

Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke
Abteilung Molekulare Genetik

Molekulare und histologische Untersuchungen zur gustatorischen Fettwahrnehmung des Menschen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

„doctor rerum naturalium“

(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin „Ernährungswissenschaft“

DIPL. TROPHOLOGIN

NADINE TÖLE

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
Institut für Ernährungswissenschaft
Universität Potsdam

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung – Keine kommerzielle Nutzung 4.0 International
Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URN [urn:nbn:de:kobv:517-opus4-93180](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-93180)
<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-93180>

*Nicht Kunst und Wissenschaft allein,
Geduld will bei dem Werke sein.*

Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	XI
1 Einleitung.....	1
1.1.1 Anatomie des Geschmackssystems.....	2
1.1.2 Die Definition einer Geschmacksqualität.....	5
1.1.3 Die Grundgeschmacksqualitäten	6
1.1.4 Zelluläre und neuronale Verarbeitung von Geschmackssignalen.....	8
1.1.5 Der Einfluss von Speichelsekreten auf die Geschmackswahrnehmung.....	11
1.2 Einteilung, Vorkommen und Bedeutung von Nahrungsfetten	13
1.3 Die Wahrnehmung von Fetten	14
1.3.1 Traditionelle Aspekte der Fettwahrnehmung	15
1.3.2 Gustatorische Wahrnehmung von Fetten bei Nagetieren	17
1.3.3 Gustatorische Fettwahrnehmung beim Menschen	19
1.4 Zielstellung.....	21
2 Methoden.....	22
2.1 Untersuchungen zur RNA-Expression	22
2.1.1 Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Geweben.....	22
2.1.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren	22
2.1.3 Denaturierende und nicht-denaturierende Agarosegelelektrophorese	23
2.1.4 Synthese von cDNA aus RNA	23
2.1.5 Polymerase-Kettenreaktion.....	24
2.1.6 Klonierung von PCR-Produkten.....	25
Aufreinigung von PCR-Produkten aus Agarosegelen	26
Restriktionsverdau.....	26
Dephosphorylierung des <i>pBluescript</i> -Vektors	26
Ligation.....	26
Transformation kompetenter Bakterienzellen	27
Isolation von Plasmid-DNA.....	27
2.1.7 Sequenzierung von DNA.....	28
2.1.8 Herstellung von RNA-Sonden.....	28
Linearisierung von Vektor-Konstrukten	28
<i>In-vitro</i> -Transkription.....	28
Ammoniumacetat-Ethanol-Präzipitation.....	29
2.1.9 <i>In-situ</i> -Hybridisierung	29

2.1.10	<i>Dotblot</i> -Hybridisierung.....	30
2.2	Untersuchungen zur Protein-Expression	31
2.2.1	Immuncytochemie zur Überprüfung der Antikörperfunktionalität.....	31
	Kultivieren von HEK293T-Zellen	32
	Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen.....	33
	Immuncytochemische Färbung transfizierter HEK293T-Zellen.....	33
2.2.2	Immunhistochemische Methoden	34
	Herstellung von Gewebeschnitten.....	34
	Vorbehandlung von FFPE-Schnitten.....	36
	Gewebestrukturfärbung mit Hämatoxylin-Eosin-Methode.....	36
	Einfache Färbung mittels fluoreszierenden Sekundäntikörpern	36
	Signalverstärkende Färbung mittels monochromatischer DAB-Methode.....	37
	Signalverstärkende Färbung mittels Fluorescein-Tyramid-Methode	38
	Direkte Färbung durch Fluoreszenz-konjugierte Primäntikörper	38
	Kofärbungen und Zellkernfärbung mit DAPI	39
	Quantifizierung gefärbter Zellen	39
2.3	Tierexperimentelle Untersuchungen.....	40
2.3.1	Tiere und Haltungsbedingungen	40
2.3.2	Lickometersystem.....	40
2.3.3	Motivation der Tiere durch Futter- und Wasser-Restriktion	41
2.3.4	Gewichtsverläufe und Stressbeobachtung.....	41
2.3.5	Attraktive Stimuli	41
2.3.6	Pharmakologische Intervention	41
2.3.7	Versuchsablauf	42
2.3.8	Funktionalität des P2X ₃ -Antagonisten.....	43
2.3.9	Auswertung und Statistik	43
3	Ergebnisse	44
3.1	Fettsäuresensoren im menschlichen Geschmacksgewebe	44
3.1.1	Auswahl der Fettsensorkandidaten	44
3.1.2	mRNA-Expression von Fettsäuresensoren in humanen Wall- und Pilzpapillen.....	44
3.1.3	Protein-Expression der Fettsäuresensoren in humanem Wallpapillengewebe.....	46
3.1.4	Etablierung eines Kofärbeprotokolls zur GPR120-Zelltypcharakterisierung.....	49
3.1.5	Charakterisierung GPR120-exprimierender Zellen.....	53
3.1.6	Expression von GPR120-Spleißvarianten in humanen Geschmackspapillen.....	57
3.1.7	Charakterisierung der GPR120-Expression im Gesamtgewebe der Wallpapillen	60
3.2	Untersuchungen zum Vorkommen von lipolytischen Enzymen im menschlichen Geschmacksgewebe	63
3.2.1	Die Expression von Lipase F im Von-Ebner-Drüsengewebe.....	63

3.2.2	Die Expression der sekretorischen Lipasen K, M und N im Von-Ebner-Drüsengewebe.....	65
3.2.3	Zelluläre Lokalisation der Expression der Lipasen K, M und N	68
3.2.4	<i>In-silico</i> -Strukturanalyse der humanen Lipasen K, M und N	71
3.3	Weiterleitung der Fettsäurewahrnehmung über P2X-Rezeptoren.....	75
3.3.1	Etablierung des Kurzzeit-Präferenztests für attraktive Geschmacksstimuli.....	75
3.3.2	Wirkung des P2X ₃ -Antagonisten auf die Präferenz von Linolsäure und Saccharose	78
3.3.3	Untersuchung der Funktionalität des P2X ₃ -spezifischen Antagonisten A-31749	80
4	Diskussion.....	83
4.1	Gibt es beim Menschen einen gustatorischen Mechanismus der Fettwahrnehmung und kann es als eine Grundgeschmacksqualität definiert werden?	83
4.1.1	Das Attribut „fettig“ als eine texturabhängige Geschmackskomponente und eine mögliche Verbindung zum oral exprimierten fettsäuresensitiven Rezeptor GPR120.....	84
4.1.2	Fettsäuren als gustatorischer Stimulus und die Bedeutung lingualer Lipasen.....	86
4.1.3	Fettsäuresensitive Rezeptoren in humanen Geschmackszellen und die Übereinstimmung ihrer pharmakologischen Eigenschaften mit sensorischen Daten.	89
4.1.4	GPR120-exprimierende Zellpopulationen ermöglichen sowohl eine fettspezifische Geschmackswahrnehmung als auch eine Modulation anderer Geschmacksqualitäten.....	94
4.1.5	Die Untersuchung der neuronalen Weiterleitung von Fettgeschmacksinformationen mit dem Antagonisten A-31749 schließt vermutlich eine P2X ₃ -vermittelte, nicht jedoch eine P2X ₂ -vermittelte Weiterleitung von Geschmacksinformationen aus.....	98
4.1.6	Die gustatorische Wahrnehmung von Fettsäuren kann mit einem evolutiven und gesundheitlichen Vorteil assoziiert werden.	100
4.1.7	„Fettgeschmack“ und „fettig“ als eigenständige Geschmacksqualität?.....	101
4.2	Potenzielle alternative Funktionen des fettsäuresensitiven Rezeptors GPR120 im Geschmackssystem.....	102
4.3	Bedeutung der gustatorischen Fettwahrnehmung für die Entwicklung von Übergewicht und damit assoziierten Krankheiten.....	103
5	Zusammenfassung	105
6	Summary	107
	Literatur.....	XIII
	Anhang	XXVI
	Selbstständigkeitserklärung.....	LI
	Danksagung.....	LIII
	Publikationen.....	LV
	Lebenslauf.....	LVI

