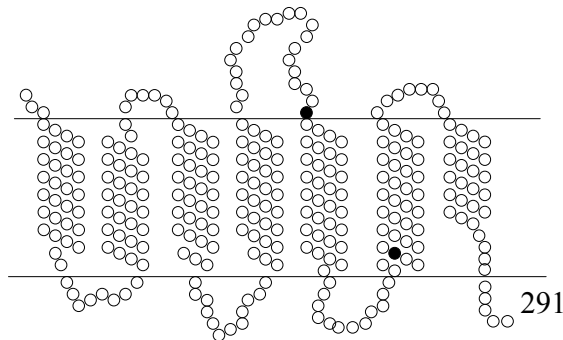


Abb. 35: Rezeptormodell des TAS2R16 mit markierten Polymorphismen

Markiert sind die Aminosäureaustausche N172K und R222H, die in den drei TAS2R16-Haplotypen vorkamen.

Abb. 35 stellt die beiden häufigen Polymorphismen des TAS2R16 dar. Der Aminosäureaustausch R222H in der sechsten Transmembrandomäne hatte keinen Einfluss auf die Rezeptoreigenschaft, da TAS2R16 H1 und H2 funktionell gleich waren. Der Austausch N172K in der zweiten extrazellulären Schleife des H3 führte zu einer zweifach verminderten Sensitivität, beeinflusste die Signalamplitude jedoch nicht.

4.3.4.4 TAS2R43

Der TAS2R43 wies zwei vorherrschende Haplotypen auf, die sich in den Aminosäurepositionen S35W und R212H unterschieden. Der H1 war durch die Kombination S35/R212 und der H2 durch W35/H212 definiert. Als Agonisten wurden die beiden Glucopyranoside Helicin und Aloin ausgewählt.

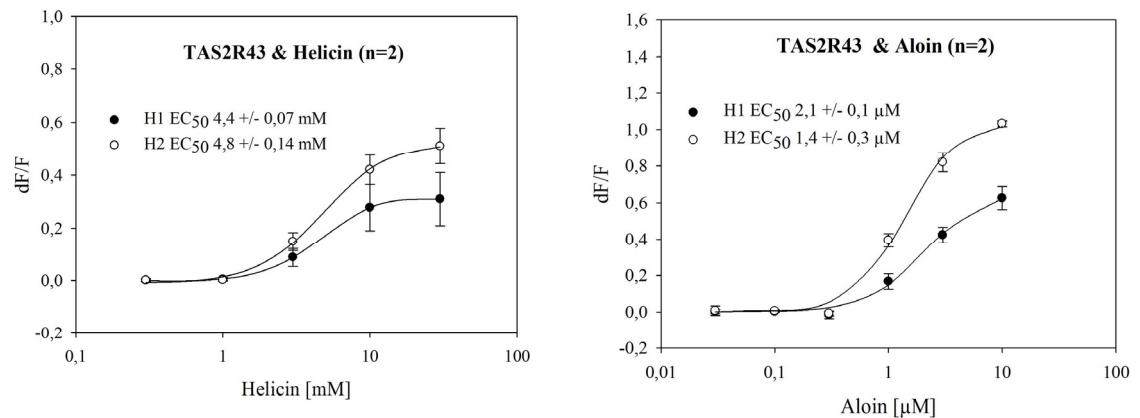


Abb. 36: Dosis-Wirkungskurven der TAS2R43-Haplotypen

Aus Fluoreszenzsignalen von TAS2R43 H1- und H2-exprimierenden HEK293T_{G16Gust44}-Zellen wurden nach Applikation steigender Konzentrationen von Helicin und Aloin Dosis-Wirkungskurven erstellt und EC₅₀-Werte ermittelt.

Beide TAS2R43 Haplotypen wurden durch Helicin und Aloin aktiviert, wobei Aloin mit fast tausendfachen geringeren Konzentrationen der deutlich potentere Ligand war. Helicin ergab für H1 und H2 EC₅₀-Werte von 4,4 mM bzw. 4,8 mM und Amplituden von 0,3 bzw. 0,5. Für Aloin betrug die EC₅₀-Werte 2,1 µM und 1,4 µM und die Amplituden lagen bei 0,6 und 1,0. Für beide Substanzen zeigte der H1 kleinere Signale und eine etwas verminderte Sensitivität, was bei dem potenteren Liganden Aloin deutlicher sichtbar war. Die beobachteten Unterschiede bestätigten bereits publizierte Daten {Pronin et al., 2007}.

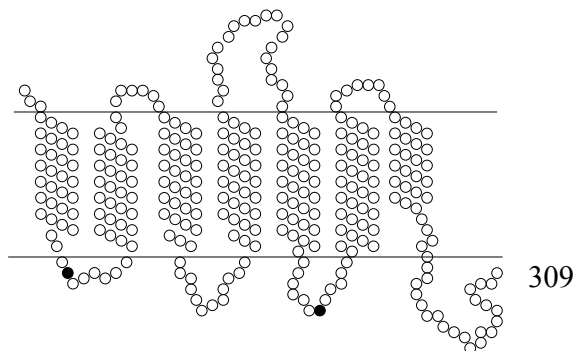


Abb. 37: Rezeptormodell des TAS2R43 mit markierten Polymorphismen

Markiert sind die Aminosäureaustausche S35W und R212H der beiden TAS2R43-Haplotypen.

Die polymorphe Aminosäure W35 in der ersten intrazellulären Schleife des TAS2R43 ist in den meisten TAS2Rs konserviert (siehe Abb. 37). Ihr Austausch führt im TAS2R43 H1 zu einer geringeren Rezeptoraktivität. Der zweite Austausch R212H hatte keinen

entscheidenden Einfluss, was durch die Analyse der seltenen TAS2R43-Variante S35/212H bereits gezeigt wurde {Pronin et al., 2007}.

4.3.4.5 TAS2R49

Vom TAS2R49 gab es vier häufige Varianten, die sich in den sieben Aminosäurepositionen K79E, V141I, H143Q, H148N, I236V, F252S und R255L unterschieden. Der H1 war durch die Kombination KVHHIFR, der H2 durch EVHHIFR, der H3 durch KVQNVSL und der H4 durch KIQNVSL definiert. Dabei unterschieden sich der H1 vom H2 sowie der H3 vom H4 in jeweils nur einer Position, während die beiden Gruppen in nahezu allen polymorphen Aminosäuren voneinander abwichen. Für den TAS2R49 waren nur die zwei synthetischen Agonisten Cromolyn und Diphenidol bekannt, die in den Calcium-Imaging-Experimenten eingesetzt wurden.

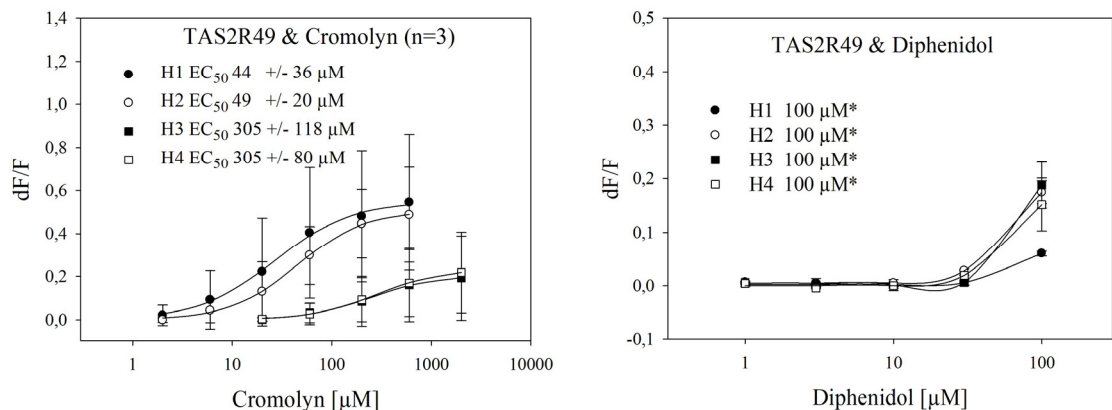


Abb. 38: Dosis-Wirkungskurven der TAS2R49-Haplotypen

Aus Fluoreszenzsignalen von TAS2R49 H1- bis H4-exprimierenden HEK293T_{G16Gust44}-Zellen wurden nach Applikation steigender Konzentrationen von Cromolyn und Diphenidol Dosis-Wirkungskurven erstellt und EC₅₀- bzw. Schwellenwerte* ermittelt.

Wie Abb. 38 zeigt, waren alle TAS2R49-Haplotypen durch beide Agonisten aktivierbar. Für Diphenidol ergab jedoch nur die höchste einsetzbare Konzentration von 100 μM ein Signal. Für Cromolyn ergaben sich vollständige Dosis-Wirkungskurven. Der H1 und H2 zeigten mit EC₅₀-Werten von 44 μM und 49 μM und Amplituden von 0,5 vergleichbare Eigenschaften. Sie unterschieden sich durch eine fast sechsfach höhere Sensitivität und doppelte Signalthöhen vom TAS2R49 H3 und H4. H3 und H4 waren ebenfalls funktionell gleich mit einem EC₅₀-Wert von 305 μM und einer Signalamplitude von 0,2.

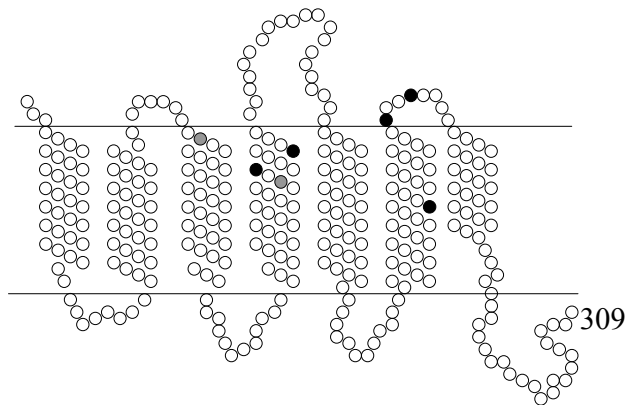


Abb. 39: Rezeptormodell des TAS2R49 mit markierten Polymorphismen

Markiert sind die sieben Aminosäureaustausche K79E, V141I, H143Q, H148N, I236V, F252S und R255L, die in den vier häufigsten TAS2R49-Haplotypen auftraten. Die erste grau markierte Aminosäure stellt den einzigen Unterschied zwischen H1 und H2 dar, die zweite den einzigen Unterschied zwischen H3 und H4.

In Abb. 39 sind alle polymorphen Aminosäuren der TAS2R49-Haplotypen dargestellt. Grau markiert sind die einzigen unterschiedlichen Positionen (K79E; V141I) zwischen den funktionell gleichen H1 und H2 bzw. H3 und H4. Sie haben demnach keinen Einfluss auf die Rezeptorfunktion. Welche der fünf weiteren Polymorphismen für die starke Modulation der Sensitivität zuständig ist, bleibt zu untersuchen.

4.4 Funktionelle Charakterisierung einzelner TAS2Rs

4.4.1 TAS2R46 und TAS2R47

Der TAS2R46 gehört zu den drei Bitterrezeptoren mit dem größten und strukturell vielfältigsten Agonistenspektrum {Meyerhof et al., 2010}. Viele Aktivatoren gehören zur Stoffklasse der Sesquiterpenlactone, die den Hauptbestandteil von Bitterstoffen in zahlreichen Gemüsesorten, Kräutern und Arzneipflanzen darstellen und somit besonders ernährungsrelevant sind {Brockhoff et al., 2007}. Der TAS2R46 gehört zu einem Bitterrezeptorcluster aus fünf TAS2Rs auf dem Chromosom 12. Diese Rezeptoren weisen große Sequenzhomologien auf und könnten durch Genduplikation eines Urgens entstanden sein {Go et al., 2005}. Aus dieser TAS2R-Gruppe stimmt der TAS2R47 nicht nur in 82% seiner Aminosäuren mit dem TAS2R46 überein, sondern weist auch gemeinsame Agonisten

auf. Aufgrund seines großen und besonders ernährungsrelevanten Ligandenspektrums sind Phänotyp-Genotypanalysen des TAS2R46 von besonderem Interesse. In einer Probandengruppe aus ca. 60 Kaukasiern wurden sensorische Studien mit verschiedenen TAS2R46-Agonisten durchgeführt (unveröffentlicht). Die Genotypisierung und funktionelle Charakterisierung der auftretenden TAS2R46- und TAS2R47-Haplotypen *in vitro* war dabei Teil dieser Arbeit. Sequenzanalysen des TAS2R46 ergaben die zwei Polymorphismen L228M und W250Stopp, woraus drei Haplotypen resultierten (Tab. 12). Der TAS2R46 ist neben dem TAS2R7 der zweite Rezeptor indem ein *nonsense*SNP zu einem vorzeitigen Stoppkodon und damit zu einem, um zwei Transmembrandomänen, verkürzten Rezeptor führte. Der H1 war durch die Aminosäurekombination L228/W250, der H2 durch M228/W250 und der H3 durch M228/250_{Stopp} definiert. Alle drei Rezeptorvarianten zeigten relativ hohe Allelfrequenzen von fast 50% für den H1 und jeweils ca. 25% für die anderen beiden Haplotypen.

Tab. 12: Haplotypen des TAS2R46 und deren Häufigkeit in Kaukasiern (n=64)

TAS2R46	nt as	T682A L228M	G749A W250Stopp	%
H1		L	W	49
H2		M	W	26
H3		M	Stopp	25

Sequenzanalysen des TAS2R47 ergaben die drei polymorphen Aminosäuren H174R, L252F und L281W, woraus vier Haplotypen resultierten. H1 und H2 waren mit 50% bzw. 48% sehr häufig, während H3 und H4 in jeweils nur 1% der Allele auftraten (Tab. 13). H1 war durch die Kombination H174/L252/L281, H2 durch H174/F252/L281, H3 durch R174/L252/L281 und der H4 durch H174/F252/W281 definiert.

Tab. 13: Haplotypen des TAS2R47 und deren Häufigkeit in Kaukasiern (n=64)

TAS2R47	nt as	A521G H174R	G756T L252F	T842G L281W	%
H1		H	L	L	50
H2		H	F	L	48
H3		R	L	L	1
H4		H	F	W	1

Für die funktionelle Charakterisierung aller TAS2R46- und TAS2R47-Haplotypen wurden fünf bekannte TAS2R46-Agonisten ausgewählt, die zu verschiedenen Substanzklassen wie den Sesquiterpenlactonen (Absinthin), Terpenen (Amarogentin, Quassin) und Alkaloiden (Brucin, Chinin) gehörten. Als einzige synthetische Substanz wurde Denatoniumbenzoat ausgewählt. Abb. 40 zeigt exemplarisch für die zwei Substanzen Absinthin und Denatoniumbenzoat Dosis-Wirkungskurven der sieben Haplotypen.

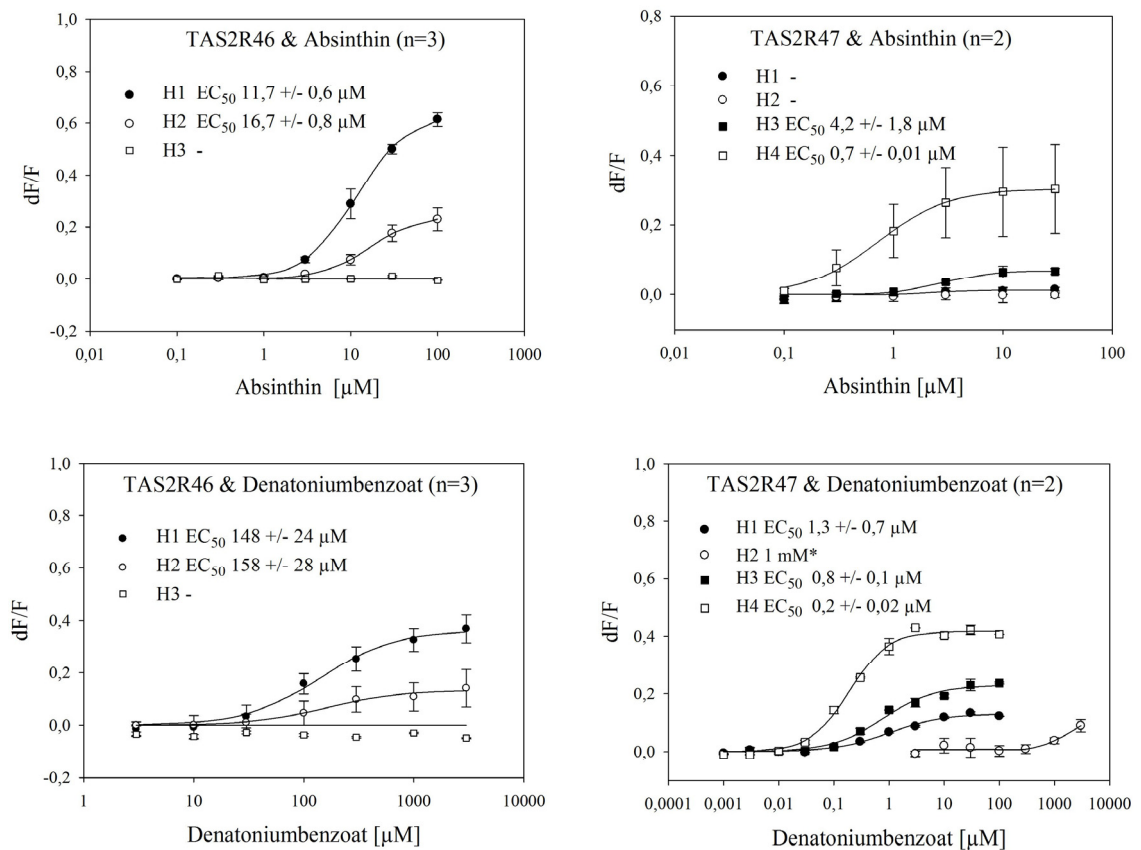


Abb. 40: Dosis-Wirkungskurven der TAS2R46/TAS2R47-Haplotypen

Aus Fluoreszenzsignalen von TAS2R46 H1-3- und TAS2R47 H1-4-exprimierenden HEK293T_{G16Gust44}-Zellen wurden nach Applikation steigender Konzentrationen von Absinthin und Denatoniumbenzoat Dosis-Wirkungskurven erstellt und EC_{50} - bzw. Schwellenwerte* ermittelt.

Alle Haplotypen zeigten für die Agonisten unterschiedliche Rezeptoreigenschaften. Der verkürzte TAS2R46 H3 war nicht funktionell. TAS2R46 H1 war etwas sensitiver als H2 und zeigte ca. zweifach höhere Amplituden. Die Haplotypen des TAS2R47 zeigten steigende Sensitivitäten von H2>H1=H3>H4 und entsprechend steigende Signalamplituden. Tab. 14 zeigt eine Übersicht der ermittelten EC_{50} - und Schwellenwerte für alle getesteten Agonisten.

Tab. 14: Übersicht EC₅₀- bzw. Schwellenwerte der TAS2R46/TAS2R47-Haplotypen

Dargestellt sind Mittelwerte für den EC₅₀-Wert bzw. für den Schwellenwert[#] aus mind. zwei unabhängigen Experimenten in transfizierten HEK293T_{G16Gust44}-Zellen.

EC ₅₀ [μM] / SW [#]	TAS2R46			TAS2R47			
	H1	H2	H3	H1	H2	H3	H4
Absinthin	12 ± 0,6	17 ± 0,8**	-	-	-	4,2 ± 1,8	0,7 ± 0,01*
Amarogentin	76 ± 1	90 ± 21	-	-	-	0,13 ± 0,08	0,09 ± 0,04
Brucin	10 [#]	100 [#]	-	-	-	-	7,8 ± 0,3
Chinin-HCl	17 ± 5	27 ± 12	-	30 [#]	-	30 [#]	21 ± 7
Quassin	74 ± 7	92 ± 4 *	-	3,8 ± 1,7	3 [#]	4 ± 0,6	1 ± 0,4 *
Denatonium- benzoat	148 ± 24	158 ± 28	-	1,3 ± 0,7	1000 [#]	0,8 ± 0,1	0,2 ± 0,02 *

T-Test: * p < 0,05 ; ** < 0,01

Die beobachteten funktionellen Unterschiede der Haplotypen für Absinthin und Denatoniumbenzoat bestätigten sich für alle Agonisten. Es gab keine agonistenspezifischen Auswirkungen der einzelnen Polymorphismen, da die Rezeptoreigenschaften der TAS2R-Varianten für alle Agonisten gleich waren. Der verkürzte TAS2R46 H3 war durch keinen Agonisten aktivierbar. Der TAS2R46 H1 reagierte auf alle Agonisten, wobei für Brucin aufgrund von Artefakten keine Sättigung erreicht wurde. H2 reagierte mit etwas geringerer Sensitivität und zweifach reduzierten Signalamplituden auf alle Agonisten.