Abkürzungsverzeichnis

- / + RT	cDNA-Ansatz ohne / mit Zusatz von reverser Transkriptase
∅	Durchmesser
... x g	Angabe der Beschleunigung von Zentrifugen als das Vielfache der mittleren Erdbeschleunigung $g = 9,81 \text{ m/s}^2$
AA	engl.: arachidonic acid, Arachidonsäure
AADC	engl.: aromatic L-amino acid decarboxylase auch: DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanin)-decarboxylase, tryptophan decarboxylase, 5-hydroxytryptophan decarboxylase
Abb.	Abbildung
AF633	AlexaFluor 633 bzw. entsprechend anderen Nummern, bezeichnet Fluoreszenzfarbstoffe der Firma Molecular Probes mit entsprechender Absorptionswellenlänge in nm
AICR	American Institute for Cancer Research
ALA	engl.: α -linolenic acid, α -Linolensäure
ASIC3	engl.: Asic Sensing Ion Channel 3
AT ₁ R	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, chromogenes Substrat des Enzyms alkalische Phosphatase
bp	engl.: base pair, Basenpaare
BP	Blockierpeptid
Bsp.	Beispiel
bspw.	beispielsweise
CD36	engl.: cluster of differentiation 36, auch: FAT (engl.: fatty acid transporter), Thrombospondinrezeptor
cDNA	engl.: complementary DNA, komplementäre DNA
Con A	Concanavalin A; ein Lektin, bindet an glycosidische Gruppen, Zellmembranmarker
Corp.	engl.: Corporation, Unternehmen
cRNA	engl.: complementary RNA, komplementäre RNA
CV / hCV	circumvallate Papille / humane circumvallate Papille; zu dt. Wallpapille, in dieser Arbeit aus dem engl. bzw. lat. abgeleitet von circumvallate papillae bzw. papillae circumvallatae
DAB	3,3'-Diaminobenzidin, Farbsubstrat für Peroxidasen, bildet einen dunkelbraunen Farbstoff
D-A-CH	Zusammenschluss der deutschen (D), österreichischen (A, engl.: Austria) und schweizerischen (CH, lat.: Confoederatio Helvetica) Länder, hier im Speziellen deren Ernährungsgesellschaften
DAKO	Eindeckmedium der Firma DAKO für fluoreszenzgefärbte Schnitte
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol, Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung von DNA (Kernfärbung), Absorptionsmaxima 358 nm, Emissionsmaxima 461 nm
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes, filtriertes Wasser
DEPC / DEPC-H ₂ O	Diethylpyrocarbonat / DEPC-behandeltes Wasser, zur Inaktivierung von RNasen
DFAL	Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.
DHA	engl.: docosahexaenoic acid; Docosahexaensäure
DMEM	engl.: Dulbecco's Modified Eagle Medium ein standardisiertes Nährmedium für die eukaryotische Zellkultur

DMSO	Dimethylsulfoxid; organisches Lösungsmittel für die Kryokonservierung von lebenden Zellen
DNA	engl.: Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-Gemisch aus Adenin-, Guanin-, Cytosin- und Thymin-diphosphat
DPX	Eindeckmedium (Sigma-Aldrich) für entwässerte chromogen gefärbte Schnitte
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Komplexbildner für zweiwertige Kationen
EPA	engl.: Eicosapentaenoic acid, Eicosapentaensäure
EtBr	Ethidiumbromid, Fluoreszenzfarbstoff, interkaliert in Nukleinsäuren
EtOH	Ethanol
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet (Gewebeschnitttechnik)
FFS	freie (ungebundene) Fettsäuren
for / F	engl.: forward, vorwärts, im Zusammenhang mit vorwärts-gerichteten Primern
FPR ₁	Formylpeptid-Rezeptor 1
FS	Fettsäure(n)
G418	Geneticin, ein Antibiotikum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GIT	Gastrointestinaltrakt
GLAST	engl.: glutamate aspartate transporter, auch: SLC1A3 (engl.: solute carrier family 1 member 3), EAAT1 (engl.: excitatory amino acid transporter 1)
GMP	Guanosinmonophosphat
GPCR	engl.: G protein-coupled receptor; G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GPR120	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 120, auch: free fatty acid receptor 4 (FFAR4)
GPR40	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 40, auch: free fatty acid receptor 1 (FFAR1)
GPR41	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 41, auch: free fatty acid receptor 3 (FFAR3)
GPR43	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 43, auch: free fatty acid receptor 2 (FFAR2)
GPR84	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 84
HDL	engl.: high density lipoprotein; Lipoproteine hoher Dichte
HSV	Herpes Simplex Virus; in dieser Arbeit in Zusammenhang zur Markierung von Proteinen als exprimierter Sequenzanhang (engl.: expressed sequence tag)
i.p.	intraperitoneal, Applikation in die Bauchhöhle
ICC	Immunzytochemie
IHC	Immunhistochemie
IMP	Inosinmonophosphat
IP ₃ R3	engl.: inositol trisphosphate receptor type 3
ISH	<i>In-situ</i> -Hybridisierung
KCNA5	engl.: voltage-gated potassium channel, shaker-related subfamily, member 5, auch: Kv1.5
KG	Körpergewicht
KH	Kohlenhydrate
KHK	koronare Herzkrankheit
ko	engl.: knock-out, das gezielte Abschalten eines Gens durch transgene Methoden
LA	engl.: linoleic acid
LCFA	engl.: long chain fatty acid, langkettige Fettsäure(n)
LDL	engl.: low density lipoprotein, Lipoproteine geringer Dichte
LipK / LIPK	Lipase K bzw. entsprechend auch Lipase M, Lipase F oder Lipase N
M	Molar, Mol pro Liter
MCF	engl.: medium chain fatty acid, mittelkettige Fettsäure(n)

MeOH	Methanol
MKS	Multiple Klonierungsstelle
mM	Millimolar
mRNA	engl.: messenger ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsäure
MUFA	engl.: monounsaturated fatty acid; einfach ungesättigte Fettsäure(n)
NaAc	Natriumacetat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid; Redoxfarbstoff in Kombination mit BCIP, ein Substrat des Enzyms alkalische Phosphatase
NCAM	engl.: neural cell adhesion molecule, auch: CD56 (engl.: cluster of differentiation 56)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NTPDasell	engl.: nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 auch: ENTPD2 (engl.: ecto- NTPDasell), CD39L1 (engl.: cluster of differentiation 39 antigen like 1)
OT	Objekträger
PBS	engl.: phosphate-buffered saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	engl.: polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	pH-Wert
PIPES	engl. Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid), Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PKD2L1	engl.: polycystic kidney disease 2-like protein 1, auch: TRPP3 (engl.: transient receptor potential polycystic 3)
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLCβ2	engl.: phospholipase C isotype β variant 2
PTH ₁ R	Parathyroidhormon-1-Rezeptor
PUFA	engl.: polyunsaturated fatty acid, mehrfach ungesättigte Fettsäure(n)
rcf	engl.: relative centrifugal force, relative Zentrifugalkraft
rev / R	engl.: reverse, rückwärts, im Zusammenhang mit rückwärts-gerichteten Primern
RNA	Ribonukleinsäure
ROMK	engl.: renal outer medullary potassium channel, auch: KCNJ1 (engl.: potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 1)
rpm	engl.: rounds per minute; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAP	engl./deu.: shrimp alkalische Phosphatase
SCFA	engl.: short chain fatty acid, kurzkettige Fettsäure(n)
SDS	engl.: sodium dodecylsulfate, Natriumlaurylsulfat
SFA	engl.: saturated fatty acid, gesättigte Fettsäure(n)
SNAP-25	engl.: synaptosomal-associated protein 25
SOC-Medium	engl.: Super Optimal broth with Catabolite repression, Nährmedium für Bakterienkulturen mit Glucose
SST	eine nicht-exprimierte DNA-Sequenz als Anhang zur Markierung von DNA (engl.: signature sequence tag)
T _A	(Oligonukleotid-) Anlagerungstemperatur
Tab.	Tabelle
TAS1R	engl.: taste receptor family 1, G-Protein-gekoppelte Geschmacksrezeptoren der Familie 1, vermitteln den Süß- und Umami-Geschmack
TAS2R	engl.: taste receptor family 2; G-Protein-gekoppelte Geschmacksrezeptoren der Familie 2; vermitteln den Bittergeschmack
TBS	engl.: Tris-buffered saline, Tris-gepufferte Salzlösung

T _E	Elongations-Temperatur
TNB	Blockierreagenz aus den Färbekits der Firma Vector Laboratories
TNT	Tris-Natriumchlorid-Tween-Puffer
tRNA	engl.: transfer ribonucleic acid, Transfer-Ribonukleinsäure
TRPC	engl.: Transient Receptor Potential Channel type C (classical/canonical – klassischer TRP-Kanal))
TRPM	engl.: Transient Receptor Potential Channel type M (Melastatinrezeptor)
TRPM5	engl.: transient receptor potential cation channel subfamily M member 5
TRPV	engl.: Transient Receptor Potential Channel type V (Vannilloidrezeptor)
U/ml	engl.: units per milliliter, Einheiten pro Milliliter, Maß für die Enzymaktivität
UFA	engl.: unsaturated fatty acid, ungesättigte Fettsäure(n)
usw.	und so weiter
v/v	engl.: volume per volume, Volumen je Volumen
VED	Von-Ebner-Drüsengewebe
Vgl.	Vergleich
vglw.	vergleichsweise
w/v	engl.: weight per volume, Gewicht je Volumen
WCRF	World Cancer Research Fund
WHO	World Health Organisation
z. B.	zum Beispiel
μM	Mikromolar

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Anatomie des Geschmackssystems des Menschen.....	3
Abb. 2: Signaltransduktion in Typ-II-Geschmackszellen.	9
Abb. 3: Zellkommunikation und Signalweiterleitung zwischen verschiedenen Geschmackszelltypen.	10
Abb. 4: Neuronale Weiterleitung von Geschmackssignalen bei Maus (A) und Mensch (B).	11
Abb. 5: Große Speicheldrüsen und Von-Ebner-Drüsengewebe des Menschen.....	12
Abb. 6: RNA-Extrakt einer humanen Wallpapille.....	23
Abb. 7: Schematische Darstellung der verschiedenen immunologischen Nachweismethoden.	32
Abb. 8: Herstellung und Charakterisierung humaner Wallpapillen-Gefrierschnitte.....	35
Abb. 9: Auswertung der Kofärbungen mit Hilfe von Photoshop.	39
Abb. 10: Lickometer-messsystem.	40
Abb. 11 Ablauf eines Versuchstages im 16 h und 22 h Protokoll.	42
Abb. 12: mRNA-Expression der Fettsensorkandidaten in humanen Wall- und Pilzpapillen.	47
Abb. 13: Antikörperscreening der Fettsensorkandidaten	51
Abb. 14: Optimierung der GPR120-Proteinfärbung.....	52
Abb. 15: Färbung mit ausreichend sensitiven Antikörpern humaner Geschmackszelltypmarker und Geschmacksrezeptoren. 55	
Abb. 16: Morphologie der GPR120-Zellen im Vergleich zu Typ-I- und Typ-II/III-Zellen.	56
Abb. 17: Immunhistochemische Kofärbung des GPR120-Proteins mit Markerproteinen verschiedener Geschmackszelltypen.....	58
Abb. 18: Quantifizierung von GPR120- und Zelltypmarker-exprimierenden Zellen.	59
Abb. 19: Expression der GPR120-mRNA-Varianten in humanem Zungengewebe und Kolon.	61
Abb. 20: GPR120-Proteinexpression in der Wallpapille.....	62
Abb. 21: Genexpression der Lipase F in humanen Wallpapillen verschiedener Probanden	64
Abb. 22: Phylogenetischer Stammbaum und schematische Struktur der humanen Lipasen F, K, M und N..	65
Abb. 23: Genexpression der Lipasen K, M und N in humanen Wallpapillen und Geschmackszell-freiem Gewebe.	66
Abb. 24: Aminosäuresequenzvergleich der Lipase-N-Varianten mit Lipase N und lysosomaler Lipase (LIPA)	67
Abb. 25: Aufbau der zur Sondengenerierung genutzten Plasmide.....	68
Abb. 26: Überprüfung der Hybridisierungseffizienz der RNA-Sonden über eine <i>Dot blot</i> -Hybridisierung.	69
Abb. 27: <i>In-situ</i> -Hybridisierung einer humanen Wallpapille und VED-Gewebe mit Lipase-RNA-Sonden.....	70
Abb. 28: Genexpression sekretorischer Lipasen in epithelialen Keratinozyten.....	70
Abb. 29: Genexpression sekretorischer Lipasen im Von-Ebner-Drüsengewebe.....	71
Abb. 30: Färbungen im Geschmacksepithel nach <i>In-situ</i> -Hybridisierung mit RNA-Sonden der sekretorischen Lipasen. 10. 72	
Abb. 31: Aminosäuresequenzvergleich der humanen Lipasen K, M, N und F.	73
Abb. 32: Tertiärstruktur der Lipasen.	74
Abb. 33: Vergleich des 16-h- und 22-h-Restriktionsprotokolls im Kurzzeitpräferenztest.....	77
Abb. 34: Präferenz von Saccharose und Linolsäure innerhalb der Kontroll- und Interventionsgruppen	79
Abb. 35: Wirkung des P2X ₃ -Antagonisten auf die Präferenz gegenüber Saccharose und Linolsäure.....	79
Abb. 36: Überprüfung des Einflusses von Konzentration und Inkubationszeit des P2X ₃ -Antagonisten	81
Abb. 37: Wirkung des P2X ₃ -Antagonisten auf die Wahrnehmung von 3 mM Denatoniumbenzoat.	82
Abb. 38: Chemische Detektion von Nahrungsbestandteilen in Geschmackszellen und in enteroendokrinen Darmzellen... 90	
Abb. 39 Geschmackspräferenz von P2X ₂ /P2X ₃ -Einzel- und Doppelknockout-Tieren gegenüber Saccharose und Denatonium .99	
Abb. 40: Kriterien für die Geschmackswahrnehmung und Zusammenfassung der Datenlage für die humane Fettgeschmackswahrnehmung. ..102	
Abb. 41: Nukleinsäure-Größenstandards	XXXVII
Abb. 42: Immunzytochemische Kontrollfärbungen an HEK293T-GαGust44-Zellen.	XLII
Abb. 43: Kontrolle auf unspezifische Färbung durch die verwendeten Sekundäntikörper in immunhistochemischen Untersuchungen.	XLII
Abb. 44: Sequenzierter Bereich des Lipase-K- <i>pBluescript</i> -Vektorkonstruktes zur Herstellung der RNA-Sonden.	XLIII
Abb. 45: Sequenzierter Bereich des Lipase-M- <i>pBluescript</i> -Vektorkonstruktes zur Herstellung der RNA-Sonden.....	XLIII
Abb. 46: Sequenzierter Bereich des Lipase-N- <i>pBluescript</i> -Vektorkonstruktes zur Herstellung der RNA-Sonden.....	XLIV
Abb. 47: RNA-Sonden der Lipasen für die <i>in-situ</i> -Hybridisierung.	XLIV
Abb. 48: Analyse auf potentielle Transmembrandomänen der Lipasen.	XLV
Abb. 49: Analyse der Lipasen auf Signalpeptidschnittstellen.	XLVI
Abb. 50: mRNA-Sequenzvergleich der Lipase-N-Varianten.	XLIX

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Wichtige Fettsäuren in der Ernährung des Menschen.....	14
Tab. 2: Fettsäureanteile in Fetten verschiedener Nahrungsmittelgruppen.	15
Tab. 3: Gesamtversuchsablauf mit 22h Restriktionsprotokoll je Gruppe (I bzw. II)	43
Tab. 4: Agonistenspektrum, Vorkommen und Funktion der ausgewählten Rezeptorkandidaten	45
Tab. 5: Vergleich der etablierten Kofärbeprotokolle der GPR120-Antikörper A2003 und A2004 (MBL).	54
Tab. 6: : Agonistenspektrum und EC_{50} bzw. IC_{50} -Werte* der untersuchten Fettsäuresensoren im Vergleich zur sensorischen Wahrnehmung	93
Tab. 7: Korrigierte Auszählung der Kofärbungen von GPR120 und Zelltypmarkern.....	96
Tab. 8: Fett- und Fettsäuregehalt ausgewählter Nahrungsmittel.*	XXVII
Tab. 9: Chemikalien	XXVIII
Tab. 10: Kits	XXXIII
Tab. 11: Antikörper Fettsäuresensoren	XXXIII
Tab. 12: Antikörper Geschmacksrezeptoren	XXXIV
Tab. 13: Antikörper Typ-I-Zellmarker.....	XXXIV
Tab. 14: Antikörper Typ-II-Zellmarker.....	XXXIV
Tab. 15: Antikörper Typ-III-Zellmarker.....	XXXV
Tab. 16: Antikörper Sonstige Marker	XXXV
Tab. 17: Sekundäre Antikörper	XXXV
Tab. 18: Analytische Primer	XXXVI
Tab. 19: Sequenzierungsprimer	XXXVII
Tab. 20: Sonden für die <i>In-situ-Hybridisierung</i>	XXXVII
Tab. 21: Nukleinsäure-Größenstandards	XXXVII
Tab. 22: Plasmide.....	XXXVIII
Tab. 23: Enzyme.....	XXXVIII
Tab. 24: Materialien für die Kultivierung eukaryotischer Zelllinien	XXXIX
Tab. 25: Bakterienstämme und Selektionsantibiotika	XXXIX
Tab. 26: Materialien für Haltung und Experimente mit Versuchstieren	XL
Tab. 27: Software.....	XL
Tab. 28: Geräte	XLI
Tab. 29: Potentielle Positionen postrationaler Modifikationen der Lipasen.....	XLVIII
Tab. 30: Parameter der Vorhersage zur Tertiärstruktur der Lipasen.....	XLIX