Bis auf den H1 waren alle TAS2R47-Haplotypen deutlich sensitiver als die funktionellen TAS2R46-Varianten. TAS2R47 H1 und H2 reagierten nur auf drei bzw. zwei Agonisten im anwendbaren Konzentrationsbereich. Diese beiden Haplotypen kommen zusammen in 98% der analysierten TAS2R47-Allele vor. Nur das Agonistenspektrum des TAS2R47 H4 stimmte vollständig mit dem, des TAS2R46 überein und zeigte sogar eine über siebenhundertfach höhere Sensitivität.

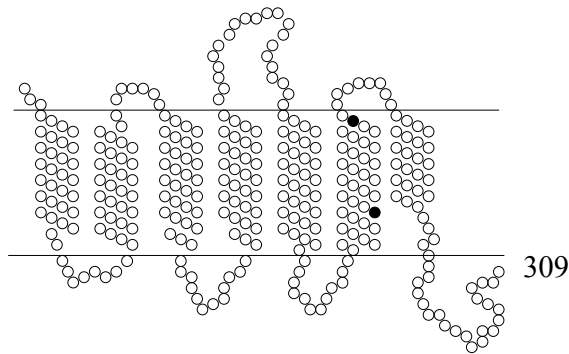


Abb. 41: Rezeptormodell des TAS2R46 mit markierten Polymorphismen

Markiert sind die beiden SNPs L228M und W250Stop, die in den drei TAS2R46-Varianten auftraten.

Abb. 41 stellt die zwei Polymorphismen des TAS2R46 dar. Während der *nonsense*-Polymorphismus im H3 einen nicht funktionellen Rezeptor zur Folge hatte, verringerte der Aminosäureaustausch L228M in der 6. Transmembrandomäne des TAS2R46 H2 deutlich die Signalamplitude und damit die Effizienz der Signalweiterleitung. Die Sensitivität war nur geringfügig beeinflusst.

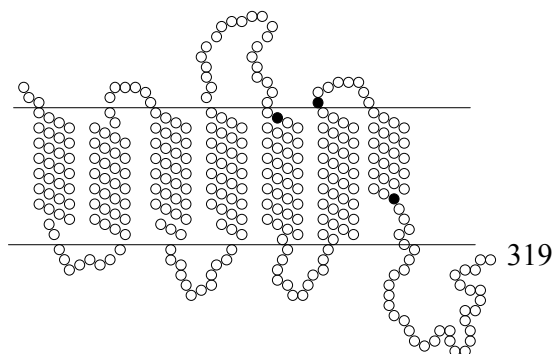


Abb. 42: Rezeptormodell des TAS2R47 mit markierten Polymorphismen

Markiert sind die SNPs H174R, L252F und L281W, die in den vier TAS2R47-Varianten auftraten.

Abb. 42 stellt die drei Polymorphismen des TAS2R47 dar. Alle Polymorphismen führten zu Änderungen der Rezeptoreigenschaften. Der Austausch H174R in der fünften Transmembrandomäne, der den H1 vom H3 unterschied, führte zu höheren Signalamplituden. Der Polymorphismus L252F in der 3. extrazellulären Schleife, der auch im TAS2R49 als F252S auftritt, sorgt für den deutlichen Sensitivitätsunterschied zwischen den beiden häufigen Varianten H1 und H2. Den stärksten Einfluss hatte der Austausch

L281W in der 7. Transmembrandomäne, der aus der fast inaktiven Rezeptorvariante H2, den sensitivsten TAS2R47 H4 machte.

4.4.2 TAS2R38

Die funktionellen Unterschiede der beiden häufigsten TAS2R38 Haplotypen PAV und AVI, die den zuvor beschriebenen Phenylthiocarbamid-Phänotyp bestimmen, wurden bereits ausführlich in der Literatur beschrieben {Fox, 1932; Drayna et al., 2003; Kim et al., 2003}. Während der PAV (H1) funktionell ist, wurde bislang keine Aktivierung des AVI (H2) beobachtet. Trotzdem werden beide Haplotypen durch balancierte Selektion in hoher Frequenz in allen weltweit-analysierten ethnischen Gruppen gehalten {Wooding et al., 2004}. Die beiden Haplotypen unterscheiden sich in den variablen Aminosäuren P49A, A262V und V296I, nach deren Kombination sie auch benannt sind. Es zeigte sich, dass besonders die ersten zwei Positionen für die Funktionalität entscheidend sind {Bufe et al., 2005}. Im Folgenden sind Dosis-Wirkungskurven der beiden häufigen TAS2R38-Varianten, sowie der seltenen Variante AAI nach Applikation von Phenylthiocarbamid (PTC) dargestellt.

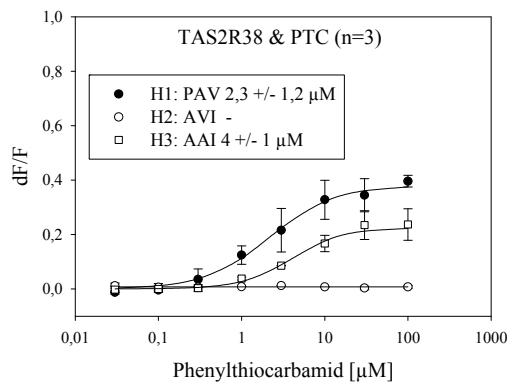


Abb. 43: Dosis-Wirkungskurven der TAS2R38-Haplotypen

Aus Fluoreszenzsignalen von HEK293T_{G16Gus44}-Zellen, die die drei häufigsten TAS2R38-Haplotypen exprimierten, wurden nach Applikation steigender Konzentrationen von Phenylthiocarbamid Dosis-Wirkungskurven erstellt und EC_{50} -Werte ermittelt.

Wie bereits in der Literatur beschrieben, war der AVI nicht funktionell, während PAV fast zweifach sensitiver als die seltene Variante AAI war. Auf dem genetischen Hintergrund dieser drei Varianten fand unser Kooperationspartner S. Wooding (Universität Texas, USA) durch das Sequenzieren von 285 genomischen DNA-Proben, zehn neue nsSNPs. Da es sich

meist um heterozygote Probanden handelte, stellte sich die Frage, auf welchem der drei genannten Haplotypenhintergründe die neuen Polymorphismen auftreten und ob sie deren Funktionalität beeinflussen. Dazu wurden in dieser Arbeit die neuen TAS2R38-Varianten kloniert und funktionell durch Calcium-Imaging-Experimente charakterisiert.

Es wurden sechs neue PAV-basierte Haplotypen identifiziert, die sich jeweils in einem nsSNP vom Wildtyp unterschieden. Auf dem Hintergrund des AAI und der Nichtschmeckervariante AVI ergaben sich jeweils zwei neue Haplotypen mit einem Aminosäureaustausch. Als Liganden dienten das synthetische Phenylthiocarbamid, sowie die beiden natürlichen Bitterstoffe Allylisothiocyanat (AITC) und Phenylethylisothiocyanat (PEITC). Sie kommen in vielen Kohlsorten vor und enthalten die, für TAS2R38-Aktivatoren charakteristische, Thioharnstoffgruppe (NCS).

Tab. 15 fasst die funktionellen Daten aller Haplotypen zusammen. Alle PAV-Haplotypen konnten durch die drei Agonisten aktiviert werden, wobei Phenylthiocarbamid der potenteste Agonist war, gefolgt von Allylisothiocyanat und Phenylethylisothiocyanat. Für Phenylthiocarbamid und Allylisothiocyanat konnten die EC_{50} -Werte der PAV-basierten Haplotypen ermittelt werden. Für Phenylethylisothiocyanat sind aufgrund fehlender Signalsättigung nur Schwellenwerte dargestellt. Zwei PAV-basierende Varianten mit dem Austausch S51G und S251F wichen signifikant vom Wildtyp ab. Der PAV S251F war der sensitivste Haplotyp und erreichte als einziger eine Signalsättigung für Phenylethylisothiocyanat, woraus sich ein EC_{50} -Wert von 11 μ M ergab. PAV S51G war fast zweifach weniger sensitiv als der Wildtyp. Beide Varianten zeigten verminderte Signalamplituden.

Bei den AAI-basierten Haplotypen führten beide Aminosäureaustausche W135G und R274C zur Nichtfunktionalität. Die neuen AVI-Varianten mit dem Austausch R64Q bzw. D275N zeigten, wie der Wildtyp, keine Rezeptoraktivität.

Tab. 15: Überblick über die TAS2R38-Haplotypen und deren funktionelle Daten

TAS2R38	PTC [μ M] n=3		AITC [μ M] n=3		PEITC [μ M] n=3	
	EC ₅₀	Amplitude	EC ₅₀ /SW [#]	Amplitude	EC ₅₀ /SW [#]	Amplitude
PAV	2,3 ± 1,2	0,4 ± 0,02	315 ± 61	0,2 ± 0,07	30 [#]	0,3 ± 0,05
V36I	2,9 ± 0,4	0,5 ± 0,1	265 ± 62	0,2 ± 0,01	30 [#]	0,3 ± 0,09
S51G	4,3 ± 1,7**	0,3 ± 0,07	731 ± 75**	0,1 ± 0,07	30 [#]	0,1 ± 0,1
K139R	1,4 ± 0,3	0,5 ± 0,2	291 ± 98	0,4 ± 0,03	30 [#]	0,4 ± 0,16
N190S	2,1 ± 0,6	0,5 ± 0,06	355 ± 141	0,4 ± 0,05	30 [#]	0,3 ± 0,18
T226K	1,5 ± 0,6	0,5 ± 0,2	281 ± 68	0,3 ± 0,04	30 [#]	0,3 ± 0,13
S251F	0,8±0,3	0,2 ± 0,1	89 ± 12**	0,05 ± 0,05	11 ± 9	0,2 ± 0,05
AAI	4 ± 1	0,2 ± 0,06	1000 [#]	0,05 ± 0,05	-	-
W135G	-	-	-	-	-	-
R274C	-	-	-	-	-	-
AVI	-	-	-	-	-	-
R64Q	-	-	-	-	-	-
D275N	-	-	-	-	-	-

Anova p: * < 0,05; ** < 0,01

SW: Schwellenwert

Im folgenden Rezeptormodell des TAS2R38 (Abb. 44) sind nur die Polymorphismen markiert, die Einfluss auf die Rezeptoreigenschaften zeigten.

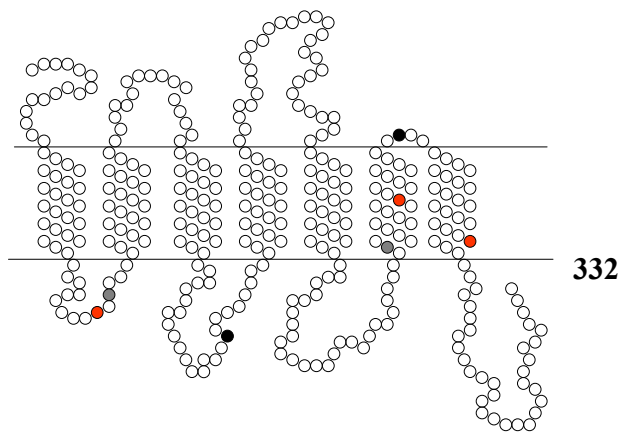


Abb. 44: Rezeptormodell des TAS2R38 mit markierten Polymorphismen

In rot dargestellt sind die Aminosäuren P49A, A262V und V296I, die den PAV, AVI und AAI definieren. In grau sind die Aminosäureaustausche S51G und S251F dargestellt, die zu signifikanten Veränderungen im PAV führen. Schwarz sind die Polymorphismen W135G und R274C markiert, die zur Nichtfunktionalität des AAI führen.

In Rot sind die drei Aminosäuren dargestellt, die die grundlegenden Haplotypen PAV, AVI und AAI definieren. Grau sind die vier Aminosäureaustausche, die zu signifikanten Änderungen der Rezeptoreigenschaften des PAV führten und schwarz die Polymorphismen im AAI. Der nichtkonservative Austausch S51G in Nachbarschaft zum funktionsdeterminierenden Polymorphismus P49A im PAV resultierte in einer geringeren Sensitivität des Rezeptors. Im Gegensatz dazu führt der ebenfalls nichtkonservative Austausch von S251F in der sechsten Transmembrandomäne zu einem ca. dreifachen Anstieg der Sensitivität. Durch seine fast cytosolische Lokalisation ist ein direkter Einfluss auf die Ligandenaffinität eher unwahrscheinlich.

5 Diskussion

5.1 Funktionelle Variabilität der TAS2Rs

Die Genotypisierung der orphanen Bitterrezeptoren in unserer Probandengruppe ergab 14 häufige, protein-kodierende Haplotypen für die fünf orphanen TAS2Rs (siehe Tab. 2). Die Genotypisierung der zwanzig deorphanisierten Bitterrezeptoren durch Kim und Kollegen ergab 48 häufige Haplotypen (siehe Tab. 1). Da die drei Rezeptoren TAS2R3, TAS2R14 und TAS2R39 nur in einer weltweit vorherrschenden Variante mit einer Allelfrequenz von mind. 97% vorkamen, wurden sie in dieser Arbeit weggelassen. Eine homogene Funktionalität ist hier vorauszusetzen. Auch die Nullallele des TAS2R43 und TAS2R45 {Pronin et al., 2007; Roudnitzky et al., 2011} konnten natürlich nicht analysiert werden. Nach Abzug dieser Allele blieben letztlich insgesamt 56 TAS2R-Varianten funktionell zu charakterisieren. Die Haplotypenanzahl pro Rezeptor lag zwischen eins und vier. Im Durchschnitt ergaben sich für jeden TAS2R 2,4 protein-kodierende Haplotypen, die 95% der analysierten Allele repräsentierten. Das Calcium-Imaging wurde mit je zwei bekannten Agonisten für die deorphanisierten Rezeptoren {Meyerhof et al., 2010} und mit über 100 verschiedenen Bitterstoffen für die orphanen TAS2Rs durchgeführt (siehe 4.2.2 Tab. 9). Der Test der orphanen Haplotypen ergab erstmals eine Aktivierung des TAS2R41. Die zwei funktionell unterschiedlichen TAS2R41-Varianten reagierten auf das Antibiotikum Chloramphenicol (siehe 4.2.3 Abb. 13). Die anderen vier Bitterrezeptoren TAS2R42, TAS2R45, TAS2R48 und TAS2R60 verblieben orphan.

Das folgende Diagramm stellt die Funktionalität aller analysierten Haplotypen jedes Bitterrezeptors dar. Die Allelfrequenz gibt ihre Häufigkeit in der Probandengruppe an. Gezeigt sind auch die Bitterrezeptoren mit nur einer vorherrschenden Variante, sowie die Nullallele des TAS2R43 und TAS2R45. Die Reaktivität der einzelnen Haplotypen ist farblich kodiert. Gelbe Haplotypen sind weniger reaktiv, zeigten also eine geringere Sensitivität und kleinere Signalamplituden, als grün markierte Haplotypen des Rezeptors. Farblich gleiche Haplotypen eines Rezeptors besitzen auch gleiche Rezeptoreigenschaften. Die vier orphanen TAS2Rs sind grau dargestellt.

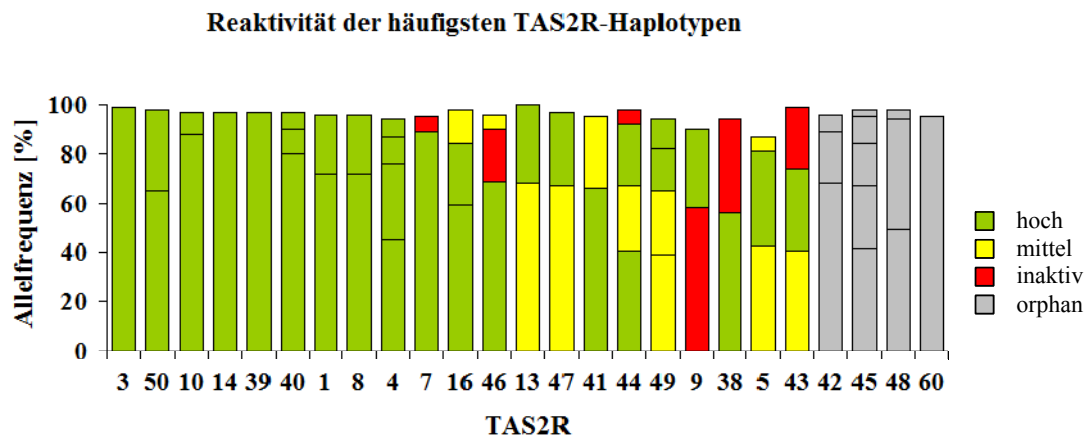


Abb. 45: Reaktivität der häufigsten Haplotypen jedes TAS2Rs

Dargestellt sind die analysierten Haplotypen jedes TAS2R, ihre Allelfrequenz (eigene Frequenzdaten für orphan TAS2Rs+TAS2R41; Frequenzdaten Kim et al. {2005} für deorphanisierte TAS2Rs) und ihre Funktionalität. Grün bedeutet hohe, gelb mittlere Reaktivität und rot beschreibt inaktive Haplotypen oder Nullallele.

Wie aus dem Diagramm ersichtlich, ist die funktionelle Variabilität deutlich kleiner als die genetische Variabilität erwarten ließ {Kim et al., 2005}. Auf die nun 21 deorphanisierten TAS2Rs entfielen 50 Allele unter denen sich jedoch nur 36 funktionell unterschiedliche Rezeptorvarianten fanden. Der TAS2R49 besitzt z.Bsp. vier häufige Haplotypen, von denen jedoch zwei jeweils gleiche Rezeptoreigenschaften aufweisen, sodass es letztlich zwei funktionelle Varianten dieses Rezeptors gibt.

Fast die Hälfte der deorphanisierten TAS2Rs (-R3; -R50, -R10, -R14, -R39, -R40, -R1, -R8, -R4) besaß ausschließlich funktionell homogene Haplotypen. Somit haben viele Aminosäureaustausche als Folge von nsSNP keine funktionellen Konsequenzen. Von den anderen 12 Bitterrezeptoren gab es mehrere funktionelle Haplotypen. Neun Rezeptoren (TAS2R7, -R16, -R41, -R13, -R47, -R49, -R9, -R38, -R5) wiesen zwei funktionelle Haplotypen auf. Für die Rezeptoren TAS2R43, TAS2R44 und TAS2R46 konnten drei funktionelle Varianten identifiziert werden, unter denen es jeweils einen nicht-funktionellen Haplotypen gab. Bei dem TAS2R43 handelte es sich um das Nullallel {Pronin et al., 2007; Roudnitzky et al., 2011}, bei dem TAS2R46 um die verkürzte Rezeptorvariante und beim TAS2R44 um den Haplotyp 4. Die Frequenz des TAS2R43-Nullalleles wurde von Kim et al. nicht direkt bestimmt, sondern nur aufgrund fehlender PCR-Produkte bei einigen Probanden erkannt, sodass die angegebenen TAS2R43-Frequenzen nur näherungsweise die Realität widerspiegeln. 14 Probanden mit homozygotem Nullallel ergaben eine Frequenz von mindestens 25%, wobei der Anteil der heterozygoten Träger unbekannt blieb {Kim et al., 2005}. Durch eine Analyse der TAS2R43-Kopienzahl wurde jedoch für eine

kaukasische Probandengruppe (n=60) eine Frequenz des TAS2R43 H0 von 50% ermittelt {Roudnitzky et al., 2011}.

Zusammenfassend haben die Untersuchungen gezeigt, dass von den insgesamt 50 analysierten Varianten der deorphanisierten TAS2Rs 36 funktionell unterschiedlich sind. Diese analysierten 50 Varianten stellen jedoch nur etwa die Hälfte der von Kim postulierten 103 möglichen TAS2R-Varianten dar. Der Grund hierfür ist, dass die zusätzlichen 50 Haplotypen mit einer weltweiten Allelfrequenz von nur 1-2% sehr selten sind und überwiegend in der afrikanischen Bevölkerung auftreten. Funktionelle Varianten unter diesen Haplotypen sind wahrscheinlich, spielen jedoch, durch ihr seltenes Vorkommen, eine untergeordnete Rolle für phänotypische Analysen weltweiter Bevölkerungsgruppen. Laut Kim et al. konnten in den sequenzierten 110 Allelen 99% der weltweiten TAS2R-Haplotypen mit einer Allelfrequenz von mindestens 3% identifiziert werden, sodaß die hier funktionell charakterisierten Varianten, die überwiegende Mehrheit der existierenden TAS2R-Allele repräsentieren {Kim et al., 2005}. Mit durchschnittlich 1,8 funktionellen Varianten je deorphanisiertem Rezeptor ist die weltweite funktionelle TAS2R-Heterogenität, zumindest in den nicht-afrikanischen Gruppen, weit geringer als deren genetische Variabilität suggeriert.