1 Einleitung

Adipositas wird als einer der Hauptrisikofaktoren für Diabetes, kardiovaskuläre Krankheiten, neurodegenerative Störungen und Krebs angesehen (Bray et al. 2004, Hariri and Thibault 2010). Im Jahr 2008 zählte man weltweit über 500 Millionen Fettleibige, wobei die Prävalenz noch heute stetig zunimmt (WHO 2014). Übergewicht wird durch ein Ungleichgewicht zwischen Energieaufnahme und -verbrauch verursacht, wobei die Energieaufnahme durch Nahrungsfette als einer der Hauptfaktoren der Körpergewichtszunahme angesehen wird (Bray and Popkin 1998, Hill et al. 2000). Humanstudien haben gezeigt, dass eine Diät mit hohem Fettgehalt (>30% der Energie aus Fett) schnell zu einem Energieüberschuss und damit zu Fettleibigkeit führen kann (Hariri and Thibault 2010). Dies führte zu einem weltweiten Bestreben, die Menge an Fett in der Ernährung des Menschen zu verringern. In den Industrieländern neigen dementsprechend Menschen, die wegen eines Gewichtsanstiegs oder ihres Übergewichts besorgt sind, dazu, ihre Fettaufnahme mit Hilfe von Produkten zu begrenzen, die wenig Fett enthalten. Diese Rahmenbedingungen haben jahrzehntelang die Entwicklung von fettreduzierten Nahrungsmitteln gefördert. Dennoch wurde trotz des hohen Verbraucherinteresses an gesunder Ernährung und einem gedeihenden Markt für Low-Fat-Produkte keine angemessene Verringerung des Übergewichts erreicht (Astrup 1998, Wyatt et al. 2006). Obwohl mehr als 30 % der Konsumenten zustimmen, dass sich fettreduzierte Produkte hinsichtlich ihrer Textur und ihres Aussehens verbessert haben, geben die meisten jedoch auch an, dass diese Produkte noch immer nicht die Schmackhaftigkeit ihrer nicht fettreduzierten Originale erreichen (Krammer 2012). Diese Produkte bringen nicht das von Konsumenten gesuchte, optimale sensorische Erlebnis hervor und verlangen neue Strategien, um die Erwartungen der Verbraucher zu erfüllen (Tepper 2012, Tucker and Mattes 2012). Fettersatz- und -austauschstoffe werden genutzt, um Eigenschaften zu imitieren, die ein Nahrungsmittel durch seinen Gehalt an Fetten erhält und welche die hohe Attraktivität von fettreichen Lebensmitteln ausmachen. Traditionellerweise gehörten dazu bisher visuelle, auditive, textuelle und olfaktorische Attribute von Fetten (Mattes 2009c). Allerdings beginnen Hinweise aus molekular- und verhaltensbiologischer Forschung diese traditionelle Sichtweise durch das Konzept der gustatorischen Wahrnehmung von Fetten zu ergänzen (Fushiki and Kawai 2005, Laugerette et al. 2007, Mizushige et al. 2007, Mattes 2009c). Es stellte sich aufgrund von Befunden aus Nagetierstudien die Frage, ob Fettbestandteile selbst einen „fetti-gen“ Geschmack auslösen anstatt, wie bisher angenommen, nur ein Aromaträger zu sein. Träfe dies auch für die humane Fettwahrnehmung zu, würde das Verständnis der Mechanismen der oralen Fettwahrnehmung nicht nur wichtige Informationen für die Weiterentwicklung von schmackhaften fettreduzierten Nahrungsmitteln bieten, sondern mehr noch, das Wissen um die Regulation der Aufnahme dieses energiereichen Makronährstoffs erweitern. Aufgrund der begrenzten Datenlage für den Menschen sind die Mechanismen der gustatorischen Fettwahrnehmung Thema der vorliegenden Arbeit. Einleitend sollen daher zunächst die Grundlagen zur Geschmackswahrnehmung erläutert werden (Kap. 1.1). Hiernach erfolgt eine Übersicht zu Einteilung, Vorkommen und Bedeutung von Nahrungsfetten (Kap. 1.2). Abschließend wird die Datenlage zur oralen Wahrnehmung von Fetten, wie sie zu Beginn dieser Arbeit vorlag, aufgezeigt (Kap. 1.3) und die Zielstellung dieser Arbeit formuliert (Kap. 1.4).

1.1 Das Geschmackssystem

Tagtäglich wählen wir unter verschiedenen Nahrungsmitteln aus und nehmen Hunderte von Nahrungsinhaltsstoffen zu uns. Dabei wird die Nahrung schon bei der Aufnahme hinsichtlich ihrer verwertbaren Energie, dem Gehalt an Nährstoffen oder ihrer Toxizität bewertet. Dieser Vorgang wird maßgeblich durch unsere Sinnessysteme beeinflusst. Hierbei entsteht ein spezifischer Gesamtsin-

neseindruck (*engl. Flavour*)¹, bestehend aus Geschmacks-, Geruchs-, Tast- und Temperaturinformationen. Im weiter gefassten Sinn gehört auch die visuelle und akustische Wahrnehmung eines Lebensmittels zum Gesamtsinnesindruck hinzu (Okamoto and Dan 2013, Spence 2013).

Diese Arbeit befasst sich im speziellen mit dem Geschmackssinn, der gemeinsam mit dem Geruchssinn zur chemischen Sinneswahrnehmung gehört. Hierbei stehen diese beiden Sinne bei der Beurteilung des „Geschmackseindrucks“ eines Nahrungsmittels in engem Zusammenhang. So wird der Geschmackseindruck zu 80 % durch Geruchsaromen mitbestimmt (Spence 2013). Während der Geruchssinn als chemischer Fernsinn klassifiziert wird, handelt es sich beim Geschmack um den chemischen Nahsinn (Kurihara et al. 1986, Kurihara 1990). Dabei müssen chemische Substanzen in die Mundhöhle aufgenommen werden, um dort mit entsprechenden Geschmacksrezeptoren zu interagieren, welche durch ihre Aktivierung intrazelluläre Signale auslösen, die über spezifische Geschmacksbahnen zur Verarbeitung ins Gehirn weitergeleitet werden. Die Aufnahme von Nahrung wird durch ihre Attraktivität und damit der Ausbildung von Präferenzen für oder Aversionen gegen bestimmte Substanzen geregelt. Diese Fähigkeit ist uns von Geburt an gegeben, wird jedoch durch Sozialisation und Erfahrung im Laufe des Lebens kontinuierlich geformt (Lindemann 1996, Meyerhof and Richter 2006, Hübner et al. 2013).

Es existieren fünf Grundgeschmacksqualitäten. Zu ihnen zählen die seit langem bekannten Qualitäten süß, bitter, sauer, salzig und das zuletzt beschriebene umami (*jap.: „wohlschmeckend“*, erstmalig 1909 beschrieben durch den Japaner Kikunae Ikeda)(Chaudhari and Roper 2010, Galindo et al. 2012, Liman et al. 2014). Das Wissen um die Komplexität des Geschmackssinns und die Funktion von Geschmacksrezeptoren steigt im Rahmen der aktuellen Forschung stetig. Weitere Geschmacksqualitäten, so z.B. der Geschmack von Kohlensäure, Calcium und Wasser, oder auch ein metallischer bzw. fettiger Geschmack werden diskutiert (Inoshita and Tanimura 2006, Fischler et al. 2007, Chandrashekar et al. 2009, Chaudhari and Roper 2010). Auch finden sich die oben erwähnten Geschmacksrezeptoren außerhalb des Geschmackssystems mit teilweise noch ungeklärter Funktion, so beispielsweise im Darm, Hoden, Pankreas, Thymus, Herz und dem Atemwegsepithel (Behrens and Meyerhof 2010, Behrens and Meyerhof 2011b, Yamamoto and Ishimaru 2013).

Dieses Kapitel gibt einen Überblick über die Anatomie des Geschmackssystems (Kap. 1.1.1), die Geschmacksqualitäten (Kap. 1.1.2 und 1.1.3), ihrer zelluläre und neuronale Verarbeitung (Kap. 1.1.4), sowie die Beeinflussung des Geschmacks durch Speichelsekrete (Kap. 1.1.5).

1.1.1 Anatomie des Geschmackssystems

Die Wahrnehmung von Geschmacksstoffen wird von Geschmackssinneszellen vermittelt, die sich in nahezu allen Wirbeltieren in Geschmacksknospen befinden (Abb. 1)(Northcutt 2004). Dabei handelt es sich um zwiebelartige Strukturen in den Epithelien des Mund- und Rachenraumes. Geschmackszellen zählen zu den sekundären Sinneszellen. Dies bedeutet, sie bilden selbst keine Axone aus. Einige der Zellen formen Synapsen mit afferenten Nervenfasern. Andere wiederum sind gliaähnliche Zellen und einige haben unterstützende bzw. regenerative Funktionen. Die Lebensdauer von Geschmackszellen beträgt durchschnittlich etwa 8-12 Tage, wobei die Halbwertszeit je nach Zelltyp stark variiert (bis zu 22 Tage). Dadurch gehören sie zu den sich häufig regenerierenden Zellarten, wie z.B. Darmzellen (Beidler and Smallman 1965, Perea-Martinez et al. 2013).