5.2 Funktionelle Diversität der analysierten ethnischen Gruppen

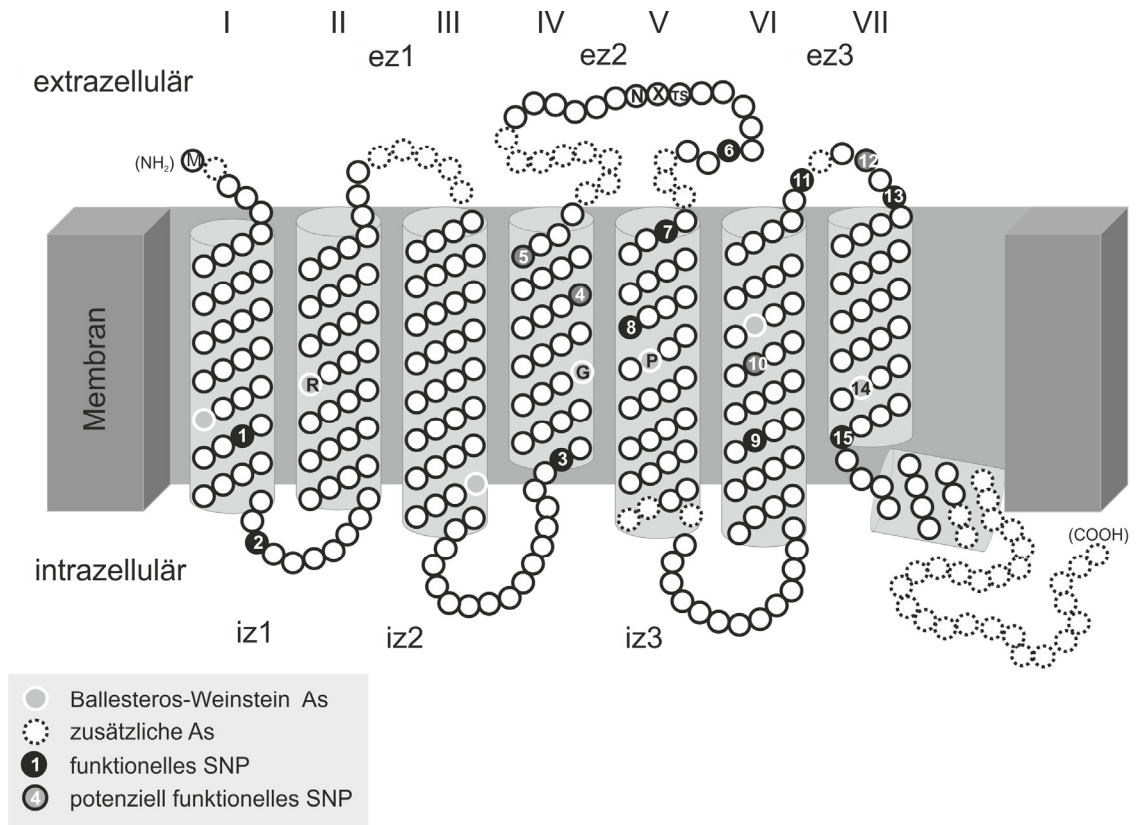
Im Folgenden wurde das Auftreten der funktionellen Haplotypen in den verschiedenen ethnischen Gruppen untersucht {Kim et al., 2005}. Von den zwölf Bitterrezeptoren, die funktionell unterschiedliche Haplotypen aufwiesen, traten diese bei 7 TAS2Rs in allen analysierten Gruppen vergleichbar auf. Für den TAS2R38 wurde dies bereits beschrieben und eine balancierende Selektion der beiden vorherrschenden Varianten in zahlreichen Ethnien festgestellt {Wooding et al., 2004}. Bei den fünf Rezeptoren TAS2R7, TAS2R16, TAS2R41, TAS2R43 und TAS2R46 zeigten sich Unterschiede in den analysierten Gruppen. Für den TAS2R16 wurde das ausschließliche Auftreten des älteren Haplotypen (H3), welcher durch K127 charakterisiert ist, in afrikanischen Bevölkerungsgruppen bereits beobachtet. Dies wurde durch natürliche Selektion dieser weniger sensitiven Variante {Soranzo et al., 2005} bzw. durch Selektion der jüngeren, sensitiveren TAS2R16-Haplotypen (H1, H2) in den anderen ethnischen Gruppen begründet {Li et al., 2011}.

Der nicht-funktionelle, verkürzte Haplotyp des TAS2R7 trat ebenfalls ausschließlich in der nordamerikanischen Bevölkerungsgruppe auf. Für den TAS2R43 weichen die ethnischen Gruppen besonders stark voneinander ab. Obwohl die Angaben der Allelfrequenzen für den TAS2R43 auf Grund der fehlenden Frequenzbestimmung des Nullalleles ungenau sind, tritt der reaktivere H2 nach den Daten von Kim {Kim et al., 2005} nur in der afrikanischen Bevölkerung auf, während Probanden, die homozygot für das Nullallel sind, ausschließlich bei den Europäern auftreten. Eine andere Studie fand den TAS2R43 H2 bzw. WH zu 16% auch in einer Gruppe von 55 Kaukasiern und Asiaten vertreten {Pronin et al., 2007}.

Die weniger reaktive TAS2R46-Variante H2 trat ausschließlich in der europäischen Bevölkerung auf. Für den TAS2R41 war auffällig, dass in der afrikanischen Gruppe nur der sensitivere Haplotyp H1 auftrat. Ob das ethnien-spezifische Auftreten funktioneller Varianten dieser fünf Bitterrezeptoren eine Folge von Anpassung an lokale Lebensumstände und damit positive Selektion ist wie beim TAS2R16 oder unabhängig von lokalen Gegebenheiten, als Folge eines neutralen genetischen Drifts von Genen unter geringem Selektionsdruck auftritt, bleibt zu untersuchen.

5.3 Funktionelle Polymorphismen

Insgesamt wurden 15 polymorphe Aminosäuren identifiziert, die die Rezeptoreigenschaften der TAS2R-Haplotypen veränderten. Die *nonsense*-Polymorphismen des TAS2R7 (siehe 4.3.3.1) und TAS2R46 (siehe 4.4.1) führten zu verkürzten, nicht-aktivierbaren Rezeptoren. Sie gaben keine Auskunft über wichtige Aminosäurepositionen und werden hier nicht behandelt. Auch auf den TAS2R38 soll später eingegangen werden. Die hier zusammengefassten Polymorphismen veränderten entweder die Rezeptorsensitivität bzw. die EC_{50} - und Schwellenwerte oder die Effizienz der Signalweiterleitung in Form veränderter Signalamplituden. Im Folgenden werden sie als funktionelle Polymorphismen bezeichnet. Der Einsatz zweier Liganden je TAS2R ergab keine ligandenspezifischen Polymorphismen, sodass die beobachteten Effekte auf alle Agonisten extrapoliert werden können. Die Lage dieser Polymorphismen im Rezeptor erlaubt Rückschlüsse auf deren mögliche Bedeutung bei der Ligandeninteraktion, der G-Proteinkopplung oder der allgemeinen Aktivierbarkeit. In Abbildung 46 sind die funktionellen Polymorphismen der verschiedenen TAS2Rs in einem Rezeptorschema durch Zahlen markiert.



- | | | |
|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 1. TAS2R5 S26I ^{1.52} | 7. -R47 H174R ^{5.37} | 12. -R49 R255L ^{ez 3} |
| 2. -R43/44 S/R35 ^{iz 1} | 8. -R9 V187A ^{5.47} | 13. -R13 N259S ^{ez 3} |
| 3. -R41 P127L ^{4.41} | 9. -R46 L228M ^{6.38} | 14. -R44 P276R ^{7.50} |
| 4. -R49 H143Q ^{4.58} | 10. -R49 I 236V ^{6.46} | 15. -R47 L281W ^{7.55} |
| 5. -R49 H148N ^{4.63} | 11. -R47 L252F ^{ez 3} | |
| 6. -R16 N172K ^{ez 2} | -R49 F252S | |

Abb. 46: TAS2R-Modell mit funktionellen Polymorphismen der zehn divergenten TAS2Rs

Das Modell basiert auf Homologie der TAS2Rs mit der Rezeptortopologie des bovinen Rhodopsins und Sequenzabgleichen mit Adrenorezeptoren. Markiert sind variable Längen zwischen TAS2Rs (gepunktet), funktionelle Polymorphismen (schwarz), potentiell funktionelle Polymorphismen des TAS2R49 (grau), sowie die in allen GPCRs konservierteste Aminosäure nach Ballesteros-Weinstein {Ballesteros und Weinstein, 1995} und die konservierte N-Glykosylierungsstelle (NXS/T). [Brockhoff et. al, 2010; modifiziert]

Dieses Schema leitet sich vom TAS2R46-Homologiemodell ab (nach Brockhoff et al., 2010), welches auf Sequenz- und Topologievergleichen mit der Röntgenkristallstruktur des aktivierten bovinen Rhodopsins {Palczewski et al., 2000} und den Sequenzen verschiedener Adrenorezeptoren basiert. Modifikationen ergaben sich nach Abgleich mit den neun funktionell divergenten TAS2Rs (-R5, -R9, -R16, -R41, -R43, -R44, -R47, -R49), die zum Teil abweichende Längen der Schleifenregionen und des C-Terminus aufwiesen. Vom

kürzesten Rezeptor ausgehend, wurden die zusätzliche Aminosäuren (As) anderer TAS2Rs gepunktet dargestellt. Das Modell zeigt die konservierteste Aminosäureposition (grau/ weiß umrandet) jeder Transmembrandomäne (TD) identifiziert durch Sequenzvergleiche aller TAS2Rs und 11 zusätzlicher GPCRs der Familie A (A. Levit, Universität Jerusalem/Israel). Die Benennung dieser Aminosäuren und der funktionellen Polymorphismen in den Transmembranregionen erfolgte nach Ballesteros-Weinstein und dient dem besseren Vergleich verschiedener GPCRs {Ballesteros und Weinstein, 1995}. Bis auf die TAS2R44- und TAS2R49-Haplotypen unterschieden sich die funktionellen Varianten der Bitterrezeptoren in nur einer Aminosäure, was zu den zehn eindeutig identifizierten Polymorphismen mit funktionellem Einfluss (schwarz markiert) führte. Der nicht-funktionelle TAS2R44 H4 wich in zwei Positionen von den aktiven Rezeptorvarianten ab. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass Prolin an der Stelle 276^{7.50} essentiell für die Rezeptorfunktion ist. Diese Position ist die konservierteste Aminosäure der 7. TD und wird deshalb als Nummer 50 festgelegt. Der Austausch Q217E im TAS2R44 veränderte die Rezeptorfunktion nicht {Roudnitzky et al., 2011}. Lediglich der Einfluss der fünf divergenten Aminosäuren der TAS2R49-Haplotypen (grau markiert) muss, beispielsweise durch gezielte Mutagenese, noch untersucht werden.

Polymorphismen beeinflussen die Ligandenaffinität des Rezeptors, wenn Aminosäuren der Bindungstasche betroffen sind. Auch Veränderungen der Konformation oder der G-Proteininteraktion durch Polymorphismen beeinflussen die Rezeptoraktivität. Wie Abbildung 46 zeigt, befanden sich dreizehn der fünfzehn funktionellen Polymorphismen in der 4.-7. Transmembrandomäne des Rezeptors. *In silico-Modelling* gestützt durch funktionelle Analysen von Rezeptormutanten ergaben, dass TAS2Rs nur eine Bindungstasche besitzen, die ebenfalls eher im C-terminalen Bereich des Rezeptors liegt. Sie setzt sich aus Aminosäuren des mittleren bis extrazellulären Bereichs der 3., 5., 6. und 7. Transmembrandomäne, sowie der 2. extrazellulären Schleife zusammen {Brockhoff et al., 2010; Sakurai et al., 2010; Dai et al., 2011; Biarnes et al., 2010}.

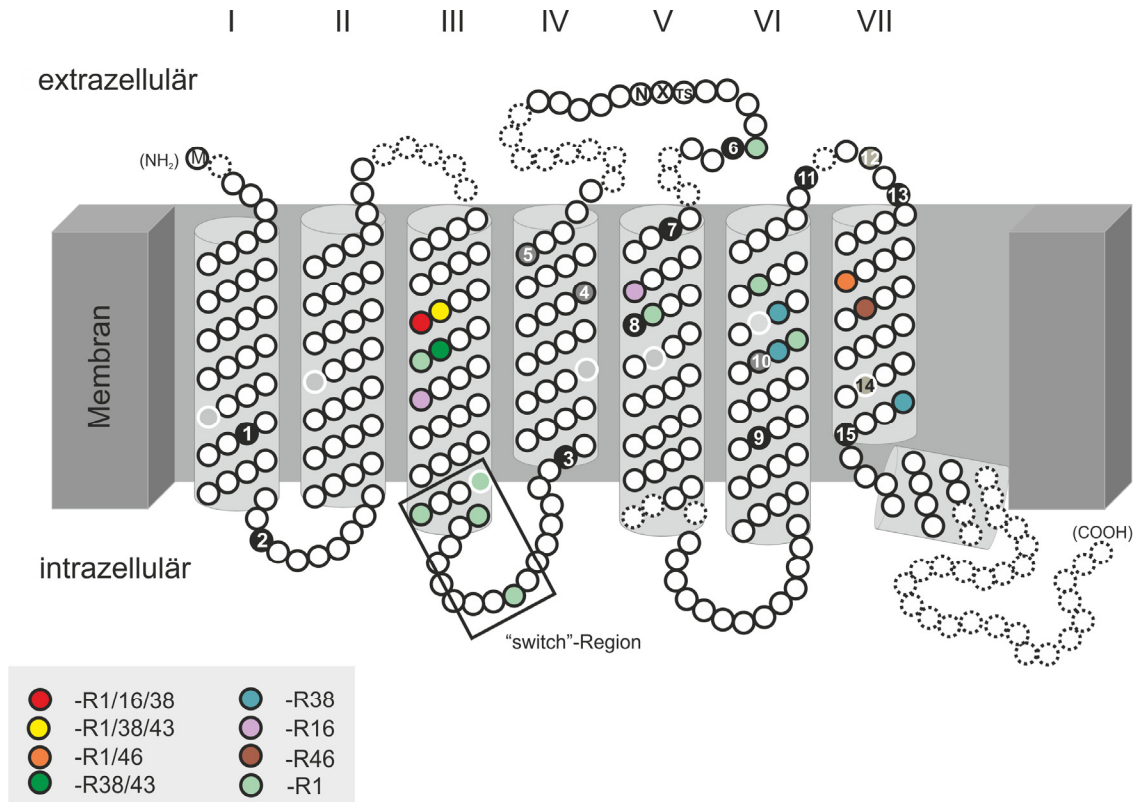
Vier Polymorphismen traten in konservierten Positionen der TAS2Rs auf (Nr. 1, 2, 10, 14). Zum Beispiel bewirkt S26I im TAS2R5 H2 (Nr.1) eine Sättigung der Rezeptorantwort für Phenanthrolin und 2-Mercaptobenzimidazol (siehe 4.3.4.1). Möglicherweise ersetzt das 26I im H2 das in allen TAS2Rs konservierte 27I. Es fehlt nur im TAS2R5 und beeinflusst offenbar die Rezeptorreaktivität.

Die restlichen elf Polymorphismen betrafen Aminosäuren, die nicht-konserviert waren, was als charakteristisch für Aminosäuren der Bindungstasche beschrieben wurde {Dai et al., 2011}. Neben dem TAS2R47 war der TAS2R49 der Rezeptor, mit den größten

Sensitivitätsunterschieden seiner funktionellen Varianten. H1/H2 zeigten sechsfach niedrigere EC_{50} -Konzentrationen, als H3/H4. In Folge der Klonierungsstrategie wichen die funktionellen Varianten zusätzlich in der letzten Aminosäure des N-terminalen Signalpeptides des Somatostatinrezeptors voneinander ab. Statt Phenylalanin enthielten der H3 und H4 ein Leucin. Ein Einfluss auf die Rezeptoraktivität scheint nicht wahrscheinlich, da funktionelle Untersuchungen am Somatostatinrezeptor Typ 3, sowie am Cannabinoidrezeptor Typ 1 einen Einfluss verschiedener N-terminaler Signalsequenzen auf die Proteinstabilität und -expression an der Zelloberfläche, nicht jedoch auf deren Ligandenaffinität {Ammon et al., 2002; Andersson et al., 2003} zeigten. Die immunzytochemischen Nachweise der Rezeptorexpression und -lokalisierung ergaben keine Unterschiede zwischen den TAS2R49-Varianten (siehe Anhang: Immunzytochemie).

5.3.1 Vergleich der Polymorphismen mit bekannten funktionellen Aminosäurepositionen

Das TAS2R-Modell in Abb. 47 zeigt farbig dargestellt Aminosäuren, die als Teil der Bindungstasche in einzelnen TAS2Rs bereits identifiziert wurden oder unabhängig von der Ligandeninteraktion, als essentiell für die Rezeptoraktivität beschrieben wurden {Brockhoff et al., 2010; Biarnes et al., 2010; Dai et al., 2011; Pronin et al., 2004; Sakurai et al., 2010}.



Brockhoff, 2010; Dai, 2011; Sakurai,2010; Biarnes, 2010; Pronin, 2004

- | | | |
|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 1. TAS2R5 S26I ^{1.52} | 7. -R47 H174R ^{5.37} | 12. -R49 R255L ^{ez 3} |
| 2. -R43/44 S/R35 ^{iz 1} | 8. -R9 V187A ^{5.47} | 13. -R13 N259S ^{ez 3} |
| 3. -R41 P127L ^{4.41} | 9. -R46 L228M ^{6.38} | 14. -R44 P276R ^{7.50} |
| 4. -R49 H143Q ^{4.58} | 10. -R49 I 236V ^{6.46} | 15. -R47 L281W ^{7.55} |
| 5. -R49 H148N ^{4.63} | 11. -R47 L252F ^{ez 3} | |
| 6. -R16 N172K ^{ez 2} | -R49 F252S | |

Abb. 47: TAS2R-Modell der bislang identifizierten Aminosäuren der Bindungstasche

Schwarz und grau markiert sind die funktionellen Polymorphismen dieser Arbeit, die Teil der Bindungstasche sein könnten. Farbige sind bereits publizierte Aminosäuren der Bindungstasche einzelner TAS2Rs dargestellt. [Brockhoff et. al, 2010; modifiziert]

Die genannten Studien kombinierten *in silico* Strukturanalysen mit funktionellen Assays von TAS2R-Mutanten oder -Chimären. Nur Dai und Kollegen {2011} glichen die berechneten TAS2R1-Modelle mit Daten über deren Moleküldynamik ab und identifizierten fünf potentielle Aminosäuren der Bindungstasche (E90^{3.37}, K168, E182^{5.46}, Y237^{6.48}, K244^{6.55}), die scheinbar direkt mit den Agonisten wechselwirken. Für den TAS2R46 wurden die Aminosäuren E265^{7.39} und A268^{7.42} als essentiell für die Agonisteninteraktion beschrieben {Brockhoff et al., 2010}. Teil der Bindungstasche im TAS2R43 scheinen die Aminosäuren W88^{3.32} und N92G^{3.36} {Pronin et al., 2004} und im TAS2R16 E86^{3.33}, W94^{3.41}

und H181^{5.43} zu sein {Sakurai et al., 2010}. Im TAS2R38 wurden sechs Positionen entdeckt, die Teil der Bindungstasche (W99^{3.32}, M100^{3.33}, N103^{3.36}, S259^{6.51}) oder essentiell für die Rezeptoraktivierung (F255^{6.47}, V296^{7.52}) sind {Biarnes et al., 2010}. Dabei ist auffällig, dass drei Positionen (3.32, 3.33, 3.36) in der dritten Transmembrandomäne in mehreren Rezeptoren zur Bindungstasche gehören. Übereinstimmungen mit den bekannten, funktionell wichtigen Aminosäurepositionen zeigten die analysierten Polymorphismen dieser Arbeit nicht. Allerdings lagen die funktionellen Polymorphismen des TAS2R9 (Nr.8) und TAS2R16 (Nr.6), TAS2R49 (Nr.10) in direkter Nachbarschaft von Aminosäurepositionen, die in anderen Studien als Teil der Bindungstasche beschrieben wurden {Dai et al., 2011; Biarnes et al., 2010}. Die Position 252 trat in Haplotypen der beiden Rezeptoren TAS2R47 und TAS2R49 in der 3. extrazellulären Schleife auf. Die extrazellulären Schleifen der TAS2Rs sind wenig konserviert und variieren in ihrer Länge (siehe

Abb. 46). Sie enthielten mehrere funktionelle Polymorphismen, die den Zugang des Liganden zur Bindungstasche beeinflussen könnten, was funktionelle Unterschiede der TAS2R13, TAS2R16, TAS2R47 und TAS2R49 erklären würde.