Der größte Teil der Geschmacksknospen (75 %) befindet sich auf der Zunge in sogenannten Geschmackspapillen, jedoch finden sie sich auch im Epithel des Kehldeckels, des weichen Gaumens,

¹ Es soll an dieser Stelle „*Flavour*“, im Deutschen oft als *Aroma* bezeichnet, als der Gesamtsinnesindruck oder „Geschmackseindruck“ definiert sein, welcher ein multimodaler Sinnesindruck ist und sich hauptsächlich aus Geschmack und Geruch, aber auch aus Tast- und Temperatureindrücken zusammensetzt (Okamoto and Dan 2013). Im umgangssprachlichen oft fälschlicherweise gleichgesetzt mit dem Geschmack an sich, einer unimodalen Sinneswahrnehmung, die nur über das Geschmackssinnessystem detektiert wird.

des Nasen-Rachenraumes und der oberen Speiseröhre. Bei Fischen sind ähnliche Sinneszellen auch auf der Körperoberfläche zu finden (Lalonde and Eglitis 1961, Miller 1986, Roper 2013).

Man unterscheidet vier Papillentypen, die in ihrer Menge und Anzahl an Geschmacksknospen je nach Spezies variieren (Cheng and Robinson 1991, Chandrashekar et al. 2006, Reiner et al. 2008, Galindo et al. 2012). Die etwa 100-300 Pilzpapillen (*lat.: papillae fungiformes*) finden sich gleichmäßig verteilt auf den vorderen zwei Dritteln der Zunge von Maus bzw. Mensch und enthalten eine (Maus) bis durchschnittlich drei (Mensch) Geschmacksknospen. Im hinteren Drittel der Zunge finden sich beim Menschen etwa 4-18 Wallpapillen (*lat.: papillae circumvallatae*) mit tausenden Geschmacksknospen, hingegen bei der Maus und der Ratte nur eine Wallpapille mit einigen hundert Geschmacksknospen. Ebenfalls im hinteren Drittel, jedoch am Rand der Zunge finden sich die Blätterpapillen (*lat.: papillae foliatae*) mit mehreren Dutzend (Maus) bis mehreren hundert (Mensch) Knospen. Schließlich finden sich über den gesamten Zungenrücken verteilt Fadenpapillen (*lat.: papillae filiformes*), die jedoch keine Geschmackszellen enthalten, sondern vielmehr, von keratinisierten Epithelzellen umhüllt, für die Tastwahrnehmung verantwortlich sind.

Innerhalb einer Geschmacksknospe finden sich etwa 50-150 Geschmackszellen (Lindemann 1996, Lindemann 2001). Diese Zellen sind, wie erwähnt, nicht einheitlich, sondern vielmehr eine Zusammenstellung verschiedener Zelltypen, die sich anhand von morphologische Eigenschaften (Kern- und Gesamtform, apikale Struktur, cytoplasmatische Organellen) und ihrer zelltypspezifischen Proteine unterscheiden. Die bisher gebräuchlichste, auf morphologischen Eigenschaften begründete Aufteilung der Zellen umfasst vier Gruppen: Typ I (gliaähnliche Zellen), Typ II (Rezeptorzellen), Typ III (präsynaptische Zellen) und die Typ-IV- oder Basalzellen (vgl. Abb. 3) (Murray 1993, Lindemann 1996).

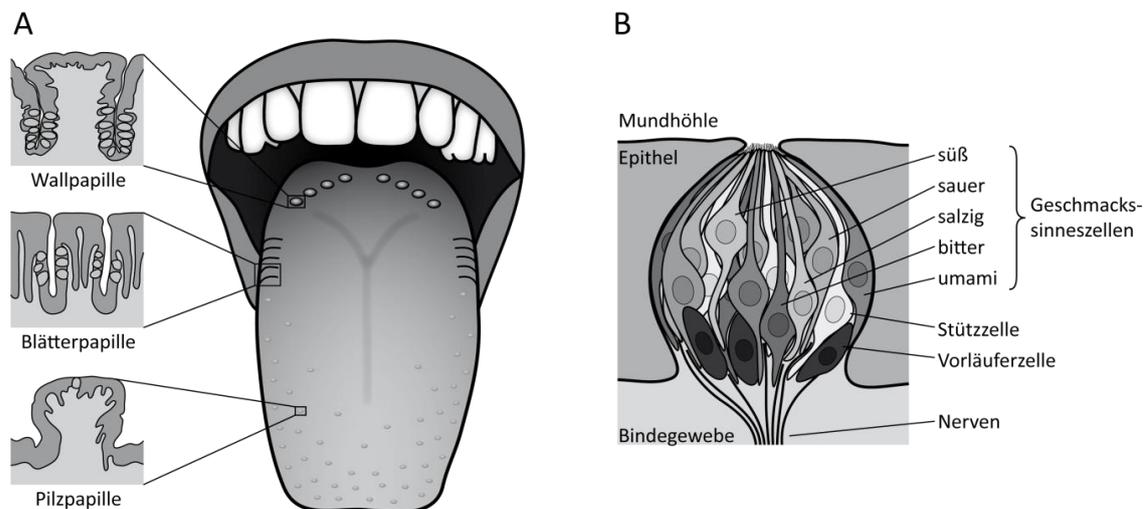


Abb. 1: Anatomie des Geschmackssystems des Menschen. (A) Auf der Zungenoberfläche befinden sich drei verschiedene Papillenarten. Die Wallpapillen liegen im hinteren Teil der Zunge, die Blätterpapillen an den hinteren Seiten und die Pilzpapillen sind über die vordere Hälfte der Zunge verteilt. (B) Jede dieser Papillen trägt eine Vielzahl von Geschmacksknospen, den eigentlichen sensorischen Geschmacksorganen. Innerhalb der Knospen wiederum sind verschiedene Arten von Geschmackssinneszellen zusammengefasst, die jeweils unterschiedliche Funktionen erfüllen. Über die ableitenden Nervenbahnen wird die Geschmacksinformation zur weiteren Verarbeitung an das Gehirn weitergeleitet. Abbildung abgewandelt aus (Behrens et al. 2013).

Typ-I-Zellen

Typ-I-Zellen lassen sich anhand ihres ovalen Kerns und ihres dunklen Zytoplasmas erkennen und machen den größten Teil der Geschmackszellen aus (Murray 1993). Sie erscheinen nicht spindelförmig wie die anderen Zelltypen, sondern formen vielmehr lamellenartige Ausläufer, mit denen sie sich um die anderen Zellen der Geschmacksknospe legen. Daher lassen sie sich in immunhistochemischen Färbun-

gen nur schwer von diesen unterscheiden. Es wird vermutet, dass sie so, im Rahmen ihrer gliaähnlichen Aufgaben, die Diffusion von Neurotransmittern und Veränderungen der Ionenkonzentration lokal begrenzen (Pumplin et al. 1997, Roper 2013). Sie nehmen Neurotransmitter wie Glutamat auf und bauen ATP ab. Hierfür exprimieren sie u.a. den Glutamat-Aspartat-Transporter (GLAST) und die membrangebundene NTPDase2 (Nukleosidtriphosphat-Diphosphohydrolase 2), welche extrazellulär vorkommendes ATP hydrolysiert (Lawton et al. 2000, Bartel et al. 2006). Weiterhin weisen sie eine Expression des Kaliumkanals ROMK (*engl.: renal outer medullary potassium channel*) auf, der der Regulation des intrazellulären Kaliumhaushalts dient (Dvoryanchikov et al. 2009). Typ-I-Zellen reagieren nach Aktivierung nicht mit einem spannungsabhängigen Ca^{2+} -Anstieg und formen keine Synapsen (Roper 2007).

Typ-II-Zellen

Im Gegensatz zu Typ-I-Zellen, sind Typ-II-Zellen lange spindelförmige Zellen mit einem großen runden Zellkern (Pumplin et al. 1997). Diese Geschmacksrezeptorzellen exprimieren eine Vielzahl von G-Protein-gekoppelten Geschmacksrezeptoren für den Süß-, Umami- und Bittergeschmack an ihrer Zellmembran (Clapp et al. 2004, DeFazio et al. 2006, Yarmolinsky et al. 2009). Daher sind sie auch durch die Expression der Proteine der geschmacksvermittelnden Signaltransduktionskaskade gekennzeichnet. Hierzu zählen bspw. das $\text{G}\alpha$ -Protein Gustducin, die Phospholipase C $\beta 2$ (PLC $\beta 2$), der Inositoltriphosphatrezeptor (IP $_3$ R3) und der Kationenkanal TRPM5 (Takami et al. 1994, Boughter et al. 1997, Clapp et al. 2001, Perez et al. 2002, Clapp et al. 2004, Hacker et al. 2008). Jede Typ-II-Zelle enthält nur Rezeptoren einer Geschmacksrichtung und besitzt damit die Grundvoraussetzung für die Eigenständigkeit einer Geschmacksqualität (Zhang et al. 2003, Zhao et al. 2003, Mattes 2011a). Weiterhin besitzen diese Zellen spannungsabhängige Natrium- und Kaliumkanäle zur Generierung von Aktionspotentialen und CALHM1 Kanäle zur Freisetzung von ATP, sowie weitere Hemikanäle (Pannexine, Connexine) (Medler et al. 2003, Huang et al. 2007, Romanov et al. 2007, Hellekant et al. 2015, Vandenbeuch et al. 2015).

Typ-III-Zellen

Präsynaptische Typ-III-Zellen haben eine langgestreckte schmale Form, einen ovalen Zellkern, an ihrer apikalen Seite einen einzelnen Mikrovillus und formen Synapsen mit afferenten Nervenfasern (Roper 2007, Vandenbeuch et al. 2010). Sie exprimieren spezifisch das mit dem Sauergeschmack assoziierte PKD2L1-Protein (*engl.: polycystic kidney disease 2-like 1*) (LopezJimenez et al. 2006). Eine genetische Ablation der Typ-III-Zellen führt zum spezifischen Verlust des Sauergeschmacks (Huang et al. 2006, Huang et al. 2008a). Außerdem reagieren diese Zellen auf kohlen säurehaltige Lösungen (Chandrashekar et al. 2009). In Übereinstimmung mit ihrer Funktion als präsynaptische Zellen exprimieren Typ-III-Zellen Proteine wie SNAP-25 (Synaptosomen-assoziiertes Protein 25), AADC (Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase, NCAM (*engl.: neural cell adhesion molecule*), sowie spannungsabhängige Natrium- und Kaliumkanäle um Aktionspotentiale zu generieren (Nelson and Finger 1993, Yang et al. 2000, DeFazio et al. 2006, Huang et al. 2006, Gao et al. 2009, Vandenbeuch and Kinnamon 2009). In Typ-III-Zellen identifizierte Neurotransmitter umfassen Serotonin (5-HT), γ -Aminobuttersäure (GABA) und Noradrenalin (Huang et al. 2005b, Huang et al. 2008b, Dvoryanchikov et al. 2011). Außerdem weisen Typ-III-Zellen eine Expression von spannungsabhängigen Calciumkanälen auf, welche für die Vesikelfusion am synaptischen Spalt unerlässlich sind (DeFazio et al. 2006).

Typ-IV- oder Basalzellen

Typ-IV-Zellen oder Basalzellen sind undifferenzierte, nicht-polarisierte Zellen, die an der basalen Seite der Geschmacksknospe liegen und keinen Kontakt zur Mundhöhle haben. Sie haben die Aufgabe, die Erneuerung der schnell absterbenden Geschmackszellen zu gewährleisten, indem sie sich zu den zuvor beschriebenen spezifischen Zelltypen differenzieren (Beidler and Smallman 1965). Die Geschmackszel-

Entwicklung unterliegt dabei der Kontrolle verschiedener Transkriptionsfaktoren und Signalmolekülen (Matsumoto et al. 2011, Kapsimali and Barlow 2013). Dennoch ist ihre Funktion, Herkunft und ihr Entwicklungsweg nicht unumstritten (Perea-Martinez et al. 2013).

1.1.2 Die Definition einer Geschmacksqualität

Die Geschmackswahrnehmung ist essentiell für die Beurteilung des Nährwertes und der Toxizität der Nahrung noch vor deren Aufnahme und Absorption im Gastrointestinaltrakt (GIT). Es existieren fünf grundlegende Geschmacksqualitäten (süß, sauer, salzig, umami und bitter), wobei das Vorkommen weiterer Geschmacksqualitäten diskutiert wird und auch Thema dieser Arbeit ist.

Was zeichnet jedoch eine Geschmacksqualität aus? Welche Kriterien definieren eine primäre Geschmacksqualität? Hierbei gibt es keine allgemein festgelegten und akzeptierten Kriterien, jedoch werden in der Literatur einige Aspekte vorgeschlagen und diskutiert (Tucker and Mattes 2012). Einige dieser Kriterien werden bislang noch nicht von allen Grundgeschmacksqualitäten erfüllt bzw. konnten noch nicht nachgewiesen werden, daher mögen einige der Kriterien nicht essentiell sein. Tucker und Mattes haben dazu folgende Eigenschaften zusammengefasst:

(1) Die Wahrnehmung einer Geschmacksqualität muss einer bestimmten Funktion dienen, da es andernfalls nicht nötig wäre, das System zur Erkennung und Verarbeitung dieser Qualität während der Evolution zu erhalten. So wird spekuliert, dass die Geschmackswahrnehmung der fünf Grundqualitäten genutzt wird, um den Kaloriengehalt (süß, umami), ein adäquates Elektrolytangebot (salzig) sowie potentielle Gefahren aufgrund von verdorbener/unreifer bzw. giftiger Nahrung (sauer, bitter) zu beurteilen, um sich so einen evolutionären Vorteil zu verschaffen (Mattes 2011a).

(2) Weiterhin muss die Wahrnehmung einer Geschmacksqualität auf einen speziellen Stimulus bzw. eine Gruppe effektiver Stimuli zurückzuführen sein, welche über eine je nach Qualität spezifische Struktur-Funktionsbeziehung Geschmackssensoren aktivieren. So sind für die einzelnen Geschmacksqualitäten unterschiedliche Substanzgruppen mit bestimmten funktionellen Gruppen und Konformationen für die spezifische Detektion durch Geschmacksrezeptoren grundlegend. Wobei hier auch Überlappungen im Ligandenspektrum auftreten können (z.B. aktiviert der Süßstoff Saccharin in hohen Konzentrationen nicht nur Süß-, sondern auch Bitterrezeptoren) (Tucker and Mattes 2012).

(3) Nicht zuletzt müssen diese Rezeptoren oder auch Kanäle in den Geschmackssinneszellen exprimiert sein und es muss das durch die Aktivierung dieser Zellen entstandene Signal über entsprechende Geschmacksnerven in die geschmacksverarbeitenden Gehirnregionen weitergeleitet werden. Dabei scheint das Vorkommen von individuellen, qualitätsspezifischen Subpopulationen an Geschmackszellen notwendig, um eine spezifische Qualität zu detektieren.

(4) Schlussendlich sollte eine individuelle Geschmacksqualität durch die eindeutige Wahrnehmung eines bestimmten Attributes (z.B. „süß“) bezeichnet werden können. Im Fall der Qualitäten süß, bitter, sauer und salzig ist dies auch weitestgehend der Fall. Umstritten bzw. weniger eindeutig hingegen ist dies für die Geschmacksrichtung umami, da hier das, unter anderem von Mononatriumglutamat ausgelöste, Geschmacksempfinden zum einen als schwer zu beschreiben und zum anderen auch als ein Verstärker anderer Qualitäten empfunden wird (Mattes 2009c). Hinzuzufügen wäre, dass sich eine Grundgeschmacksqualität nicht durch die Kombination anderer Geschmacksqualitäten erklären ließe.

1.1.3 Die Grundgeschmacksqualitäten

Süß und Umami

Die Geschmacksqualitäten Süß und Umami werden beide als attraktiv bewertet. Dem Süßgeschmack wird die Funktion der Detektion von kohlenhydratreicher Nahrung und damit der Sicherstellung einer ausreichenden Energieaufnahme zugeschrieben. Der Begriff „umami“ steht für „wohlschmeckend“ oder auch „herzhaft“ und beschreibt den Geschmack von L-Aminosäuren und Ribonukleotiden (Nelson et al. 2002). Diese Metaboliten des Protein- und Nukleinsäureabbaus sind vor allem in Fleisch und Käse zu finden, weshalb angenommen wird, dass die Attraktivität von Umami zur Sicherstellung der Energie- und Proteinaufnahme beiträgt (Galindo et al. 2012). Verhaltensstudien an Neugeborenen zeigten, dass die Attraktivität von Süß und Umami angeboren und universell ist (Steiner et al. 2001). Während der Süßgeschmack schon lange Zeit als eine Geschmacksqualität angesehen wird, wurde Umami erst als solche akzeptiert, nachdem ein Aminosäure-spezifischer Geschmacksrezeptor entdeckt wurde (Nelson et al. 2002).