Im Gegensatz zu diesem recht flexiblen Rezeptorbereich, wiesen nur die Rezeptoren TAS2R43, TAS2R44 und TAS2R38 Polymorphismen in der 1. und 2. intrazellulären Schleife auf. Alle dort lokalisierten Polymorphismen führten jedoch zu funktionellen Veränderungen der Rezeptoren. Dieser stark konservierte Rezeptorbereich ist für die Interaktion mit dem trimeren G-Protein und anderen cytosolischen Interaktionspartnern und somit für die Weiterleitung des Signals verantwortlich {Chazenbalk et al., 1990; Vaidehi et al., 2002; Kleinau et al., 2010}.

Als weiteres funktionelles Element wurde die *switch*-Region beschrieben. Sie setzt sich aus drei Aminosäuren der 3. Transmembrandomäne und einer Aminosäure der 2. intrazellulären Schleife zusammensetzen, welche eine wichtige Rolle bei der Konformationsänderung des TAS2R1 in Folge der Ligandenbindung spielen {Dai et al., 2011}. In diesem Rezeptorbereich fanden sich jedoch keine funktionellen Polymorphismen.

5.4 G-Protein-abhängige Effekte

Der TAS2R43 und TAS2R44 sind die am stärksten verwandten Bitterrezeptoren mit einer Sequenzhomologie der Aminosäuren von 89%. Sie befinden sich im Bitterrezeptorcluster auf Chromosom 12 und könnten durch Genduplikation entstanden sein {Conte et al., 2003}.

Sie haben nicht nur gemeinsame Liganden, wie Saccharin und Aristolochiasäure {Kuhn et al., 2004}, sondern weisen beide einen Polymorphismus des W35 in der 1. intrazellulären Schleife auf, das in anderen TAS2Rs stark konserviert ist. Laut Pronin et al. entwickelte sich dieser wahrscheinlich unabhängig, da im TAS2R43 das Nukleotid 104 und im TAS2R44 das Nukleotid 103 verändert ist {2007}. In dieser Arbeit ergab die funktionelle Charakterisierung dieser Rezeptoren Unterschiede zu bereits publizierten Daten, die im Folgenden genauer diskutiert werden sollen.

5.4.1 TAS2R43

Funktionelle Eigenschaften der beiden vorherrschenden TAS2R43-Varianten {Wang et al., 2004; Kim et al., 2005} wurden bereits in zwei Studien veröffentlicht, die sowohl *in-vitro*-Experimente, als auch sensorische Tests genotypisierter Probanden beinhalteten {Pronin et al., 2007; Roudnitzky et al., 2011}. TAS2R43 H1 und H2 unterscheiden sich durch zwei Polymorphismen und sind durch die Aminosäurekombination S35/R212 und W35/H212 charakterisiert. Sie wiesen in den Studien Sensitivitätsunterschiede auf, die sich tendenziell in dieser Arbeit bestätigten. Der H2 zeigte für die Agonisten Aloin und Helicin deutlich höhere Signalamplituden und eine höhere Sensitivität als der H1 (siehe Abb. 36). Pronin et al. konnte zeigen, dass die funktionsmodifizierende Position die Aminosäure 35 ist. Der in dieser Arbeit ermittelte EC_{50} -Wert des TAS2R43 H2 für Aloin von 1,4 μ M stimmte gut mit den publizierten *in-vivo*- und *in-vitro*-Daten von 1,2 μ M und 1 μ M überein {Pronin et al., 2007}. Diskrepanzen ergaben die Daten des weniger sensitiven TAS2R43 H1. Tab. 16 stellt die hier ermittelten Daten für Aloin den bereits publizierten Daten von Pronin et al. gegenüber. In Klammern ist die Nomenklatur der zitierten Veröffentlichung angegeben.

Tab. 16: Vergleich TAS2R43-Ergebnisse mit publizierten Daten

Aloin [μ M]	TAS2R43	<i>in vitro</i>		Sensorik
		EC_{50}	Amplitude	Schwellenwert
	H1 _{S35}	2,1 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	
	H2 _{W35}	1,4 \pm 0,3	1,0 \pm 0,02	
Pronin et al., 2007	H1 (SR)	13	0,14	26
	H2 (WH)	1,2	0,43	1

Der *in vitro* ermittelte EC_{50} -Wert für den TAS2R43 H1 weicht mit $2,1 \mu\text{M}$ in dieser Arbeit deutlich von $13 \mu\text{M}$ bei Pronin et al. ab. Auch die Differenz der Signalamplituden beider Haplotypen ist bei Pronin et al. mit Faktor 3 größer, als die in dieser Arbeit ermittelte Amplitudendifferenz von Faktor 1,7. Eine mögliche Ursache ist, dass die in unserem System allgemein deutlich höheren Signalamplituden eine genauere Bestimmung der Rezeptoreigenschaften zulassen. Besonders für Rezeptoren mit geringen Signalamplituden fallen Signale bei niedrigen Konzentrationen unter die Detektionsgrenze des Messsystems und verschieben so den EC_{50} -Wert fälschlich zu höheren Konzentrationen. Das könnte eine Ursache für die Differenzen des TAS2R43 H1 in beiden Messsystemen sein. Auf der anderen Seite liegt der ermittelte sensorische Schwellenwert des H1 von $26 \mu\text{M}$ deutlich höher als in den *in-vitro*-Experimenten. Es stellt sich die Frage, warum alle Systeme für den TAS2R43 H2 übereinstimmende Daten zeigen, während die Systeme für den H1 Diskrepanzen aufweisen. Eine Erklärung wäre, dass es sich um einen haplotyp-abhängigen Effekt, bedingt durch den funktionellen Polymorphismus W35S in der 1. intrazellulären Schleife, handelt. W35 ist in 21 von 25 TAS2Rs konserviert und könnte durch seine intrazelluläre Lage einen Einfluss auf die Rezeptor-G-Proteininteraktion haben. Der Austausch des unpolaren Tryptophan gegen das polare Serin im H1 vermindert die Effizienz der Signalweiterleitung, was an den kleineren Amplituden im Vergleich zum H2 deutlich wird. Pronin et al. beobachtete auch im TAS2R16, dass ein Austausch des konservierten W35 zu einem starken Verlust der Rezeptoraktivität führte {Pronin et al., 2007}. Dies spricht für eine grundlegende funktionelle Rolle dieser Aminosäure. In beiden *in-vitro*-Experimenten wurde für eine effiziente Signalweiterleitung die Proteinchimäre $G\alpha_{16}Gust44$ genutzt {Ueda et al., 2003}. In nativen Rezeptorzellen des Menschen ist die geschmacksspezifische $G\alpha$ -Untereinheit Gustducin Teil der Signalkaskade {McLaughlin et al., 1992; Adler et al., 2000; Margolskee, 2002}. Während für den TAS2R43 H2 mit W35 die erhaltenen Sensitivitäten in allen Systemen übereinstimmen, könnte sich der Austausch S35 stärker auf die Interaktion mit Gustducin im Menschen, als auf die Interaktion mit der Chimäre $G\alpha_{16}Gust44$ auswirken, so dass im heterologen Expressionssystem höhere Sensitivitäten gemessen werden, als phänotypisch zu beobachten waren. Hinweise auf Unterschiede in der Kopplungseffizienz zu den verschiedenen $G\alpha$ -Untereinheiten Gustducin und $G\alpha_{16}Gust44$ fand sich auch in anderen *in-vitro*- und *in-vivo*-Versuchen {Roudnitzky et al., 2011}. Als heterologes Zellsystem wurden HEK293T-Zellen benutzt, die, physiologischen Bedingungen ähnlicher, die geschmacksspezifische PhospholipaseC- β 2 und humanes Gustducin exprimieren. Für Saccharin, den partiellen TAS2R43-Liganden,

wurde nur bei TAS2R43-Haplotypen mit W35 ein Signal beobachtet. Auch die Haplotypencharakterisierung TAS2R44 bestätigten diese Beobachtung (siehe 5.4.2).

5.4.2 TAS2R44

Auch für die vier häufigsten TAS2R44-Varianten {Kim et al., 2005} gab es bereits veröffentlichte funktionelle und sensorische Daten, die für Saccharin in Tab. 17 zusammen mit den hier ermittelten Daten dargestellt sind {Pronin et al., 2007; Roudnitzky et al., 2011}. Sowohl die Versuche dieser Arbeit, als auch die Experimente von Pronin et al. wurden in HEK293T- bzw. HEK293-Zellen durchgeführt, die stabil die G-Proteinchimäre $G\alpha 16Gust44$ exprimierten. Die in Roudnitzky et al. 2011 veröffentlichten Versuche hingegen wurden in Zellen durchgeführt, die das humane Gustducin und die PLC β -2 exprimieren. Dieses System war somit der *in-vivo*-Situation ähnlicher. Allerdings wurden von Roudnitzky et al. keine EC₅₀-Werte berechnet, sondern Signalamplituden bei einer Konzentration von 5 mM Saccharin ermittelt. In Klammern wird die Bezeichnung des jeweiligen Haplotypen in der zitierten Publikation angegeben.

Tab. 17: Vergleich TAS2R44-Ergebnisse mit publizierten Daten

Saccharin [mM]	TAS2R44	<i>in vitro</i>		Sensorik
		EC ₅₀	Amplitude	Schwellenwert
	H1 _{R35}	1,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	
	H2 _{R35}	2,1 ± 0,1	0,5 ± 0,1	
	H3 _{W35}	1,3 ± 0	0,4 ± 0,1	
	H4 _{W35}	-	-	
Pronin et al., 2007*	H1 (RLAV*)	~ 16 §	0,14	~ 8-16
	H3 (WMVI*)	1,7	0,43	~ 2-4
Roudnitzky et al., 2011*	H1 (H4*)	Signal _{5mM}		
	H2 (H1*)	-	-	
	H3 (H2*)	+	0,13	~ 1
	H4 (H3*)	-	-	andere ~ 10

§ keine Signalsättigung

Die Haplotypen TAS2R44 H1 und H3 dieser Arbeit wurden auch von Pronin et al. charakterisiert. Vergleicht man zunächst die Ergebnisse für den H3 in beiden $G\alpha 16Gust44$ -

Systemen fällt auf, dass die ermittelten EC_{50} -Werte von 1,3 mM und 1,7 mM gut übereinstimmen und die sensorischen Daten mit einem Schwellenwert von 1-2 mM widerspiegeln. Der TAS2R44 H1 zeigte in dieser Arbeit keine funktionellen Unterschiede zum H3, während er bei Pronin et al. eine deutlich geringere Signalamplitude und mit 16 mM einen zehnfach höheren EC_{50} -Wert aufwies. Der von Pronin et al. ermittelte EC_{50} kann jedoch nur näherungsweise gelten, da keine Rezeptorsättigung erreicht wurde. Ein Unterschied der Signalamplitude beider Systeme für bestimmte Haplotypen, trat auch schon beim TAS2R43 auf (siehe 5.4.1). Er könnte durch den Vergleich von Rezeptoren mit C-terminalem HSV-Epitop in unserem System und Rezeptoren ohne C-terminale Modifikation bei Pronin et al. erklärt werden. Sowohl in HEK-Zellen mit $G\alpha_{16}Gust44$, als auch im α -Gustducin/PLC β -2-Zellsystem, zeigte sich ein Einfluss des HSV-Epitops auf die Signalhöhe des TAS2R44 H1, nicht jedoch des H3. Nur von den TAS2R44-Varianten deren W35 mutiert ist, wird die Signalhöhe durch die C-terminale Modifikation beeinflusst. Bei den Rezeptoren mit HSV-Epitop, kann die beeinträchtigte Interaktion mit dem G-Protein, durch die C-terminale Modifikation scheinbar verbessert werden. Abb. 48 stellt Signale des TAS2R44 H1 und H3 mit und ohne HSV-Epitop in den zwei Zellsystemen dar. Nur für den H1 mit S35 führte das Epitop zu höheren Signalamplituden und ermöglicht eine genauere Bestimmung der Rezeptorsensitivität.

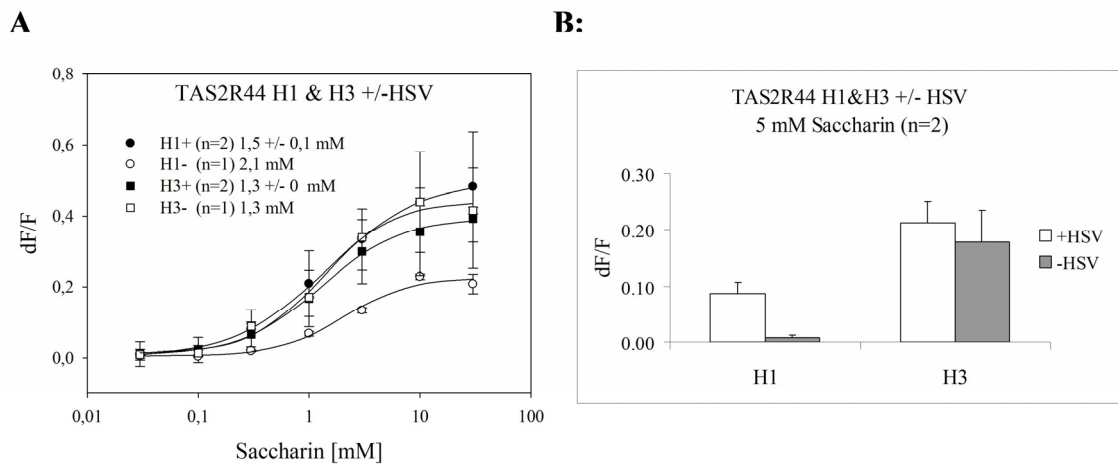


Abb. 48: Vergleich des TAS2R44 H1 und H3 mit und ohne C-terminales HSV-Epitop

A: Dosis-Wirkungskurven von TAS2R44 H1 und H3 mit (+) und ohne (-) HSV-Epitop in HEK293 $G\alpha_{16}Gust44$ -Zellen; B: Signalamplituden der entsprechenden Konstrukte in HEK293 $PLC\beta$ -2/ $Gustducin$ -Zellen

Der Einfluss des HSV-Epitops auf die Kopplungseffizienz zwischen Rezeptor und G-Protein bleibt jedoch zu beweisen.

In dieser Arbeit wurden vier TAS2R44-Haplotypen analysiert, von denen alle bei Roudnitzky et al. {2011} und zwei bei Pronin et al. {2007} analysiert wurden. Während Pronin et al. Rezeptorsignale für den TAS2R44 H1 und H3 beobachten konnte und auch in dieser Arbeit H1-3 gut aktivierbar waren, zeigte im PLC-System nur der H3 Signale {Roudnitzky et al., 2011}. Der H3 und H4 sind die TAS2R44-Variante mit Tryptophan an Position 35. Die Inaktivität des H4 bei Roudnitzky et al., trotz des W35, konnte auf zusätzliche Mutationen des H4 an der Position 217 und 276 zurückgeführt werden. Auch bei Roudnitzky et al. wurden Rezeptoren ohne HSV-Epitop benutzt. Auffällig ist, dass diese *in-vitro*-Daten des Gustducin/PLC-Systems am besten die Sensorik widerspiegeln, mit der sie das G-Protein α -Gustducin gemeinsam haben. In diesem System zeigte ohne HSV-Epitop nur der H3_{W35} ein Signal, während das Anfügen eines HSV-Epitops zu einem Signal des vorher inaktiven H1_{R35} führte (siehe Abb. 48). Wurde im TAS2R44 H1 ohne HSV das R35 durch Tryptophan ausgetauscht, konnten zum H3_{W35} vergleichbare Signale gemessen werden {Roudnitzky et al., 2011}. Demnach sorgt schon das HSV-Epitop für eine verbesserte Signalweiterleitung des vorher inaktiven H1 zum Gustducin. Aber auch ohne dieses, führte im H1 Tryptophan an Position 35 zu vergleichbaren Signalen mit dem H3_{W35}. Für den ebenfalls nur im G α 16Gust44-System aktiven H2_{R35} wurden diese Modifikationen im Gustducin/PLC-System bislang nicht durchgeführt, aber ähnliche Effekte vermutet. Wie schon für den TAS2R43 H1_{S35}, wurden in dieser Arbeit für den TAS2R44 H1_{R35} und H2_{R35} deutlich höhere Sensitivitäten gemessen, als phänotypisch oder im PLC-System beobachtet wurden. Somit sorgen die verschiedenen G α -Untereinheiten für Haplotyp-spezifische Unterschiede und unmodifizierte Haplotypen ohne W35 koppeln im *in-vitro*-System schlechter mit der G α -Untereinheit Gustducin, als mit der Chimäre G α 16Gust44. Die Aminosäuren an Position 35 und 36 sind bei fast allen TAS2Rs unpolar. Neben der letzten Aminosäure der 1. intrazellulären Schleife sind es die einzigen unpolaren Positionen in diesem Bereich der TAS2Rs (siehe Tab. 18). Dies könnte ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung dieser Aminosäuren an der G-Proteininteraktion, entweder indirekt durch eine bestimmte Konformation dieses Bereiches oder durch hydrophobe Wechselwirkungen mit dem G-Protein, sein.

Tab. 18: Vergleich Aminosäuren der 1. intrazellulären Schleife der TAS2Rs

Aminosäure	34	35	36	37	38	39	40	41
TAS2R43 H1	E	S	F	K	R	Q	K	I
TAS2R44 H1-2	E	R	V	K	R	Q	K	I
Konsensus	E	W	V	K	R	Q	K	I
(Zahl TAS2Rs)	12	21	13	17	10	8	14	13
polar	24	1	-	24	21	23	22	-
unpolar	1	24	25	1	3	2	3	25

In der Literatur finden sich vermehrt Hinweise darauf, dass besonders die, in allen GPCRs kurze, 1. intrazelluläre Schleife an der Rezeptor-G-Proteininteraktion beteiligt ist {Chazenbalk et al., 1990; Kleinau et al., 2010}. In einem Homologiemodel verschiedener GPCR-Sequenzen, angepasst an die Tertiärstruktur des Rhodopsins, konnte die Aminosäure H65 identifiziert werden, die der Aminosäureposition W35 in den TAS2Rs entspricht. Diese Aminosäure scheint eine wichtige Rolle in der Kopplung zum G-Protein zu spielen {Muramatsu und Suwa, 2006}. Auch die inhibitorische Wirkung von Probenicid auf die Aktivierung von TAS2R16, TAS2R38 und TAS2R43, konnte auf die intrazelluläre Bindung des Inhibitors an den Rezeptor, unter Beteiligung der 1. intrazellulären Schleife, gezeigt werden. Die Autoren vermuten, dass die Probenicidbindung die Kopplung zum G-Protein inhibiert {Greene et al., 2011}.

Ein weiteres Beispiel für G-Protein-abhängige Sensitivität findet sich für den Polymorphismus V296I im TAS2R38. Während diese Position im heterologen Expressionssystem mit der G-Proteinchimäre G α 16Gust44 keinen Einfluss auf die Rezeptorsensitivität hatte {Bufe et al., 2005}, ergaben sensorische Experimente Sensitivitätsunterschiede zwischen beiden Aminosäuren {Mennella et al., 2010}. Als Ursache für diesen Unterschied wird die Beteiligung der Aminosäure an der intrazellulären Signalweiterleitung, zum Beispiel der G-Proteininteraktion im nativen System, jedoch nicht mit der Chimäre vermutet {Mennella et al., 2010}.

5.5 Funktionelle Redundanz des TAS2R46 und TAS2R47

Innerhalb unserer Arbeitsgruppe stand der Rezeptor TAS2R46 durch sein großes und heterogenes Agonistenspektrum, darunter viele nahrungsrelevante Bitterstoffe, im Fokus. Einige dieser Bitterstoffe wurden bereits *in vitro* im Rahmen der Dissertation von A. Brockhoff analysiert {Brockhoff et al., 2007; Meyerhof et al., 2010}. Weiterführend wurden sensorische Studien in einer Probandengruppe von ca. 60 Kaukasiern durchgeführt (unveröffentlicht), deren Genotypisierung und funktionelle Analyse der auftretenden Haplotypen einen Teil dieser Arbeit darstellt. In die Studie einbezogen wurde der nah verwandte TAS2R47, der eine Übereinstimmung von 82% der Aminosäuren mit dem TAS2R46 aufweist und ebenfalls durch viele TAS2R46-Liganden aktiviert wird. Ziel war die Identifizierung und funktionelle Analyse aller auftretenden TAS2R46 und TAS2R47-Haplotypen. Die drei TAS2R46- und vier TAS2R47-Haplotypen wurden kloniert und durch den Einsatz von sechs TAS2R46-Agonisten funktionell charakterisiert. Tab. 14 stellt die Ergebnisse der Calcium-Imaging-Experimente dar. Die sieben Haplotypen zeigten unterschiedliche Rezeptorantworten, sodass es sich bei allen um funktionelle Varianten handelte.