Die beiden Geschmacksqualitäten haben nicht nur die Fähigkeit zur Detektion energiereicher Nahrungskomponenten gemeinsam, sondern werden auch beide durch die heteromeren Rezeptoren der TAS1R-Familie vermittelt. Diese Rezeptorfamilie beinhaltet bei Wirbeltieren drei Rezeptoren: TAS1R1, TAS1R2 und TAS1R3. Während das Heteromer aus TAS1R1 und TAS1R3 den funktionellen Umamirezeptor bildet, bildet die Kombination aus TAS1R2 und TAS1R3 den spezifischen Süßrezeptor (Kitagawa et al. 2001, Max et al. 2001, Montmayeur et al. 2001, Sainz et al. 2001, Li et al. 2002). Daher ist die TAS1R3-Untereinheit an der Wahrnehmung beider Geschmacksrichtungen beteiligt. Die Trennung beider Geschmacksqualitäten erfolgt über die spezifische Expression der Rezeptoruntereinheiten in Süß-Geschmackszellen (TAS1R2 und TAS1R3) oder Umami-Geschmackszellen (TAS1R1 und TAS1R3) des Typ II (Zhao et al. 2003). Wobei auch einzelne Zellen gefunden wurden, welche verschiedene Kombinationen dieser drei Rezeptoren aufwiesen (Kusuhara et al. 2013). Bei der Maus findet sich außerdem eine Expression des *Tas1r1* vorwiegend in Pilzpapillen, während eine Expression des *Tas1r2* hauptsächlich in Wall- und Blätterpapillen zu finden ist (Hoon et al. 1999). TAS1R3 hingegen ist in allen Geschmackspapillen ähnlich exprimiert. Zusätzlich existiert eine kleine Anzahl an Geschmackszellen, welche ausschließlich TAS1R3 enthalten, der womöglich auch als Homomer an der Süßwahrnehmung beteiligt ist (Montmayeur et al. 2001, Nelson et al. 2001). Mäuse, die durch genetische Manipulation keinen *Tas1r3* bzw. *Tas1r2/Tas1r3* exprimieren, haben eine stark verringerte bis gar keine Verhaltens- oder Geschmacksnervenreaktion gegenüber Zuckern (Damak et al. 2003). Obwohl das TAS1R1/TAS1R3-Heteromer eine tragende Rolle für die Umami-Wahrnehmung spielt, werden weitere alternative Umami-Rezeptorkandidaten in der Literatur diskutiert. Zu ihnen zählen unter anderem metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluRs, besonders mGluR4) und ionotrope Glutamatrezeptoren vom NMDA-Typ (Chaudhari et al. 2009, Yoshida et al. 2009, Kusuhara et al. 2013).

Es existiert eine Vielzahl an süß schmeckenden Substanzen, unter ihnen Mono- und Disaccharide, Aminosäuren, Proteine, pflanzliche Sekundärstoffe, synthetische Substanzen und Guanidinoessigsäuren (Schiffman et al. 1981, Behrens et al. 2011a). Die Möglichkeit, all diese Substanzen anhand eines Rezeptors zu detektieren, wird durch die Komplexität des TAS1R2/TAS1R3-Heteromers und seiner Vielzahl an Bindungsstellen gewährleistet (Temussi 2002, Xu et al. 2004, Morini et al. 2005, Nie et al. 2005, Galindo et al. 2012). Während der humane Umamirezeptor spezifisch L-Glutamat und geringerem Ausmaß auch Aspartat bindet, ist der Nagetier-Umamirezeptor in der Lage durch verschiedene L-Aminosäuren aktiviert zu werden. Beiden Spezies ist gemein, dass eine Verstärkung des Umamigeschmacks durch 5'-Ribonukleotidmonophosphate (u.a. IMP und GMP) erzeugt werden kann (Zhang et al. 2008).

Salzig und Sauer

Salz- und Sauergeschmack wirken bei geringen Konzentrationen attraktiv, aber bei höherer Konzentration an Geschmackssubstanzen aversiv (Lindemann 2001). Der Salzwahrnehmung wird eine Rolle bei der Aufnahme von NaCl und anderen Mineralien zugesprochen, um den Elektrolythaushalt ausgewogen zu halten (Lindemann 2001, Galindo et al. 2012). Sowohl eine zu hohe als auch eine zu geringe Salzaufnahme wären schädlich. Die Hauptaufgabe der Sauerwahrnehmung wird in der Vermeidung der Aufnahme von verdorbener oder unreifer Nahrung gesehen. Allerdings enthalten säurehaltige Nahrungsmittel oft auch gesundheitsfördernde Vitamine. In gleicher Art wie beim Salzgeschmack ermöglicht die konzentrationsabhängige Attraktivität bzw. Aversion gegen den Sauergeschmack das Gleichgewicht des Säure-Basen-Haushaltes im Körpers zu regulieren (Lindemann 2001, Blossfeld et al. 2007).

Bisher ist die molekulare Identität der am Sauer- und Salzgeschmack beteiligten Sensoren nur teilweise geklärt. Es spielen höchstwahrscheinlich Ionenkanal-vermittelte Ströme eine Rolle, die zur Depolarisierung der Geschmackszellen führen (Chaudhari and Roper 2010, Galindo et al. 2012). Für die Wahrnehmung des Salzgeschmacks sind bisher zwei Signalwege bekannt. Ein Amilorid-sensitiver, möglicherweise auf die Beteiligung von ENaC-Kanälen zurückzuführender Weg und ein noch nicht näher charakterisierter Amilorid-insensitiver Signalweg. Chandrashekar und Kollegen zeigten an Rezeptorknockout-Tieren, dass die α -Untereinheit des ENaC-Kanals essentiell für die Amilorid-sensitive Salzgeschmackswahrnehmung ist. (Chandrashekar et al. 2010). Allerdings sind die genaue Zusammensetzung des Salzgeschmacksrezeptors und der ihn exprimierende Zelltyp noch unklar (Chandrashekar et al. 2010). Beim Menschen fand sich in den Geschmackszellen eine zusätzliche ENaC-Untereinheit (ENaC- δ), welche eine im Vergleich zu Nagetieren geringere Salzsensitivität aufweist (Ossebaard et al. 1997) und vermutlich die im Vergleich zu Nagetieren weniger gut ausgeprägte Salzgeschmackswahrnehmung erklärt (Halpern 1998).

Weniger ist über die molekularen Mechanismen der Sauergeschmackswahrnehmung bekannt. Verschiedene Geschmackssensorkandidaten werden hierfür in der Literatur diskutiert. Hierzu zählen unter anderem Säure-aktivierte Ionenkanäle (Ugawa et al. 1998), durch Hyperpolarisierung aktivierte Ionenkanäle (Stevens et al. 2001), Kaliumkanäle (Lin et al. 2004, Richter et al. 2004), Kationenkanäle der PKD-Familie (PKD2L1/PKD1L3) (Ishimaru et al. 2006, LopezJimenez et al. 2006) oder auch apikale Moleküle, die die Protonenleitfähigkeit vermitteln (DeSimone et al. 2011). Interessanterweise verlieren Mäuse, deren PKD2L1/PKD1L3-exprimierende Zellen gentechnisch ablatiert werden, ihre Fähigkeit, auf Sauerstimuli mit Aktivierung von Chorda-Tympani-Nervenfasern zu reagieren, besitzen jedoch noch eine Responsivität für alle anderen Geschmacksstimuli (Huang et al. 2006). Allerdings hatte der genetische Knockout dieses Rezeptor-Heteromers keinen großen Einfluss auf die Sauergeschmackswahrnehmung von Mäusen (Horio et al. 2011, Galindo et al. 2012). Somit ist zwar der sauer-vermittelnde Zelltyp bekannt, nicht jedoch der vermittelnde Rezeptor. Bekannt ist jedoch, dass Sauer-Geschmackszellen durch Protonen depolarisiert werden können und sowohl NADPH-abhängige als auch cAMP-PKA-sensitive Protonenkanäle beteiligt sind (DeSimone et al. 2011). Auch eine Diffusion von organischen Säuren durch die Zellmembran und damit einhergehende Ansäuerung des Intrazellulärtraumes wird als möglicher Mechanismus der Sauergeschmackswahrnehmung diskutiert (Roper 2007).

Bitter

Die Fähigkeit bitter zu schmecken ermöglicht es, giftige Substanzen zu erkennen und deren Aufnahme zu vermeiden, da toxische Inhaltsstoffe oft einen bitteren Geschmack auslösen (Meyerhof 2005). Diese Aversion ist angeboren und kann schon bei Neugeborenen anhand eines typischen, reflexartigen Gesichtsausdrucks beobachtet werden (Steiner et al. 2001). Allerdings können sich bestimmte Bitterstoffe durch alltägliche Erfahrung und Lernen zu attraktiven Stimuli entwickeln

bzw. werden im Lebensmittel toleriert. Diese finden sich in geringen Konzentrationen beispielsweise in Kaffee, Bier, Schokolade oder Gemüse und erzeugen positive Assoziationen (Glendinning 1994).