Die TAS2R47-Varianten, mit Ausnahme des H2, reagierten deutlich sensitiver auf die eingesetzten Agonisten, als die funktionellen TAS2R46-Varianten. Damit erwies es sich als sinnvoll, bei phänotypischen Untersuchungen von bekannten TAS2R46-Agonisten, auch den Genotyp des TAS2R47 in die Analysen mit einzubeziehen. Diese Rezeptoren liegen in einem Cluster aus fünf Bitterrezeptoren mit großen Sequenzhomologien auf dem Chromosom 12, das durch Duplikation eines Urgens entstanden sein könnte {Bufe et al., 2002; Conte et al., 2003}. Die Analyse der resultierenden *Long-Range*-Haplotypen, die als Einheit vererbt werden, zeigte stets eine Kombination der sensitiveren Variante des TAS2R47 H1 mit dem inaktiven TAS2R46 H3 oder dem weniger aktiven TAS2R46 H2 {Roudnitzky et al., 2011}. So könnte die fehlende Funktionalität bzw. Sensitivität des TAS2R46 für einige Liganden durch den TAS2R47 ausgeglichen werden.

Abschließend zeigten die individuellen Rezeptorantworten der sieben identifizierten TAS2R46- und TAS2R47-Haplotypen eine große funktionelle Variabilität. Alle getesteten Liganden konnten Haplotypen beider Bitterrezeptoren aktivieren. Beide Rezeptoren spielen demnach bei der Bitterwahrnehmung dieser Stoffe eine Rolle. Zu welchen Phänotypen die aufgetretenen Rezeptorvarianten führen, werden unsere sensorischen Studien zeigen.

5.6 TAS2R38-Haplotypenanalyse zur Aufklärung der Evolution von TAS2Rs

Der Bitterrezeptor TAS2R38 ist ein klassischer Gegenstand der Evolutionsforschung. An ihm wurde die Veränderung des Bittergeschmacks im Laufe der Primatenevolution untersucht {Wooding, 2011}. Schon in den 30iger Jahren berichtete Fisher et al., dass Menschen und Schimpansen den gleichen Phänotyp für den Bittergeschmack von Phenylthiocarbamid (PTC) zeigen {1939}. So gibt es „Schmecker“ und „Nichtschmecker“ des Bittergeschmacks von PTC. Jüngere Forschung konnte als molekulare Grundlage verschiedene Allele des TAS2R38 identifizieren {Drayna et al., 2003; Kim et al., 2003}. Der Mensch besitzt zwei vorherrschende TAS2R38-Haplotypen, die sich in 3 Aminosäurepositionen unterscheiden {Bufe et al., 2005}. Der aktivierbare PAV-Haplotyp wird dem „Schmecker“-Phänotyp zugeordnet und der nicht-aktivierbare AVI-Haplotyp dem „Nichtschmecker“. Außerdem gibt es die seltene und weniger sensitive Variante AAI. Diese Haplotypen wurden bereits hinreichend in der Literatur beschrieben {Drayna et al., 2003; Kim et al., 2003; Bufo et al., 2005}. Fisher nahm an, dass die beobachteten PTC-Phänotypen beim Menschen und Schimpansen auf denselben genetischen Polymorphismen beruhen, die im Laufe der Evolution durch balancierende Selektion erhalten blieben. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass beim Schimpansen zwei eigene TAS2R38-Allele für den PTC-Phänotyp verantwortlich sind {Wooding et al., 2006}. Im Laufe der Evolution bildete sich demnach das „Nichtschmecker“-Allel des TAS2R38 zweimal unabhängig voneinander und blieb durch balancierende Selektion in beiden Spezies erhalten {Fisher et al., 1939; Wooding et al., 2004; Wooding et al., 2006}. Dies deutet auf die evolutionäre Wichtigkeit dieser nicht-funktionellen TAS2R38-Variante hin, deren physiologische Rolle bislang unbekannt ist. Aber eine evolutionär unabhängige, zweite Bildung einer inaktiven TAS2R38-Variante im Menschen, würde deren physiologische Bedeutung weiter bestätigen. In dieser Arbeit wurden zehn neue TAS2R38-Haplotypen funktionell charakterisiert, die in verschiedenen afrikanischen Probanden von S. Wooding (Universität Texas, USA) identifiziert wurden. Die neuen Polymorphismen befanden sich auf einem der drei bekannten TAS2R38-Haplotypen PAV, AVI oder AAI (siehe 4.4.2). Von Interesse war, ob sie die Funktion der bekannten Haplotypen verändern oder sogar umkehren.

Die neuen Polymorphismen führten weder zu einem aktivierbaren AVI-Haplotypen, noch zu einem nicht-aktivierbaren PAV-Haplotypen (siehe Tab. 15). Unter den zehn Polymorphismen gab es vier, die einen funktionsmodulierenden Einfluss hatten (Abb. 43). Sie führten zu nicht-aktivierbaren AAI-Varianten, deren Ursache auch in einer

Verminderung der ohnehin kleinen Signale liegen könnte oder veränderten die Sensitivitäten zweier PAV-Varianten. Interessanterweise lagen zwei dieser vier Polymorphismen in der 1. und 2. intrazellulären Schleife und bestätigten die funktionelle Bedeutung dieser konservierten Rezeptorregion für die Signalweiterleitung in der Rezeptorzelle.

5.7 Deorphanisierung des TAS2R41

In dieser Arbeit konnte erstmals eine Aktivierung des TAS2R41 und damit seine Funktionalität gezeigt werden. Die beiden vorherrschenden Varianten, die durch das Antibiotikum Chloramphenicol aktiviert wurden, reagierten mit unterschiedlicher Sensitivität und Signalintensität (Abb. 13).

Da alle afrikanischen Probanden dieser Studie, sowie bei Kim et al., bis auf eine Ausnahme, homozygot für die sensitivere Variante TAS2R41 H1 waren {2005} stellt sich die Frage, ob funktionelle Gründe für diese Homogenität verantwortlich sind. Die Identifizierung von natürlichen TAS2R41-Liganden könnte Hinweise liefern. Von den über hundert getesteten natürlichen und synthetischen Bitterstoffen führte nur Chloramphenicol zu einer Rezeptoraktivierung. Auch unter den eingesetzten Strukturanaloga des Chloramphenicols (Abb. 17) fanden sich keine weiteren, potenten Liganden (Abb. 18). Wie die zuletzt deorphanisierten Bitterrezeptoren TAS2R9 {Dotson et al., 2008} und TAS2R50 {Behrens et al., 2009}, scheint der TAS2R41 somit ebenfalls zu den Spezialisten unter den TAS2Rs mit einem kleinen Agonistenspektrum zu gehören. Chloramphenicol und der schwache Agonist p-Nitrozimtsäure sind Vertreter der Phenylpropanoide, einer großen und heterogenen Gruppe pflanzlicher und mikrobieller Sekundärstoffe. Ein natürlicher TAS2R41-Ligand kann in dieser durchaus nahrungsrelevanten Stoffklasse vermutet werden, dessen strukturelles Merkmal wahrscheinlich ein Phenylpropanoidgrundgerüst mit einer Nitrogruppe am Phenylring ist.

5.8 orphane TAS2Rs

Für 20 der 25 humanen Bitterrezeptoren konnten, durch den Einsatz von zahlreichen Bitterstoffen in verschiedenen Studien, Liganden identifiziert werden {Übersicht in Meyerhof et al., 2010}. Von den verbleibenden orphanen Bitterrezeptoren gelang in dieser Arbeit die Deorphanisierung des TAS2R41, sodass der TAS2R42, TAS2R45, TAS2R48 und TAS2R60 weiterhin orphan sind. Die Vermutung, dass bisher mit nicht-funktionellen

Allelen dieser eigentlich funktionellen TAS2Rs gearbeitet wurde, bestätigte sich in dieser Arbeit nicht. Von allen vier Rezeptoren wurden die häufigsten Haplotypen analysiert, die sowohl in unserer Probandengruppe, als auch bei Kim et al. auftraten {2005}. Um optimale Rezeptorsignale zu erhalten, wurden die Haplotypen, mit Ausnahme der TAS2R42-Varianten, in den peak10-Expressionsvektor kloniert (siehe Tab. 2). Dieser führte zu höheren Signalamplituden als der pcDNA5-Vektor, wie am Bsp. des Rezeptors TAS2R41 (siehe Abb. 14) zu beobachten war. Trotz verschiedener Versuche der Optimierung, stellte sich die TAS2R42-Genotypisierung bei einigen Probanden wegen eines hohen Hintergrundrauschens in den Sequenzchromatogrammen als schwierig heraus. Auch Kim et al. konnte für nur 88 der 110 Allele Sequenzdaten darstellen. Des Weiteren war auffällig, dass von den 38 hier untersuchten Probanden nur fünf heterozygot für den TAS2R42 waren. Eine so große Homogenität ließe sich durch ein häufiges TAS2R42-Nullallel erklären. Der Rezeptor konnte jedoch in allen Probanden amplifiziert werden, sodass es keinen homozygoten Träger eines Nullalleles und damit keinen Hinweis auf ein solches gab. Die Ursachen für die Schwierigkeiten bei der TAS2R42-Genotypisierung bleiben zu untersuchen. Unterschiede der identifizierten SNPs oder einzelner Haplotypenfrequenzen zwischen dieser Arbeit und der Arbeit von Kim et al., lagen an abweichenden Probandenzahlen und unterschiedlichen Anteilen der einzelnen ethnischen Gruppen {Kim et al., 2005}.

Insgesamt wurden elf Haplotypen der orphanen Rezeptoren in Calcium-Imaging-Experimenten mit über 100 Bittersubstanzen untersucht, ohne eine funktionelle Variante zu identifizieren. Da es unwahrscheinlich ist, dass nur sehr seltene Varianten mit Allelfrequenzen unter 5% funktionell sind, scheint es andere Ursachen für die fehlende Aktivierung dieser TAS2Rs zu geben. Zum einen könnte es sich, wie bei den zuletzt deorphanisierten Rezeptoren TAS2R9 {Dotson et al., 2008}, TAS2R50 {Behrens et al., 2009} und TAS2R41 in dieser Arbeit, um spezialisierte Bitterrezeptoren handeln, deren Liganden in den bisherigen Experimenten nicht enthalten waren. Zum anderen könnte eine nicht-funktionelle Expression dieser Rezeptoren in den verwendeten *in-vitro*-Systemen ursächlich sein, zum Beispiel aufgrund fehlender Cofaktoren, fehlender Komponenten der nativen Signalkaskade oder gemessener Aktivitätsparameter. Zum Beispiel wird über funktionelle TAS2R-Heterodimere diskutiert, da Subpopulationen der TAS2Rs in nativen Geschmackszellen coexprimiert werden {Behrens et al., 2007}. Die TAS2R-Dimerisierung bestätigte sich, jedoch ohne funktionelle Konsequenzen {Kuhn et al., 2010}. Die Tatsache, dass Geschmackszellen heterogene Populationen von TAS2Rs coexprimieren wurde mit einer möglichen Konkurrenz der verschiedenen TAS2Rs um zelluläre

Komponenten erklärt. Bei Cotransfektion im heterogenen System blieben die EC_{50} -Werte stabil, während sich die Signalamplituden je nach Menge der cotransfizierten Rezeptoren verringerten {Behrens et al., 2007}. Obwohl eine Reduktion der Plasmidmenge um den Faktor 10 keinen Einfluss auf die Signale des einzeln transfizierten TAS2R38 hatte (siehe Abb. 11), könnte die Cotransfektion der orphanen Haplotypen je TAS2R in schwächeren Signalen resultieren, die möglicherweise übersehen wurden. Für den TAS2R41 zeigten sich keine Unterschiede der Signalamplitude zwischen Cotransfektion und einzeln transfizierten Rezeptoren. Für die anderen orphanen TAS2Rs können solche Effekte nicht ausgeschlossen werden, wenn auch die geringen Unterschiede in der Aminosäuresequenz der Haplotypen eines Rezeptors, kompetitive Effekte unwahrscheinlicher machen.

Aufgrund der gustatorischen Expression aller orphanen TAS2Rs ist letztendlich die Annahme, dass es sich um inaktive Rezeptoren oder um Rezeptoren mit ausschließlicher Funktion in nicht-gustatorischen Geweben handelt, in denen ihre Expression ebenfalls beschrieben wurde {Dotson et al., 2008; Rozengurt et al., 2006; Kaji et al., 2009}, unwahrscheinlich.

Auf der Ligandenseite gibt es Bitterstoffe, deren zugehörige Rezeptoren bislang unbekannt sind. Sie wurden bereits auf den jeweils häufigsten Haplotypen aller 25 TAS2Rs erfolglos getestet. Eine Vermutung war nun, dass der zugehörige TAS2R einer der verschiedenen Haplotypen der orphanen Rezeptoren sei {Meyerhof et al., 2010}. Auf 15 Substanzen dieser Studie und weitere 15 Bitterstoffe ohne zugehörigen Rezeptor wurden die Haplotypen der orphanen TAS2Rs in dieser Arbeit getestet. Für keinen dieser Bitterstoffe fand sich ein zugehöriger Rezeptor unter den orphanen TAS2Rs. Das kann zum einen bedeuten, dass es weitere, bislang unbekannte Bitterrezeptoren gibt, dass Haplotypen der deorphanisierten TAS2Rs für die Detektion verantwortlich sind oder dass diese Substanzen nicht im genutzten Meßsystem analysiert werden können aufgrund ihrer geringen Löslichkeit, Eigenfluoreszenz oder Aktivierung endogener Rezeptoren.

Auf der Rezeptorseite wäre es für die weitere Deorphanisierung sinnvoll, Zellsysteme mit verschiedenen G-Proteinuntereinheiten und möglichst nativen gustatorischen Signalkaskadenkomponenten zu entwickeln. Es ist bekannt, dass GPCRs mit unterschiedlicher Effizienz an verschiedene G-Proteine koppeln und diese dann spezifische Effektorsysteme aktivieren {Sainz et al., 2007}. Für olfaktorische Rezeptoren zeigte sich sogar ein Einfluss verschiedener G-Proteine auf das Agonistenspektrum {Shirokova et al., 2005}. Auch die Messung anderer Aktivierungsparameter wie die intrazelluläre cAMP-Konzentration {Yan et al., 2001; Chaudhari und Roper, 2010; Clapp et al., 2008} oder

GTP-Bindung an das G-Protein sind bewährte Alternativen zum Calcium-Imaging {Pronin et al., 2004; Sainz et al., 2007}.

Wie Dotson et al. für den TAS2R9 zeigen konnte {2008}, ist eine Möglichkeit der Identifizierung phänotyp-bestimmender TAS2Rs, die Kombination von phänotypischen Analysen genotypisierter Probanden, mit Funktionalitätsstudien der Allele in heterologen Expressionssystemen {Dotson et al., 2008}. Die eindeutige Zuordnung zum funktionsdeterminierenden Allel wird jedoch erschwert, wenn der identifizierte Bitterrezeptor zum TAS2R-Cluster auf Chromosom 12 zählt und als Haplotypblock zusammen mit weiteren detektierenden Bitterrezeptoren {Roudnitzky et al., 2011} oder anderen Genen vererbt wird, wie es für die Assoziation des TAS2R48 (alternative Bezeichnung TAS2R19) mit Chinin auftrat {Reed et al., 2010}. In sensorischen Studien konnte gezeigt werden, dass Grapefruitsaft bzw. der natürliche Bitterstoff Chinin für homozygote Individuen mit einem TAS2R48-Allel das Cystein299 enthält, stärker bitter schmeckt und sie diesen weniger mochten, als homozygote Individuen mit Arginin299 {Reed et al., 2010; Hayes et al., 2011}. Die drei analysierten TAS2R48-Haplotypen dieser Arbeit, von denen H2 dem sensitiveren C299-Allel entsprach {Reed et al., 2010}, zeigten in dieser Arbeit keine Aktivierung durch 30 μ M Chinin-HCl. Auch 300 μ M Limonin und 30 μ M Naringin, weitere wichtige Bitterstoffe der Grapefruit, führten zu keiner Rezeptorantwort der TAS2R48-Haplotypen. Für diese widersprüchlichen Beobachtungen könnte es verschiedene Gründe geben. Das Bitterrezeptorcluster auf Chromosom 12 besteht aus acht TAS2Rs von denen, neben dem TAS2R48, drei weitere auf Chinin reagieren {Meyerhof et al., 2010}. Dieses Cluster zeigt ein hohes Maß an *linkage disequilibrium* was die Identifizierung von einzelnen Allelen, die den beobachteten Phänotyp verursachen, erschwert {Roudnitzky et al., 2011}. Ein weiterer Grund für die fehlende TAS2R48-Aktivierung in dieser Arbeit könnten zu niedrige Chininkonzentrationen von max. 30 μ M sein. Aufgrund von Artefakten im funktionellen Assay wurde die Konzentration der sensorischen Studien von 180 μ M Chinin {Reed et al., 2010} nicht erreicht. Zusätzlich zum TAS2R48 wurde in diesen sensorischen Studien eine nicht-signifikante Assoziation zwischen dem sSNP T930C im TAS2R60 und der Bittersensitivität gegenüber Grapefruitsaft beobachtet {Hayes et al., 2011}. TAS2R60 ist der orphan Bitterrezeptor mit der größten genetischen Homogenität. Es gab, sowohl in unserer Probandengruppe, als auch bei Kim et al. nur einen weltweit dominierenden Haplotypen der 95% bzw. 96% aller sequenzierten Allele repräsentierte {2005}. Obwohl die Genotypisierung des TAS2R60 dieser Arbeit zwei seltene nsSNPs zeigte, betrifft die beobachtete Assoziation {Hayes et al., 2011} das häufige und synonyme SNP T930C {Kim et al., 2005}. Trotz der fehlenden

Signifikanz und drei weiteren Chinin-sensitiven Bitterrezeptoren auf dem Chromosom 7 {Meyerhof et al., 2010}, wirft diese Assoziation die Frage nach dem Einfluss synonymer Polymorphismen auf die Funktionalität der Bitterrezeptoren auf. Resultierende Veränderungen der Expression, sowie Konformation und Funktion wurden bereits für andere Proteine beschrieben {Kimchi-Sarfaty et al., 2007; Edwards et al., 2012}.

Außerdem bleibt zu untersuchen, ob die geringe genetische Diversität des TAS2R60 ein Hinweis auf seine essentielle Funktion ist oder ob dies auf Kopplung an ein essentielles Allel in umgebenden DNA-Bereichen, auch *selective sweep* genannt {Amos und Harwood, 1998}, beruht.

5.9 Korrelation zu phänotypischen Daten

Nach der funktionellen Analyse der TAS2R-Haplotypen *in vitro* stellt sich nun die Frage nach den zugehörigen Phänotypen. Für die meisten Bitterrezeptoren ist ihr jeweiliger Einfluss auf die Bitterwahrnehmung, aufgrund fehlender sensorischer Daten, unbekannt. Die hier beobachteten funktionellen Unterschiede der TAS2R-Varianten geben Hinweise auf mögliche Unterschiede der Geschmackswahrnehmung und liefern deren molekulare Grundlage. Für die bislang analysierten TAS2Rs zeigten die sensorischen- und *in-vitro*-Daten gute Übereinstimmung {Soranzo et al., 2005; Bufe et al., 2005; Pronin et al., 2007}. So konnte für den TAS2R16 H1 und Arbutin ein EC_{50} von 5,8 mM *in vitro* und 5,4 mM *in vivo* ermittelt werden {Bufe et al., 2002}. Für den TAS2R16 H3 wurde *in vitro* ein EC_{50} von 10,8 mM ermittelt {Soranzo et al., 2005}. Die *in-vitro*-Daten stimmen mit den hier ermittelten EC_{50} -Werten von 3,5 mM für den TAS2R16 H1/H2 und 7,5 mM für den H3 gut überein. Leider liegen bislang keine sensorischen Daten für das weniger sensitive Allel TAS2R16 H3 vor, sodass die phänotypischen Konsequenzen eines *in vitro* zweifach weniger sensitiven Allels unklar bleiben. Auch für den TAS2R38 PAV stimmen funktionelle und sensorische Daten gut überein. Für PTC ergab sich *in vitro* ein EC_{50} von 1,1 μ M (hier 2,3 μ M) und sensorisch eine Konzentration von 2,4 μ M, die homozygote Individuen von Wasser unterscheiden konnten. Während der TAS2R38 AVI *in vitro* keine Aktivität zeigte, empfanden homozygote Individuen erst eine PTC-Lösung von 1 mM als bitter {Bufe et al., 2005}. Die Analyse der Rezeptoren TAS2R43 und TAS2R44 in dieser Arbeit wies jedoch Widersprüche zu publizierten sensorischen Daten {Pronin et al., 2007; Roudnitzky et al., 2011} und damit auch Grenzen des *in-vitro*-Systems auf.

Polymorphismen, die Einfluss auf die Ligandeninteraktion haben und zu abweichenden Sensitivitäten in Form veränderter EC_{50} -Werte führten, konnten zuverlässig identifiziert werden. Welche phänotypische Relevanz beobachtete Polymorphismen haben, die hauptsächlich die Signalthöhe der Rezeptorantwort verändern, ist bislang unklar. Da sich die α -Untereinheit des G-Proteins *in vivo* und *in vitro* unterscheidet (siehe 1.5), könnten Polymorphismen der intrazellulären Schleifen unterschiedliche Auswirkungen auf die Aktivierung der Signalkaskade in den Systemen haben, wie beim TAS2R43 und TAS2R44 beobachtet (siehe 5.4). Auch Polymorphismen, die die Glykosylierungsstelle der TAS2Rs betreffen und damit die Translokation *in vivo* beeinflussen {Reichling et al., 2008}, haben *in vitro*, durch das angefügte Signalpeptid, keine Auswirkung. Mutationen von Rezeptorbereichen, die für die Interaktion mit anderen Cofaktoren *in vivo* wichtig sind {Behrens et al., 2006}, könnten im heterologen System unauffällig sein. Auch Polymorphismen der TAS2R-Promotoren oder der untranslatierten mRNA-Bereiche wie beim TAS2R5 gezeigt {Calvo et al., 2009}, die *in vivo* mögliche Auswirkungen auf die Transkription und Translation haben, konnten in dieser Arbeit nicht analysiert werden. Andere Faktoren, wie mögliche funktionelle TAS2R-Dimere {Kuhn et al., 2010} der *in vivo* zum Teil coexprimierten Bitterrezeptoren {Behrens et al., 2007} oder Veränderungen der Bitterstoffe im Speichel {Intelmann et al., 2009}, können *in vitro* nicht nachvollzogen werden. Außerdem führt die Aktivierung der TAS2Rs in den Rezeptorzellen zur Aktivierung zweier Signalwege, zum einen über einen Calciumanstieg und zum anderen über ein Absinken des cyclischen Nukleotidspiegels {Yan et al., 2001; Chaudhari und Roper, 2010; Clapp et al., 2008}. Letzterer wurde in diesem heterologen System nicht gemessen. Seine Bedeutung für den Bittergeschmack bleibt zu untersuchen.

5.10 Phänotypische Bedeutung der funktionellen Haplotypen

Extrapoliert man die Ergebnisse der zwei eingesetzten Bitterstoffe auf alle bekannten Liganden des jeweiligen Rezeptors, so sind für TAS2Rs mit funktionell-homogenen Haplotypen (TAS2R1, TAS2R4, TAS2R8, TAS2R10, TAS2R40, TAS2R50) bzw. für TAS2Rs mit nur einem häufigen Haplotypen (TAS2R3, TAS2R14, TAS2R39, TAS2R60) keine sensorischen Unterschiede für die überwiegende Mehrheit der analysierten ethnischen Gruppen zu erwarten. Die genetische oder funktionelle Homogenität dieser neun TAS2Rs

könnte auf eine essentielle Funktion hinweisen, wie die Detektion spezifischer Agonisten mit pharmakologischer Wirkung. Tab. 19 stellt die Anzahl von bekannten Agonisten der genannten Rezeptoren (R) dar, die diese entweder ausschließlich oder am sensitivsten im heterologen System detektieren {Übersicht: Meyerhof et al., 2010}.

Tab. 19: Anzahl Agonisten, die ausschließlich oder am sensitivsten von funktionell homologen TAS2Rs detektiert werden {Meyerhof et al., 2010}

TAS2R	1	3	4	8	10	14	39	40	50
einzigster R.	1	-	-	-	3	7	1	-	-
sensitivster R.	-	1	1	-	1	2	-	1	-

Für vier der neun homogenen TAS2Rs finden sich spezifische Agonisten wie Dextromethorphan, dessen psychoaktive Eigenschaft diskutiert wird, für den TAS2R1; Cucurbitacin E, ein pharmakologisch wirksamer Bitterstoff aus dem Kürbis und Cycloheximid, ein Antibiotikum, das die eukaryotische Proteinsynthese hemmt, für den TAS2R10; Acetaminophen bzw. Paracetamol für den TAS2R39. Der TAS2R14 weist besonders viele spezifische Agonisten auf wie z.Bsp. Campher, das in höheren Dosen toxisch und psychoaktiv wirkt oder das neurotoxische α -Thujon. Sowohl der TAS2R10, als auch der TAS2R14 besitzen, neben dem TAS2R46, ein sehr breites, teilweise überlappendes Ligandenspektrum {Meyerhof et al., 2011}. Ihre funktionelle Homogenität könnte die Detektion eines Großteils der Bitterstoffe, gerade im Hinblick auf den inaktiven, häufig auftretenden TAS2R46 H3 (siehe Tab. 12), sichern. Weitere drei TAS2Rs (TAS2R3, TAS2R4, TAS2R40) zeigen die größte Sensitivität gegenüber dem Malariamedikament Chloroquin, das in höheren Dosen toxisch ist, dem Antibiotikum Dapson oder dem mutagenen Colchicin. Lediglich für die Rezeptoren TAS2R8 und TAS2R50 sind weder spezifische Liganden bekannt, noch sind sie besonders sensitiv. Ihre Homogenität lässt bisher auf keine essentielle Funktion für den Menschen schließen, was auch durch die geringe Anzahl bekannter Agonisten, drei bzw. zwei, bedingt sein könnte.

Während die Funktionalität der homogenen Bitterrezeptoren vielleicht allen ethnischen Gruppen in ihrem jeweiligen Umfeld einen evolutionären Vorteil brachte, ist die Heterogenität der folgenden zwölf TAS2Rs schwieriger zu erklären.

Tab. 20: Anzahl Agonisten, die ausschließlich oder am sensitivsten von funktionell heterogenen TAS2Rs detektiert werden {Meyerhof et al., 2010}

TAS2R	5	7	9	13	16	38	41	43	44	46	47	49
einzigster R.	1	-	3	-	3	13	-	-	-	4	-	-
sensitivster R.	-	-	-	-	1	1	-	2	3	4	3	1

Für die fünf Rezeptoren TAS2R5, TAS2R16, TAS2R9, TAS2R38 und TAS2R46 gibt es spezifische Liganden. Gleichzeitig traten für die letzten drei Rezeptoren inaktive Varianten auf, die mit 58% für den TAS2R9 H1, 38% für den TAS2R38 AVI und 25% für den TAS2R46 H3 häufig in allen analysierten ethnischen Gruppen vorkamen {Kim et al., 2005; Wooding et al., 2004} und somit Geschmacksunterschied hervorrufen müssten. Auch beim TAS2R7 trat eine inaktive, verkürzte Variante auf, die jedoch ausschließlich in den nordamerikanischen Probanden vorkam {Kim et al., 2005}. Aufgrund fehlender spezifischer und potenter Agonisten, ist der resultierende TAS2R7-Phänotyp unklar. Während für den TAS2R9 bislang nahrungsrelevante Agonisten fehlen {Dotson et al., 2008}, gibt es zahlreiche natürliche Aktivator für den TAS2R38 und TAS2R46. Der TAS2R38 detektiert hauptsächlich Glucosinolate {Bufe et al., 2005}, die in zahlreichen Pflanzen vorkommen, wie z.Bsp. Meerrettich, Senf, Brokkoli und verschiedenen Kohlarten. Der TAS2R38-Haplotyp ist für die Unterschiede des Bittergeschmacks dieser Nahrungsmittel im Menschen verantwortlich {Sandell und Breslin, 2006}. Der TAS2R46 detektiert eine große Anzahl medizinisch relevanter Sesquiterpenlaktone, die häufige Pflanzenmetabolite sind {Brockhoff et al., 2007}. Somit müsste eine nicht-funktionelle TAS2R46-Variante auch den Bittergeschmack spezifischer Liganden wie Cnicin, Crispolid, Hydrocortison oder Orphenadrin deutlich beeinflussen, während für Agonisten wie Grossheimin, Parthenolid oder Strychnin, der nächstempfindliche TAS2R bei höheren Konzentrationen „einspringen“ würde. Der TAS2R46 besitzt ein großes Ligandenspektrum, das viele Überschneidungen mit anderen TAS2Rs, wie z.Bsp. dem TAS2R47 H1, aufweist (siehe Tab. 14). Auffällig ist, dass der inaktive TAS2R46-Haplotyp immer mit der reaktiveren der beiden häufigen TAS2R47-Varianten in einem Haplotypblock auftritt und so mögliche phänotypische Auswirkungen zum Teil ausgeglichen werden bzw. nur leichte Verschiebungen zu höheren Konzentrationen stattfinden. Inwieweit Haplotypen, die aktiv sind und sich *in vitro* nur in ihrer Sensitivität unterscheiden, auch phänotypisch unterschiedlich sind, ist bislang nur für den TAS2R38 untersucht worden. Sensorische Tests von je einem homozygoten Probanden ergaben für den TAS2R38 AAI und PTC *in vivo* eine

30fach geringere Sensitivität als die „Schmeckervariante“ PAV (PAV: 3,3 μM ; AAI: 97,4 μM). *In-vitro* wurde ein Sensitivitätsunterschied von Faktor 2 ermittelt (PAV: 1,1 μM ; AAI: 2,0 μM) {Bufe et al., 2005}, der sich in dieser Arbeit bestätigte. Da sich ein Polymorphismus in der 1. intrazellulären Schleife der TAS2R38 befindet, könnte die Diskrepanz des Faktors zwischen *in vivo* und *in vitro* wiederum auf unterschiedlichen Kopplungseffizienzen an die verschiedenen G α -Untereinheiten der beiden Systeme beruhen (siehe: 1.5 und 5.4.2). Wahrscheinlich sind auch sensorische Unterschiede für den TAS2R47 und TAS2R49, deren Haplotypen deutliche EC₅₀-Unterschiede zeigten (Tab. 14, Abb. 38). Spezifische Agonisten dieser Rezeptoren sind nicht bekannt. TAS2R49, dessen Haplotypen einen EC₅₀-Unterschied von Faktor 7 aufweisen, besitzt jedoch die höchste Sensitivität für das Medikament Cromolyn. Für diese Agonisten sind verschiedene Phänotypen wahrscheinlich.

Für die Rezeptoren TAS2R16 und TAS2R41 gibt es Zeichen lokaler Anpassung und damit auch Hinweise auf unterschiedliche Phänotypen, da die *in vitro* 2fach weniger sensitive TAS2R16-Variante ausschließlich in Afrika auftritt {Soranzo et al., 2005}, während die afrikanischen Probanden dieser Arbeit und bei Kim und Kollegen, bis auf eine Ausnahme, alle homozygot für die sensitivere TAS2R41-Variante waren {2005}. Für den TAS2R16 fehlen sensorische Daten der verschiedenen Haplotypen, z.Bsp. für die spezifischen Agonisten Salicin, dem natürlichen Schmerzmittel der Weide; Amygdalin, dem cyanogenen Glykosid der Bittermandel oder Arbutin, das in verschiedenen Beeren, sowie in Tee, Kaffee und Rotwein enthalten ist. Für den TAS2R41 fehlt ein potenter und spezifischer Ligand.

Für Rezeptoren, deren EC₅₀-Werte aufgrund fehlender Rezeptorsättigung nicht ermittelt werden konnten (TAS2R5, TAS2R13), sind die phänotypischen Auswirkungen unklar. Spezifische oder besonders affine Agonisten fehlen bislang für den TAS2R13 und TAS2R7, sodass sensorische Analysen der Haplotypen nicht möglich sind.

Für Haplotypen der Rezeptoren TAS2R43 und TAS2R44 wurden sensorische Daten bereits veröffentlicht {Roudnitzky et al., 2011} und im Abschnitt 5.4 diskutiert. Letzlich müssen alle hier diskutierten phänotypischen Unterschiede durch sensorische Studien verifiziert werden.

6 Zusammenfassung

Der Mensch besitzt ~25 funktionelle Bitterrezeptoren (TAS2R), die für die Wahrnehmung potenziell toxischer Substanzen in der Nahrung verantwortlich sind. Aufgrund der großen genetischen Variabilität der TAS2R-Gene könnte es eine Vielzahl funktionell unterschiedlicher TAS2R-Haplotypen geben, die zu Unterschieden der Bitterwahrnehmung führen. Dies konnte bereits in funktionellen Analysen und sensorischen Studien für einzelne Bitterrezeptoren gezeigt werden. In dieser Arbeit wurden die häufigsten Haplotypen aller 25 Bitterrezeptoren verschiedener Ethnien funktionell charakterisiert. Das Ziel war eine umfassende Aussage über die funktionelle Diversität der TAS2Rs, die die molekulare Grundlage für individuelle Bitterwahrnehmung bildet, treffen zu können. Fehlende Varianten wurden aus genomischer DNA kloniert oder durch gezielte Mutagenese bereits vorhandener TAS2R-Konstrukte generiert. Die funktionelle Analyse erfolgte mittels Expression der TAS2R-Haplotypen in HEK293T_{G16gust44}-Zellen und anschließenden Calcium-Imaging-Experimenten mit zwei bekannten Agonisten. Die Haplotypen der fünf orphanen TAS2Rs wurden mit über hundert Bitterstoffen stimuliert. Durch die gelungene Deorphanisierung des TAS2R41 in dieser Arbeit, wurden für die 21 aktivierbaren TAS2Rs 36 funktionell-unterschiedliche Haplotypen identifiziert. Die tatsächliche funktionelle Vielfalt blieb jedoch deutlich hinter der genetischen Variabilität der TAS2Rs zurück. Neun Bitterrezeptoren wiesen funktionell homogene Haplotypen auf oder besaßen nur eine weltweit vorherrschende Variante. Funktionell heterogene Haplotypen wurden für zwölf TAS2Rs identifiziert. Inaktive Varianten der Rezeptoren TAS2R9, TAS2R38 und TAS2R46 sollten die Wahrnehmung von Bitterstoffen wie Ofloxacin, Cnicin, Hydrocortison, Limonin, Parthenolid oder Strychnin beeinflussen. Unterschiedlich sensitive Varianten, besonders der Rezeptoren TAS2R47 und TAS2R49, sollten für Agonisten wie Absinthin, Amarogentin oder Cromolyn ebenfalls zu phänotypischen Unterschieden führen. Wie für den TAS2R16 bereits gezeigt, traten Haplotypen des funktionell heterogenen TAS2R7 und TAS2R41 ethnien-spezifisch auf, was auf lokale Anpassung und verschiedene Phänotypen hinweisen könnte. Weiterführend muss nun eine Analyse der funktionell-variablen TAS2Rs in sensorischen Tests erfolgen, um ihre phänotypische Relevanz zu prüfen. Die Analyse der funktionsmodulierenden Aminosäurepositionen, z.Bsp. des TAS2R44, TAS2R47 oder TAS2R49, könnte weiterführend zum besseren Verständnis der Rezeptor-Ligand- und Rezeptor-G-Protein-Interaktion beitragen.

Literaturverzeichnis

- Adler, E., M. A. Hoon, et al. (2000). "A novel family of mammalian taste receptors." *Cell* 100(6): 693-702.
- Ammon, C., J. Schafer, et al. (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.
- Amos, W. and J. Harwood (1998). "Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353(1366): 177-86.
- Andersson, H., A. M. D'Antona, et al. (2003). "Membrane assembly of the cannabinoid receptor 1: impact of a long N-terminal tail." *Mol Pharmacol* 64(3): 570-7.
- Bachmanov, A. A. and G. K. Beauchamp (2007). "Taste receptor genes." *Annu Rev Nutr* 27: 389-414.
- Ballesteros, J. A. and H. Weinstein (1995). Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors
Methods in Neurosciences. Receptor Molecular Biology. S. C. Sealfon, Academic Press: 366-428.
- Bartoshuk, L. M., V. B. Duffy, et al. (1994). "PTC/PROP tasting: anatomy, psychophysics, and sex effects." *Physiol Behav* 56(6): 1165-71.
- Behrens, M., J. Bartelt, et al. (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, et al. (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, et al. (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, et al. (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 (2011). "Gustatory and extragustatory functions of mammalian taste receptors." *Physiol Behav.* 2011 Nov 30;105(1):4-13.
- Behrens, M., S. Born, et al. (2012). "Immunohistochemical Detection of TAS2R38 Protein in Human Taste Cells." *PLoS One* 2012 Jul 6
- Bezencon, C., J. le Coutre, et al. (2007). "Taste-signaling proteins are coexpressed in solitary intestinal epithelial cells." *Chem Senses* 32(1): 41-9.

- Biarnes, X., A. Marchiori, et al. (2010). "Insights into the binding of Phenylthiocarbamide (PTC) agonist to its target human TAS2R38 bitter receptor." *PLoS One* 5(8): e12394.
- Brockhoff, A., M. Behrens, et al. (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, et al. (2010). "Structural requirements of bitter taste receptor activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(24): 11110-5.
- Bufe, B., P. A. Breslin, et al. (2005). "The molecular basis of individual differences in phenylthiocarbamide and propylthiouracil bitterness perception." *Curr Biol* 15(4): 322-7.
- Bufe, B., T. Hofmann, et al. (2002). "The human TAS2R16 receptor mediates bitter taste in response to beta-glucopyranosides." *Nat Genet* 32(3): 397-401.
- Calo, C., A. Padiglia, et al. (2011). "Polymorphisms in TAS2R38 and the taste bud trophic factor, gustin gene co-operate in modulating PROP taste phenotype." *Physiol Behav.* 2011 Oct 24;104(5):1065-71.
- Calvo, S. E., D. J. Pagliarini, et al. (2009). "Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(18): 7507-12.
- Cannon, D. S., Baker, et al. (2005). "Associations between phenylthiocarbamide gene polymorphisms and cigarette smoking." *Nicotine Tob Res* 7: 853-8.
- Chandrashekar, J., M. A. Hoon, et al. (2006). "The receptors and cells for mammalian taste." *Nature* 444(7117): 288-94.
- Chandrashekar, J., K. L. Mueller, et al. (2000). "T2Rs function as bitter taste receptors." *Cell* 100(6): 703-11.
- Chaudhari, N. and S. D. Roper (2010). "The cell biology of taste." *J Cell Biol* 190(3): 285-96.
- Chazenbalk, G. D., Y. Nagayama, et al. (1990). "Functional analysis of the cytoplasmic domains of the human thyrotropin receptor by site-directed mutagenesis." *J Biol Chem* 265(34): 20970-5.
- Chittenden, T., A. Frey, et al. (1991). "Regulated replication of an episomal simian virus 40 origin plasmid in COS7 cells." *J Virol* 65(11): 5944-51.
- Clapp, T. R., K. R. Trubey, et al. (2008). "Tonic activity of Galpha-gustducin regulates taste cell responsivity." *FEBS Lett* 582(27): 3783-7.
- Conte, C., M. Ebeling, et al. (2003). "Evolutionary relationships of the Tas2r receptor gene families in mouse and human." *Physiol Genomics* 14(1): 73-82.

- Dai, W., Z. You, et al. (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.
- Dong, D., G. Jones, et al. (2009). "Dynamic evolution of bitter taste receptor genes in vertebrates." *BMC Evol Biol* 9: 12.
- Dotson, C. D., H. L. Shaw, et al. (2010). "Variation in the gene TAS2R38 is associated with the eating behavior disinhibition in Old Order Amish women." *Appetite* 54(1): 93-9.
- Dotson, C. D., L. Zhang, et al. (2008). "Bitter taste receptors influence glucose homeostasis." *PLoS One* 3(12): e3974.
- Drayna, D., H. Coon, et al. (2003). "Genetic analysis of a complex trait in the Utah Genetic Reference Project: a major locus for PTC taste ability on chromosome 7q and a secondary locus on chromosome 16p." *Hum Genet* 112(5-6): 567-72.
- Drewnowski, A. (2001). "The science and complexity of bitter taste." *Nutr Rev* 59(6): 163-9.
- Drewnowski, A. and C. Gomez-Carneros (2000). "Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review." *Am J Clin Nutr* 72(6): 1424-35.
- Dsamou, M., O. Palicki, et al. (2011). "Salivary Protein Profiles and Sensitivity to the Bitter Taste of Caffeine." *Chem Senses*. 2012 Jan;37(1):87-95.
- Edwards, N. C., Z. A. Hing, et al. (2012). "Characterization of Coding Synonymous and Non-Synonymous Variants in ADAMTS13 Using Ex Vivo and In Silico Approaches." *PLoS One* 7, e38864.
- Feeney, E., S. O'Brien, et al. (2011). "Genetic variation in taste perception: does it have a role in healthy eating?" *Proc Nutr Soc* 70(1): 135-43.
- Finger, T. E., B. Bottger, et al. (2003). "Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(15): 8981-6.
- Fisher, R. A. F., E.B. & Huxley, J (1939). "Taste-testing the Anthropoid Apes." *Nature* 144(750 (28 October 1939)).
- Floriano, W. B., S. Hall, et al. (2006). "Modeling the human PTC bitter-taste receptor interactions with bitter tastants." *J Mol Model* 12(6): 931-41.
- Fox, A. L. (1932). "The Relationship between Chemical Constitution and Taste." *Proc Natl Acad Sci U S A* 18(1): 115-20.
- Galindo, M. M., N. Voigt, et al. (2011). "G Protein-Coupled Receptors in Human Fat Taste Perception." *Chem Senses*. 2012 Feb;37(2):123-39.
- Giduck, S. A., R. M. Threatte, et al. (1987). "Cephalic reflexes: their role in digestion and possible roles in absorption and metabolism." *J Nutr* 117(7): 1191-6.

Glendinning, J. I., Y. M. Yiin, et al. (2008). "Intragastric infusion of denatonium conditions flavor aversions and delays gastric emptying in rodents." *Physiol Behav* 93(4-5): 757-65.

Go, Y., Y. Satta, et al. (2005). "Lineage-specific loss of function of bitter taste receptor genes in humans and nonhuman primates." *Genetics* 170(1): 313-26.

Gorovic, N., S. Afzal, et al. (2011). "Genetic variation in the hTAS2R38 taste receptor and brassica vegetable intake." *Scand J Clin Lab Invest* 71(4): 274-9.

Greene, T. A., S. Alarcon, et al. (2011). "Probenecid inhibits the human bitter taste receptor TAS2R16 and suppresses bitter perception of salicin." *PLoS One* 6(5): e20123.

Grimm, E. R. and N. I. Steinle (2011). "Genetics of eating behavior: established and emerging concepts." *Nutr Rev* 69(1): 52-60.

Hanson, M. A. and R. C. Stevens (2009). "Discovery of new GPCR biology: one receptor structure at a time." *Structure* 17(1): 8-14.

Hayes, J. E., M. R. Wallace, et al. (2011). "Allelic variation in TAS2R bitter receptor genes associates with variation in sensations from and ingestive behaviors toward common bitter beverages in adults." *Chem Senses* 36(3): 311-9.

Hinrichs, A. L., J. C. Wang, et al. (2006). "Functional variant in a bitter-taste receptor (hTAS2R16) influences risk of alcohol dependence." *Am J Hum Genet* 78(1): 103-11.

Huang, L., Y. G. Shanker, et al. (1999). "Ggamma13 colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates IP3 responses to bitter denatonium." *Nat Neurosci* 2(12): 1055-62.

Intelmann, D., C. Batram, et al. (2009). "Three TAS2R Bitter Taste Receptors Mediate the Psychophysical Responses to Bitter Compounds of Hops and Beer." *Chemosensory Perception* 2(3): 118-132.

Jang, H. J., Z. Kokrashvili, et al. (2007). "Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(38): 15069-74.

Kagimoto, S., Y. Yamada, et al. (1994). "Human somatostatin receptor, SSTR2, is coupled to adenylyl cyclase in the presence of Gi alpha 1 protein." *Biochem Biophys Res Commun* 202(2): 1188-95.

Kaji, I., S. Karaki, et al. (2009). "Secretory effects of a luminal bitter tastant and expressions of bitter taste receptors, T2Rs, in the human and rat large intestine." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296(5): G971-81.

Katz, A., D. Wu, et al. (1992). "Subunits [beta][gamma] of heterotrimeric G protein activate [beta]2 isoform of phospholipase C." *J Biol Chem* 267(6405): 686-689.

Kim, U., S. Wooding, et al. (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, et al. (2003). "Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide." *Science* 299(5610): 1221-5.

Kim, U. K., S. Wooding, et al. (2006). "Variation in the human TAS1R taste receptor genes." *Chem Senses* 31(7): 599-611.

Kimchi-Sarfaty, C., J. M. Oh, et al. (2007). "A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity." *Science* 315: 525-8.

Kinnamon, S. C. and R. F. Margolskee (1996). "Mechanisms of taste transduction." *Curr Opin Neurobiol* 6(4): 506-13.

Kleinau, G., H. Jaeschke, et al. (2010). "Principles and determinants of G-protein coupling by the rhodopsin-like thyrotropin receptor." *PLoS One* 5(3): e9745.

Krautwurst, D., K. W. Yau, et al. (1998). "Identification of ligands for olfactory receptors by functional expression of a receptor library." *Cell* 95(7): 917-26.

Kuhn, C., B. Bufo, et al. (2010). "Oligomerization of TAS2R bitter taste receptors." *Chem Senses* 35(5): 395-406.

Kuhn, C., B. Bufo, et al. (2004). "Bitter taste receptors for saccharin and acesulfame K." *J Neurosci* 24(45): 10260-5.

Lagerstrom, M. C. and H. B. Schiöth (2008). "Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery." *Nat Rev Drug Discov* 7(4): 339-57.

Law, S. F., K. Yasuda, et al. (1993). "Gi alpha 3 and G(o) alpha selectively associate with the cloned somatostatin receptor subtype SSTR2." *J Biol Chem* 268(15): 10721-7.

Li, F. and M. Zhou, (2012). "Depletion of bitter taste transduction leads to massive spermatid loss in transgenic mice." *Mol Hum Reprod* 18: 289-97.

Li, H., A. J. Pakstis, et al. (2011). "Selection on the human bitter taste gene, TAS2R16, in Eurasian populations." *Hum Biol* 83(3): 363-77.

Lindemann, B. (1996). "Taste reception." *Physiol Rev* 76(3): 718-66.

Lindemann, B. (2001). "Receptors and transduction in taste." *Nature* 413(6852): 219-25.

Lou, X. Y., G. B. Chen, et al. (2008). "A combinatorial approach to detecting gene-gene and gene-environment interactions in family studies." *Am J Hum Genet* 83(4): 457-67.

Maehashi, K., M. Matano, et al. (2008). "Bitter peptides activate hTAS2Rs, the human bitter receptors." *Biochem Biophys Res Commun* 365(4): 851-5.

Mangold, J. E., T. J. Payne, et al. (2008). "Bitter taste receptor gene polymorphisms are an important factor in the development of nicotine dependence in African Americans." *J Med Genet* 45(9): 578-82.

- Margolskee, R. F. (2002). "Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction." *J Biol Chem* 277(1): 1-4.
- Matsunami, H., J. P. Montmayeur, et al. (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.
- McLaughlin, S. K., P. J. McKinnon, et al. (1992). "Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins." *Nature* 357(6379): 563-9.
- Mennella, J. A., M. Y. Pepino, et al. (2010). "Psychophysical dissection of genotype effects on human bitter perception." *Chem Senses* 36(2): 161-7.
- Meyerhof, W. (2005). "Elucidation of mammalian bitter taste." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 154: 37-72.
- Meyerhof, W., C. Batram, et al. (2010). "The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors." *Chem Senses* 35(2): 157-70.
- Meyerhof, W., S. Born, et al. (2011). "Molecular biology of mammalian bitter taste receptors. A review." *Flavour and Fragrance Journal* 26(4): 260-268.
- Miguet, L., Z. Zhang, et al. (2006). "Computational studies of ligand-receptor interactions in bitter taste receptors." *J Recept Signal Transduct Res* 26(5-6): 611-30.
- Muramatsu, T. and M. Suwa (2006). "Statistical analysis and prediction of functional residues effective for GPCR-G-protein coupling selectivity." *Protein Eng Des Sel* 19(6): 277-83.
- 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.
- Palczewski, K., T. Kumasaka, et al. (2000). "Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor." *Science* 289(5480): 739-45.
- Power, M. L. and J. Schulkin (2008). "Anticipatory physiological regulation in feeding biology: cephalic phase responses." *Appetite* 50: 194-206.
- Pronin, A. N., H. Tang, et al. (2004). "Identification of ligands for two human bitter T2R receptors." *Chem Senses* 29(7): 583-93.
- Pronin, A. N., H. Xu, et al. (2007). "Specific alleles of bitter receptor genes influence human sensitivity to the bitterness of aloin and saccharin." *Curr Biol* 17(16): 1403-8.
- Reed, D. R., G. Zhu, et al. (2010). "The perception of quinine taste intensity is associated with common genetic variants in a bitter receptor cluster on chromosome 12." *Hum Mol Genet* 19(21): 4278-85.
- Reichling, C., W. Meyerhof, et al. (2008). "Functions of human bitter taste receptors depend on N-glycosylation." *J Neurochem* 106(3): 1138-48.

- Rosenbaum, D. M., S. G. Rasmussen, et al. (2009). "The structure and function of G-protein-coupled receptors." *Nature* 459(7245): 356-63.
- Rossler, P., I. Boekhoff, et al. (2000). "G protein betagamma complexes in circumvallate taste cells involved in bitter transduction." *Chem Senses* 25(4): 413-21.
- Roudnitzky, N., B. Bufe, et al. (2011). "Genomic, genetic and functional dissection of bitter taste responses to artificial sweeteners." *Hum Mol Genet.* 2011 Sep 1;20(17):3437-49.
- Rozengurt, N., S. V. Wu, et al. (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.
- Sainz, E., M. M. Cavenagh, et al. (2007). "Functional characterization of human bitter taste receptors." *Biochem J* 403(3): 537-43.
- Sakurai, T., T. Misaka, et al. (2010). "Characterization of the beta-D-glucopyranoside binding site of the human bitter taste receptor hTAS2R16." *J Biol Chem* 285(36): 28373-8.
- Sandell, M. A. and P. A. Breslin (2006). "Variability in a taste-receptor gene determines whether we taste toxins in food." *Curr Biol* 16(18): R792-4.
- Sausenthaler, S., P. Rzehak, et al. (2009). "Lack of relation between bitter taste receptor TAS2R38 and BMI in adults." *Obesity (Silver Spring)* 17(5): 937-8; author reply 939.
- Sclafani, A., K. Ackroff, et al. (2007). "CD36 gene deletion reduces fat preference and intake but not post-oral fat conditioning in mice." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293(5): R1823-32.
- Shi, P. and J. Zhang (2006). "Contrasting modes of evolution between vertebrate sweet/umami receptor genes and bitter receptor genes." *Mol Biol Evol* 23(2): 292-300.
- Shi, P., J. Zhang, et al. (2003). "Adaptive diversification of bitter taste receptor genes in Mammalian evolution." *Mol Biol Evol* 20(5): 805-14.
- Shirokova, E., K. Schmiedeberg, et al. (2005). "Identification of specific ligands for orphan olfactory receptors. G protein-dependent agonism and antagonism of odorants." *J Biol Chem* 280(12): 11807-15.
- Soranzo, N., B. Bufe, et al. (2005). "Positive selection on a high-sensitivity allele of the human bitter-taste receptor TAS2R16." *Curr Biol* 15(14): 1257-65.
- Stähler, F., and Meyerhof, W. (2010). "Geschmackspräferenzen/Geschmacksaversionen- wie Rezeptorzellen Nahrungspräferenzen prägen." *Schweizer Zeitschrift für Ernährungsmedizin* 2: 6-9.
- Steiner, J. E. (1973). "The gustofacial response: observation on normal and anencephalic newborn infants." *Symp Oral Sens Percept*(4): 254-78.
- Steiner, J. E. (1979). "Human facial expressions in response to taste and smell stimulation." *Adv Child Dev Behav* 13: 257-95.

- Sugawara, T., Y. Go, Y., et al. (2011). "Diversification of bitter taste receptor gene family in western chimpanzees." *Mol Biol Evol* 28: 921-31.
- Thomas, P. and T.G. Smart, (2005). "HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins." *J Pharmacol Toxicol Methods* 51: 187-200.
- Ueda, T., S. Ugawa, et al. (2001). "Identification of coding single-nucleotide polymorphisms in human taste receptor genes involving bitter tasting." *Biochem Biophys Res Commun* 285(1): 147-51.
- Ueda, T., S. Ugawa, et al. (2003). "Functional interaction between T2R taste receptors and G-protein alpha subunits expressed in taste receptor cells." *J Neurosci* 23(19): 7376-80.
- Vaidehi, N., W. B. Floriano, et al. (2002). "Prediction of structure and function of G protein-coupled receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(20): 12622-7.
- Wang, J. C., A. L. Hinrichs, et al. (2007). "Functional variants in TAS2R38 and TAS2R16 influence alcohol consumption in high-risk families of African-American origin." *Alcohol Clin Exp Res* 31(2): 209-15.
- Wang, X., S. D. Thomas, et al. (2004). "Relaxation of selective constraint and loss of function in the evolution of human bitter taste receptor genes." *Hum Mol Genet* 13(21): 2671-8.
- Wooding, S. (2011). "Signatures of Natural Selection in a Primate Bitter Taste Receptor." *J Mol Evol*. 2011 Dec;73(5-6):257-65.
- Wooding, S., B. Bufe, et al. (2006). "Independent evolution of bitter-taste sensitivity in humans and chimpanzees." *Nature* 440(7086): 930-4.
- Wooding, S., U. K. Kim, et al. (2004). "Natural selection and molecular evolution in PTC, a bitter-taste receptor gene." *Am J Hum Genet* 74(4): 637-46.
- Wu, S. V., N. Rozengurt, et al. (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.
- Yan, W., G. Sunavala, et al. (2001). "Bitter taste transduced by PLC-beta(2)-dependent rise in IP(3) and alpha-gustducin-dependent fall in cyclic nucleotides." *Am J Physiol Cell Physiol* 280(4): C742-51.
- Zafra, M. A., F. Molina, et al. (2006). "The neural/cephalic phase reflexes in the physiology of nutrition." *Neurosci Biobehav Rev* 30(7): 1032-44.
- Zhao, H., Y. Zhou, et al. (2010). "Evolution of the sweet taste receptor gene *Tas1r2* in bats." *Mol Biol Evol* 27: 2642-50.
- Zhou, Y., D. Dong et al. (2009). "Positive selection drives the evolution of bat bitter taste receptor genes." *Biochem Genet* 47: 207-15.

Anhang

Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
As	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Albumin aus Rinderserum
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosin Monophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
°C	Grad Celsius
CMV	Humanes Cytomegalovirus
C-Terminus	Carboxyterminales Rezeptorende
ez	Extrazelluläre Schleife
iz	Intrazelluläre Schleife
E.coli	Escherichia coli
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FLIPR	Flourescence Imaging Plate Reader
HCl	Salzsäure
HEK293T	humane embryonale Nierenzellen
HSV-Epitop	Herpes Simplex Virus Glycoprotein D Epitop
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
EC50	Konzentration bei der halbmaximale Rezeptoraktivierung
EGFP	Enhanced Green Flourescence Protein
FCS	Fötale Kälberserum
G418	Geneticin
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
g	Gramm
Gα15 oder 16	G-Protein Alpha Untereinheit G15 oder 16
Gαq oder i	G-Protein Alpha Untereinheit Typ Gq oder Gi
IP ₃	Inositoltrisphosphat
l	Liter
min	Minuten
mRNA	Boten Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
nH	Hill-Koeffizient
mM	millimolar
μM	micromolar
ml	Milliliter
nm	Nanometer
N-Terminus	Aminoterniales Rezeptorende
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PLC	Phospholipase C
PLC-β-2	Phospholipase C beta zwei
PTC	Phenylthiocarbamid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR mit cDNA als Ausgangsmaterial
sek.	Sekunden
SNP	Einzelnukeotid-Polymorphismus
SST-Epitop	45 N-terminalen As des Somatostatinrezeptors Typ3
SST	Somatostatin
TAS2R	Bitterrezeptor
TM	Transmembrandomäne

Abkürzung Aminosäuren:

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

Primerliste:

Zielgen	Name/Nr.	Sequenz (5' → 3')	T _a C°	Bemerkungen
Genotypisierung:				
pcDNA5	CMV _F	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	60	Sequenzierung/ Mutagenese
	BGH _R	TAGAAGGCACAGTCGAGG	60	Sequenzierung/ Mutagenese
peak10	914 _F	AGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCC	60	Sequenzierung/ Mutagenese
	919 _{R+3847}	ACCTGTCCCGCCTTGAG	60	Sequenzierung/ Mutagenese
TAS2R9	*1191 _{F-112}	ATCACAGCTAACAAAAAGGAGAGAT	63	PCR/ Sequenzierung
	*1192 _{R+53}	ATGCAAACAAGAGAAGGGAGAAT	63	PCR/ Sequenzierung
TAS2R41	*1206 _{F-132}	CTGAGCATCCTCCTCTCTAAGTGA	61	PCR/ Sequenzierung
	*1207 _{R+98}	AGCCCCATAACAGTACCCAGT	61	PCR/ Sequenzierung
TAS2R42	*1187 _{F-234}	TCCCGTGAAGGTATGTGAGA	57	PCR/ Sequenzierung
	*1188 _{R+145}	GACCGGCAATGTGTGAATTA	57	PCR
	1190 _{R+33}	CCAAATGCACCTCGTTGAGT	-	Sequenzieren
TAS2R45	1151 _{F-124}	TGTAACATCACTGCAAAGGTCCG	65	PCR/ Sequenzierung
	1091 _{R+70}	TGTTTTCTGCTAGAAGACACACAATG C	65	PCR/ Sequenzierung (= R44!)
TAS2R46	752 _{F-153}	ATTAGCATGCCATGGTGATTTCTG	63	PCR/ Sequenzierung
	753 _{R+100}	AGGTAAAAGACTTTTCTAGGTACATG CTTGAAAGTTAT	63	PCR
	844 _{R+64}	CATACATTACAGAAAACACAGTAAG AAAT	-	Sequenzierung
TAS2R47	756 _{F-163}	ATTGAACTTATCCATTAGCATGCCAT G	63	PCR/ Sequenzierung
	757 _{R+86}	ACATCTATATATATGTACTTTTCTAG ACTAACTTTAGGTAAAAGACTTTTCT AGGTAT	63	PCR

Zielgen	Name/Nr.	Sequenz (5' → 3')	T _a C°	Bemerkungen
	1152 _{R+129}	TCTAGGTATACATGTGGAAA	-	Sequenzierung
	1184 _{F nt352}	TTTCTTCGCATAAAGAGGAGAGTT	-	Sequenzierung
TAS2R48	847 _{F-142}	ATTCATCTATTAGCATATGCTGGTGC TTG	65	PCR/ Sequenzierung
	848 _{R+85}	ACACACATGCACACATATACACCCAT AAATATATATAT	65	PCR/ Sequenzierung
TAS2R60	*1208 _{F -61}	GACAAACATATCCTACAGGACCTTC	61	PCR/ Sequenzierung
	*1209 _{R +84}	TGTAGCAACAGAGAGAAAACATTCA	61	PCR/ Sequenzierung
Klonierung/ gDNA: unterstrichen = komplementär				
TAS2R9	163 _F	GGCCAATTGGAATTC <u>ATGCCAAGTGCAATA</u> <u>GAGGCAATATATATTATT</u>	65	
	162 _R	T CCT CAA TTG TCA TCA GCG GCC GCC <u>TGG AAC AAA AGG CTT TCT</u> <u>TCT TCT AAGG</u>	65	
TAS2R38	109 _F	GGCCAATTGGAATTC <u>ATGTTGACTCTAACTCGC</u> <u>ATCCGCA</u>	60	
	110 _R	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCC <u>GCACAG</u> <u>TGTCCGGGAATCTG</u>	60	
TAS2R41	118 _F	GGCCAATTGGAATTC <u>ATGCAAGCAGCACTG</u> <u>ACGGCCTTCTTCGTGTTG</u>	58	
	117 _R	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCC <u>GGCCAC CCAGAAGCCC</u>	58	
TAS2R42	721 _F	<u>CATGGCCACCGAATTGGACA</u>	64	5'blunt-Klonierung
	113 _R	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCC <u>CAAAGG</u> <u>TAAAGCATTGGTGTGTTTTGTATAGT</u> T	64	H2/ H3
	1193 _R	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCC <u>CAAAGG</u> <u>TAAAGGGTTGGTGTGTTTTGTATAGT</u> T	60	H1
TAS2R45	149 _F	GGCCAATTGGAATTC <u>ATGATAACTTTTCTGCCC</u> <u>ATCATATTTTCC</u>	63	

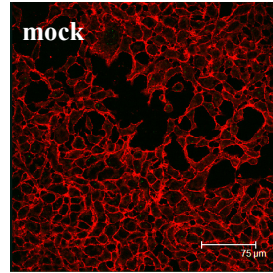
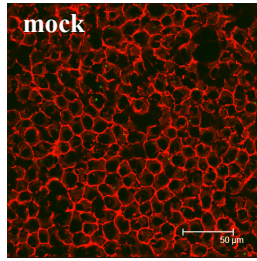
Zielgen	Name/Nr.	Sequenz (5' → 3')	T _a C°	Bemerkungen
	1194 _R	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCC <u>TGGA</u> <u>GATGAAGGCTTCTCTCCTTTAC</u>	63	lange Varianten (H1/H4)
TAS2R46	529 _F	GGCCAATTGGAATTC <u>ATGATAACTTTTCTGCCC</u> <u>ATCATTTTTTC</u>	60	2.PCR <i>nested</i> (1.PCR 752/753)
	1223 _R	GCATGCGGCCGCC <u>TGAAGATGAAGGCTTCTCTC</u>	60	2.PCR <i>nested</i> (1.PCR 752/753)
TAS2R47	529 _F	GGCCAATTGGAATTC <u>ATGATAACTTTTCTGCCC</u> <u>ATCATTTTTTC</u>	66	2.PCR <i>nested</i> (1.PCR 756/757)
	530 _R	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCC <u>GAAGACAC ACAATGCCCTCTTG</u>	66	2.PCR <i>nested</i> (1.PCR 756/757)
TAS2R48	1201 _F	GGCCAATTGGAATTC <u>ATGATGTGTTTTCTGCT CATCATTC</u>	62- 66	
	1202 _R	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCC <u>GCGTGTCA TCTGCCACAAAAC TG</u>	66	H3: 897C
	1203 _R	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCC <u>GCATGT CATCTGCCACAAAAC TGAA</u>	62	H2: 897T
TAS2R49 H4	744 _{MunI F}	GGCGAATTCCAATTG <u>ATGATGAGTTTTCTACAC</u> <u>ATTGTTTTTCCAT</u>	60	<i>MunI</i> -Klonierung
	745 _R	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCC <u>TGGAGT TGA CTGGTCTGTCTTTT</u>	60	
Mutagenese:				
peak10	919 _{lang R}	ACCTGTCCCGCCTTGAGCTG	58	R45 H3
	1222 _{R +3993}	GCACTGGAGTAGCACCTTCCACGA		R5 H3 (weiter <i>downstream</i>)
TAS2R4 H4	G286C _F	GACTCGAGCAGTCTCTGGTTTGTGAC	57	
	G286C _R	GTCACAAACCAGAGACTGCTCGAGT C	57	
TAS2R5 H3	G881T _F	GACAGTGTGTGCTCTGAGATGCTGG	63	
	G881T _R	CCAGCATCTCAGAGCACACACTGTC	63	
TAS2R7 H2	C640T _F	GAGACATATCAGGTGAATGCAGCTC	59	

Zielgen	Name/Nr.	Sequenz (5' → 3')	T _a C°	Bemerkungen
	C640T _R	GAGCTGCATTACCTGATATGTCTC	59	
	G912A _F	GGTGATTTGGAAAGTAATATCTATTC TA	53	
	G912A _R	TAGAATAGATATTACTTTCCAAATCA CC	53	
TAS2R8 H1	A922G _R	CCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCC <u>TATCACGC AGGCAATTTTCTA</u>	60	(+ Nr.330) aus H2
TAS2R10 H2	T467C _F	GATTATAAAACGAAGAATGACACAG TCTG	59	
	T467C _R	CAGACTGTGTCATTCTTCGTTTTATA ATC	59	
TAS2R13 H1	G776A _F	GAGCTGTATCAGAACACAGTGATCT ACA	59	
	G776A _R	TGTAGATCACTGTGTTCTGATACAGC TC	59	
TAS2R40 H3	G871A _F	CTACCCTGCCAGCCACTC	52	
	G871A _R	GTACTGAGTGGCTGGCAGGGTAGG	59	
TAS2R45 H1	A509G _F	ATTGAGGCGTGCAATGTACCTTTC	51	
	A509G _R	GAAAGGTACATTGCACGCCTCAAT	63	
TAS2R45 H3	C712T _F	CTTCTTCTGTTATG TGCCATTTACT	58	(+919 _{lang}) aus H2
	C712T _R	AGTAAATGGCACATAACAAGAAGAA G	56	
TAS2R49 H1	G235A _F	GAATCCAACCTCATCTAATTTAAAAG TAATAAT	55	aus H2
	G235A _R	ATTATTACTTTTAAATTAGATGAAGT TGGATTC	55	
TAS2R49 H3	A421G _F	GTTCTTTTTGGTTTGTCAACTTGTGAT GA	60	aus H4
	A421G _R	TCATCACAAGTTGACAAACCAAAAA GAAC	60	
TAS2R50 H1	A608G _F	GCTAATCTGTTCTCTGTGTAACATC	53	
	A608G _R	GATGTTTACACAGAGAACAGATTAG C	53	

* Primer aus Kim et al. {2005}

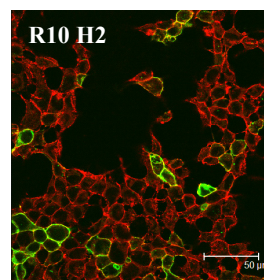
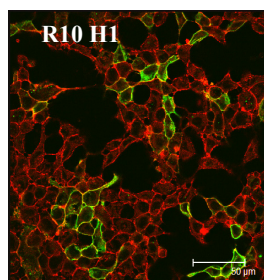
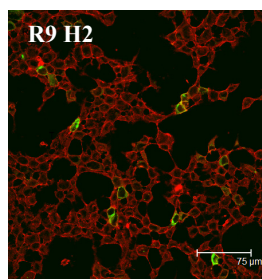
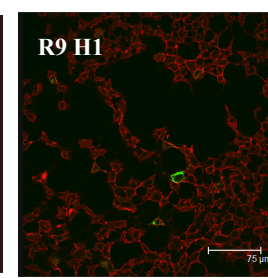
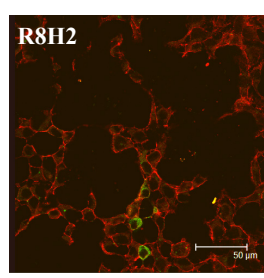
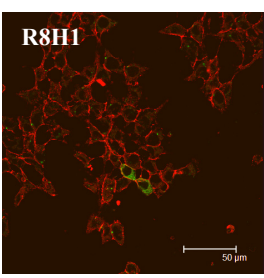
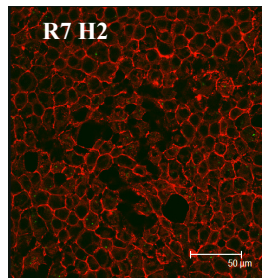
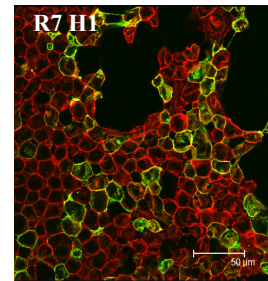
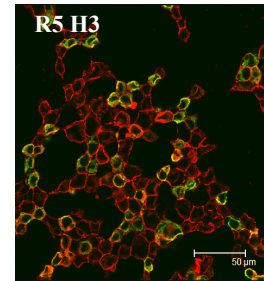
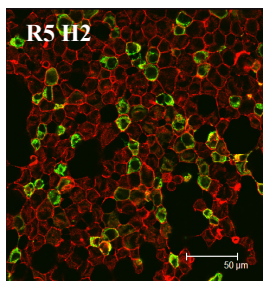
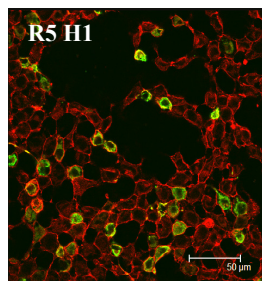
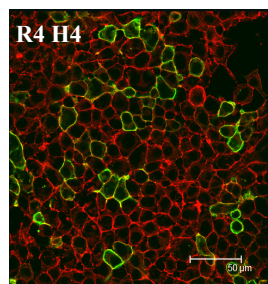
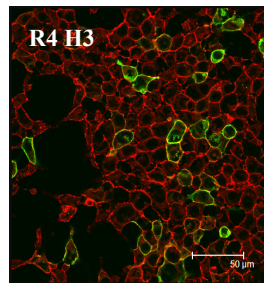
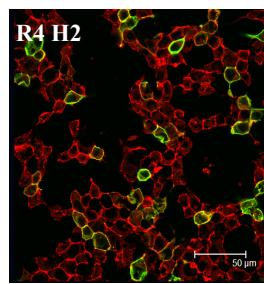
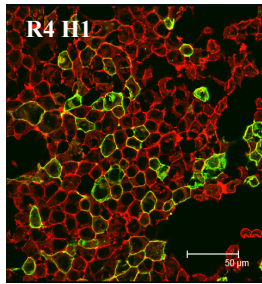
F: vorwärts ; R: rückwärts

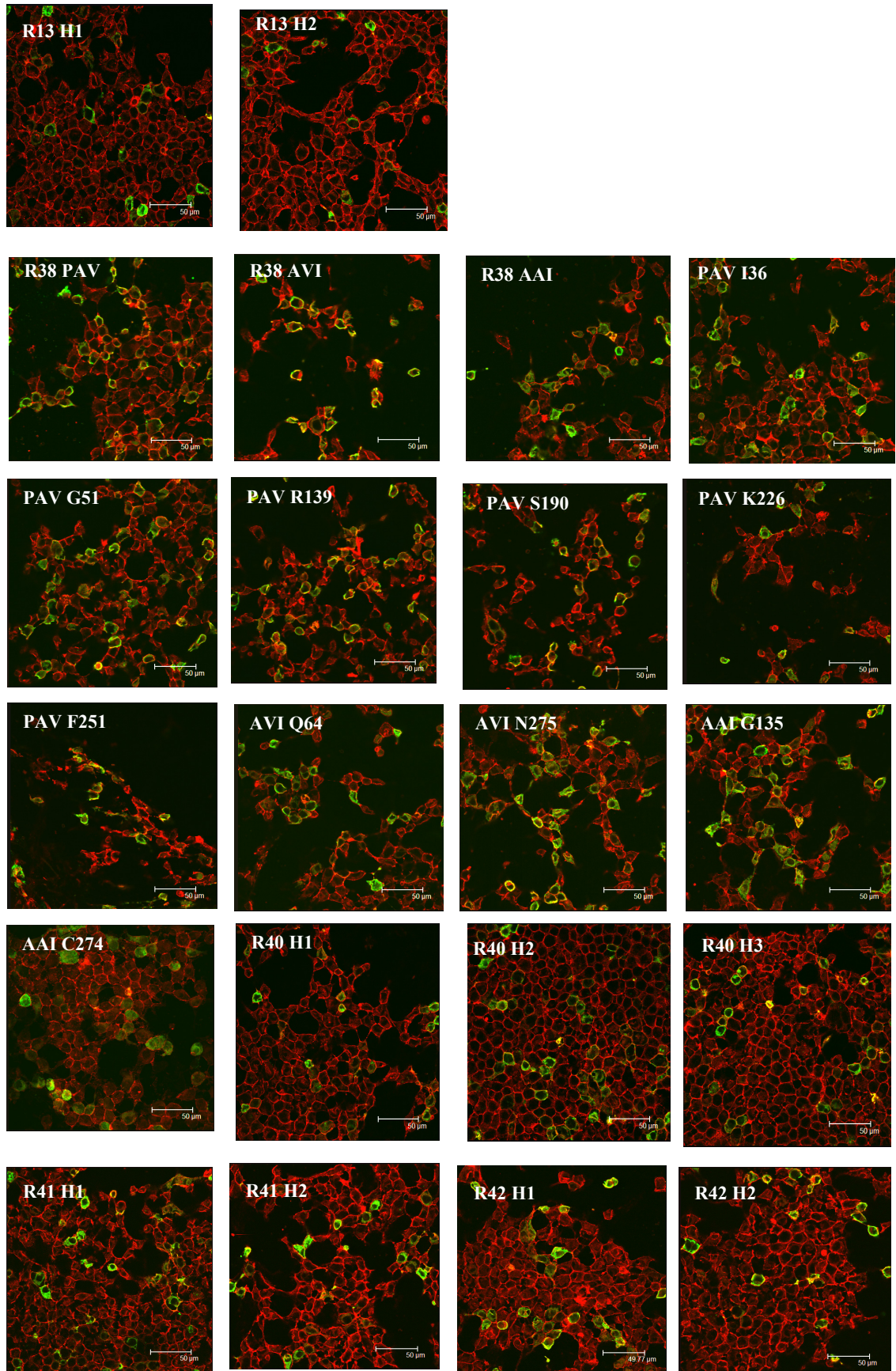
Immunzytochemie:

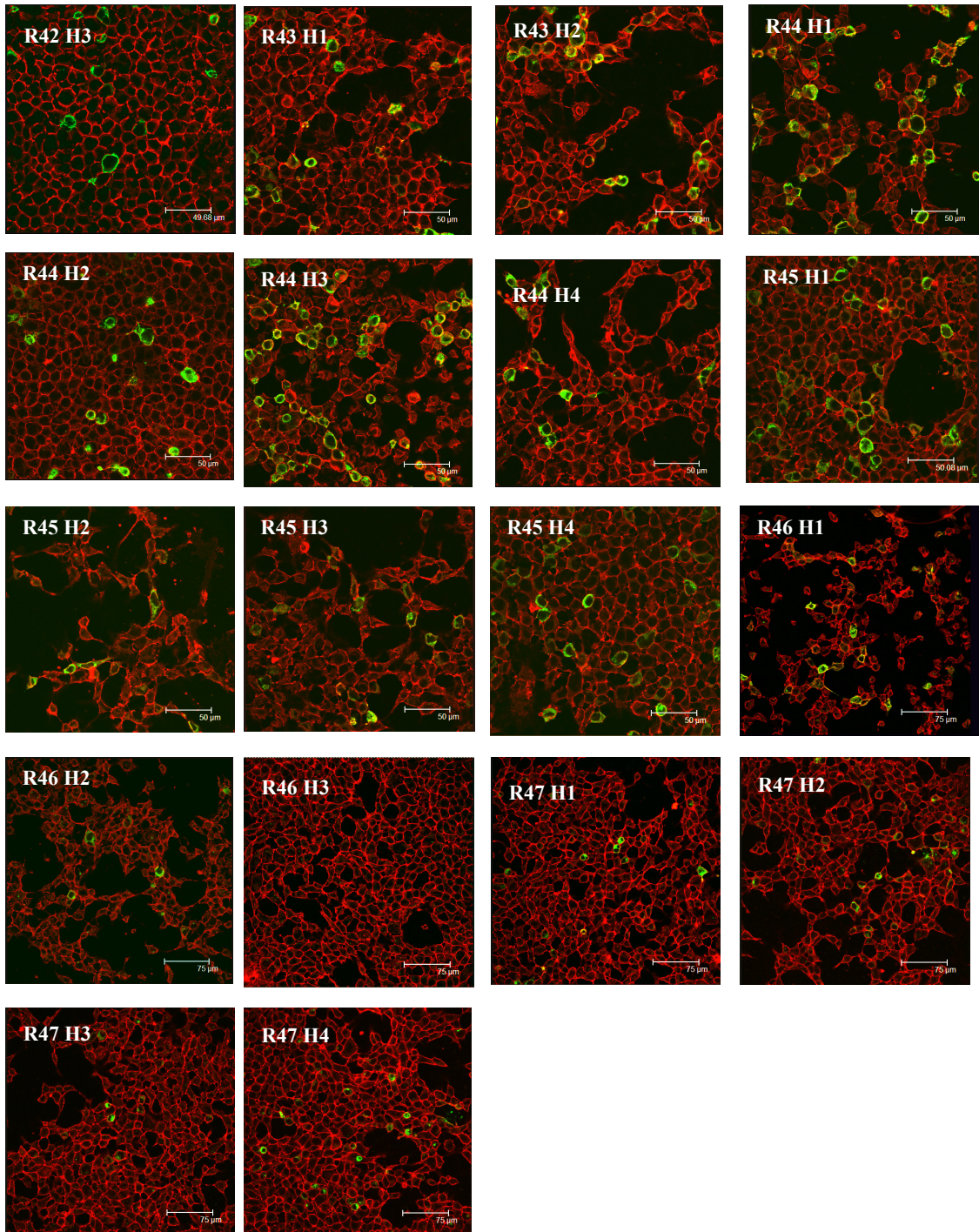


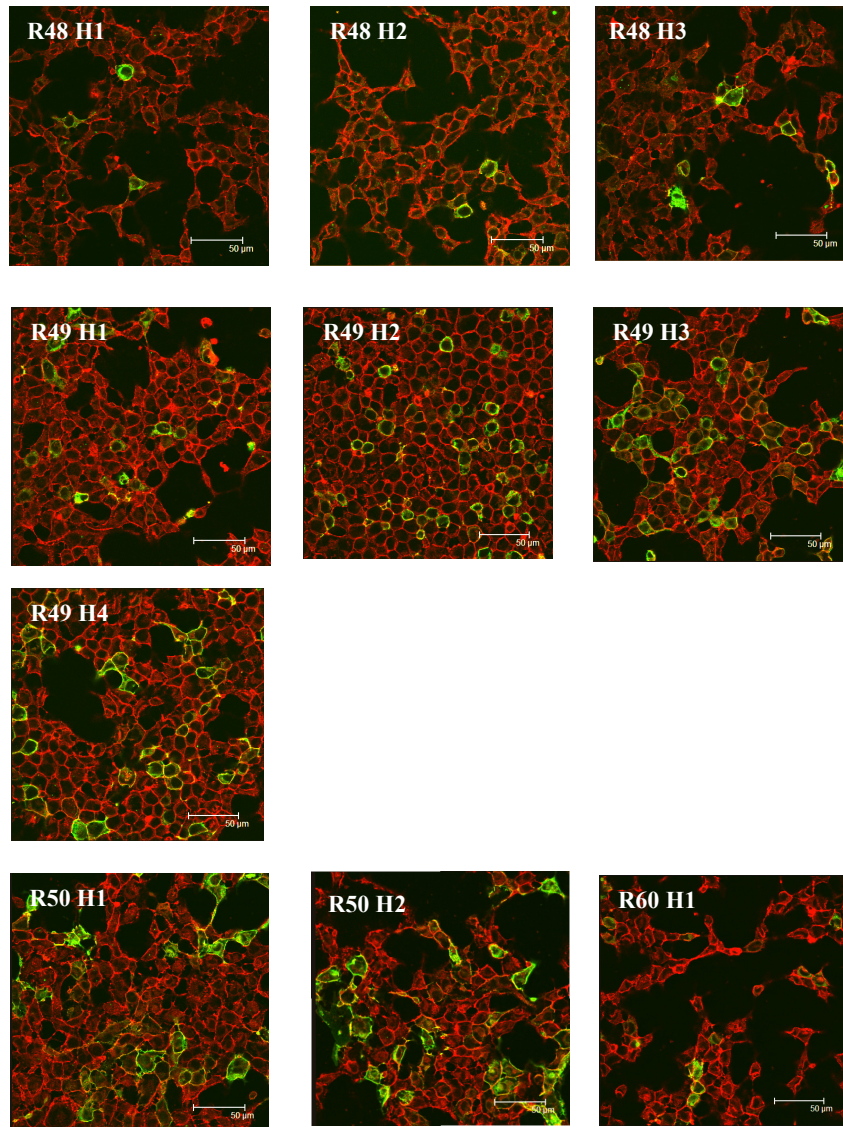
— 50 μm

— 75 μm: TAS2R9, TAS2R46;
TAS2R47









- Immunzytochemie TAS2R16 siehe {Soranzo et al., 2005}

Danksagung:

Zu guter letzt möchte ich allen Personen danken, die mich während meiner Promotion unterstützt haben.

Prof. Wolfgang Meyerhof danke ich für die Chance in seiner Abteilung zu promovieren, sein Vertrauen in selbständige Arbeit, die jederzeit offene Tür bei Problemen und die Unerbittlichkeit, im Bezug auf Vorträge.

Prof. Steven Wooding danke ich für die Zusammenarbeit am TAS2R38-Projekt.

Dr. Maik Behrens danke ich für seine Unterstützung sowohl bei praktischen Problemen, als auch bei der Verfassung wissenschaftlicher Arbeiten. Elke Chudoba, Susann Kohl und Dr. Nanette Schneider danke ich für die Unterstützung im Labor, ihre Ideen und keinesfalls zuletzt für das gute Arbeitsklima. Dr. Natacha Roudnitzky möchte ich ebenfalls für die Zusammenarbeit, die regen Diskussionen und ihre Unterstützung bei statistischen Problemen danken.

Dr. Stephan Born gebührt Dank für die unterhaltsamen Mittagspausen, mehr noch für seine Unterstützung bei Labor-, Computer- und Geräteproblemen jeglicher Art. Für das gute Arbeitsklima in den letzten Jahren, Unterstützung und Anregung verschiedenster Art möchte ich mich bei der gesamten Moge bedanken.

Außerhalb der Arbeit bin ich dankbar für die Kraft, mit der Auguste sich ins Leben gekämpft hat und für das liebevolle Babysitten durch meine Eltern, was das Schreiben der Arbeit ermöglichte. Meinen Freunden, besonders Steffi, danke ich für ihre Unterstützung, ihr Interesse, für Ablenkung, Trost und Ideen.

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 02.11.12