Die Anzahl an Bitterstoffen, die vom Geschmackssystem detektiert werden können, ist enorm und umfasst eine Vielzahl strukturell verschiedener Substanzgruppen, wie zum Beispiel Terpenoide, Glycoside, Alkaloide, Aminosäuren, Fettsäuren, Phenole, Amide, Amine oder auch Metallionen (Meyerhof et al. 2005, Brockhoff et al. 2007, Meyerhof et al. 2010, Brockhoff et al. 2011). Dieses umfangreiche Wahrnehmungsspektrum wird durch die Familie der TAS2R-Bittergeschmacksrezeptoren ermöglicht. Sie umfasst je nach Spezies 3 (Huhn) bis 70 (Amphibien) Rezeptoren, wobei der Mensch etwa 25 besitzt (Behrens et al. 2009a, Behrens and Meyerhof 2009b). In Zell-basierten Rezeptorassays wurden das Ligandenspektrum, die Rezeptorpharmakologie und zunehmend auch die Ligandenbindungsmechanismen in den letzten Jahrzehnten gut charakterisiert (Brockhoff et al. 2010, Meyerhof et al. 2010, Born et al. 2013), wenn auch noch nicht alle humanen und murinen Bitterrezeptoren deorphanisiert sind. Bitterrezeptoren besitzen ein überlappendes Ligandenspektrum, wobei sowohl spezialisierte Rezeptoren mit wenigen Liganden, als auch Generalisten mit einer Vielzahl an Liganden zu finden sind. Sie werden in den Bitterspezifischen Typ-II-Geschmacksrezeptorzellen exprimiert, wobei sich die Zellen in verschiedene Subpopulationen mit unterschiedlicher Bitterrezeptorausstattung unterteilen (Behrens et al. 2007, Hübner et al. unveröffentlicht).

Gut belegt ist auch der Einfluss von genetischen Polymorphismen und hierdurch entstandene Rezeptorvarianten auf die individuelle Bitterwahrnehmung (Kim et al. 2004, Wooding et al. 2004, Roudnitzky et al. 2011). So existiert beispielsweise eine „Nicht-Schmecker“-Genvariante des humanen TAS2R38, die auf drei Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) zurückzuführen ist, welche zu einer veränderten Aminosäuresequenz führen und damit die Bindung der Bittersubstanzen Phenylthiocarbamid (PTC) und Propylthiouracil (PROP) verhindern (Guo and Reed 2001, Kim et al. 2003, Bufe et al. 2005). Dies führt dazu, dass etwa 35% der Bevölkerung nicht in der Lage sind, diese Substanzen als bitter wahrzunehmen (Kim et al. 2003, Kim et al. 2004, Kim and Drayna 2005). Dies betrifft auch andere Thiocyanate, die unter anderem in Brassicaceen (Brokkoli, Rosenkohl etc.) vorkommen und bei „Schmeckern“ eine erhöhte Bitterkeit hervorrufen (Wooding et al. 2010). Dass solche Varianten auch einen direkten Einfluss auf die Nahrungsauswahl haben können, ist Gegenstand aktueller Forschung (Tepper 1998, Sandell and Breslin 2006).

1.1.4 Zelluläre und neuronale Verarbeitung von Geschmackssignalen

Zelluläre Signalweiterleitung

Nehmen wir Nahrungsmittel zu uns, so werden sie in der Mundhöhle im Speichel gelöst und teilweise vorverdaut. Hierdurch gelangen einzelne Geschmacksmoleküle mit dem Speichel zu den apikal gelegenen Poren der Geschmacksknospen und interagieren dort mit ihren entsprechenden Rezeptoren (Abb. 2) (Lindemann 1996). Dabei handelt es sich bei den momentan am besten charakterisierten Geschmacksmolekülen des Süß-, Umami- und Bittergeschmacks um GPCRs, deren intrazellulär gelegenes G-Protein nach Aktivierung in die Untereinheiten $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ dissoziiert. $G\beta\gamma$ ist daraufhin in der Lage, die membrangebundene Phospholipase $C\beta 2$ (PLC $\beta 2$) zu aktivieren, welche wiederum Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Inositoltrisphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. Diese intrazellulären sekundären Botenstoffe können daraufhin unter anderem über die Stimulation von IP $_3$ -Rezeptoren und der Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus internen Speichern eine Aktivierung der Geschmackszellen des Typs II hervorrufen. Der Anstieg an freien Ca^{2+} -Ionen im Zytosol führt zusätzlich zur Aktivierung von TRPM5-Kanälen, welche den Einstrom von Na^{+} -Ionen ermöglichen und damit zur Depolarisierung der Zelle führen. Die Depolarisierung der Zellmembran bewirkt schlussendlich die Freisetzung von ATP, welches mit P2X-Rezeptoren auf angrenzenden

Nervenfaser interagiert und so eine Signalweiterleitung bewirkt (Abb. 2) (Finger et al. 2005, Chaudhari and Roper 2010, Roper 2013).

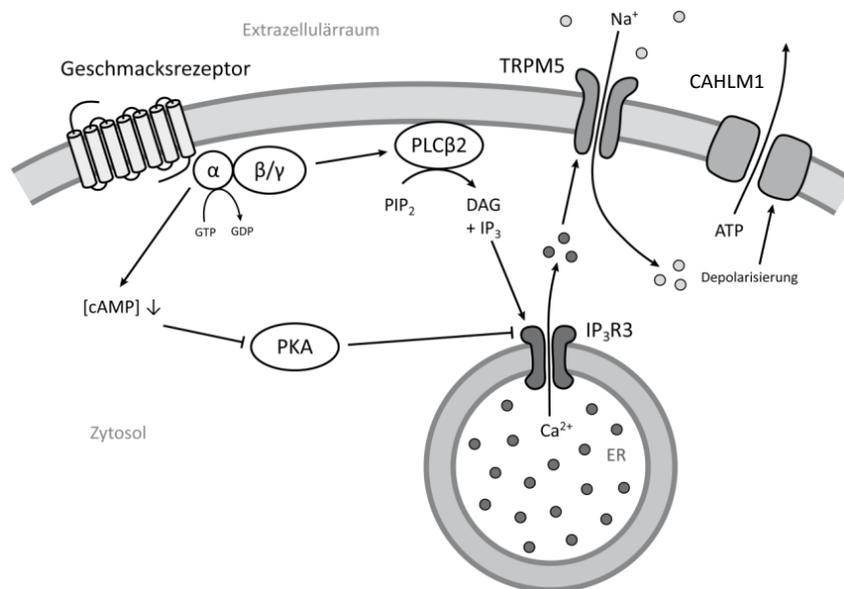


Abb. 2: Signaltransduktion in Typ-II-Geschmackszellen. Nach Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Geschmacksrezeptors erfolgt in den Typ-II-Geschmackszellen die Signalweiterleitung über die Aktivierung der Phospholipase C β 2 und einer damit einhergehenden Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Diacylglycerol und Inositoltrisphosphat (IP₃), welches zur Freisetzung von Calciumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) führt. Die erhöhte intrazelluläre Calciumionenkonzentration wiederum bewirkt die Öffnung von Calcium-sensitiven TRPM5-Kanälen und den Einstrom von Natriumionen, welche zur Depolarisierung der Zelle und somit zur Freisetzung von ATP beitragen. Eine Verstärkung der Signalkaskade erfolgt zusätzlich durch eine cAMP-vermittelte Hemmung der Proteinkinase A (PKA), welche der Calciumfreisetzung entgegenwirkt (Avenet et al. 1988, Roper 2013). Abgewandelte Abbildung aus (Galindo et al. 2012).

Neuronale Geschmackweiterleitung und Zell-Zell-Kommunikation

Geschmacksrezeptorzellen (Typ II) besitzen keine Synapsen wie die präsynaptischen Typ-III-Zellen (Abb. 3). So stellt sich die Frage, wie die Weiterleitung der entstandenen Geschmackssignale gelingt. Nachdem bekannt war, dass durch Aktivierung von Geschmacksrezeptorzellen ATP freigesetzt wird, untersuchten Finger und Kollegen dazu die Rolle von P2X-Rezeptoren bei der Signalweiterleitung, welche auf den Geschmacksnerven exprimiert sind (Finger et al. 2005). Diese Rezeptoren sind Homo- oder Heteromere von P2X₂ und P2X₃. Es konnte an Experimenten mit Einzel- und Doppelknockout-Tieren gezeigt werden, dass in den Tieren, denen beide Rezeptoren fehlten, die Fähigkeit, bitter, süß oder umami wahrzunehmen, völlig verloren geht. Auch die Attraktivität von gering konzentrierten NaCl-Lösungen verschwand in diesen Tieren. ATP überträgt nicht nur das Signal von Rezeptorzellen auf afferente Nervenfaser, sondern ist in der Lage, weitere Zellen in der Geschmacksknospe zu aktivieren. Zum einen aktiviert es als autokriner Verstärker die ATP-freisetzende Zelle selbst über P2Y1-Rezeptoren, zum anderen auch präsynaptische Zellen, die daraufhin Neurotransmitter sekretieren wie z.B. Serotonin und Noradrenalin (Huang et al. 2008b, Kinnamon and Finger 2013). Damit ist innerhalb der Geschmacksknospe auch eine Zell-Zell-Kommunikation vorhanden, die sich in den letzten Jahren als zunehmend komplexer zeigte (Chaudhari and Roper 2010, Roper 2013). Serotonin wird durch ATP-Aktivierung aus präsynaptischen Zellen freigesetzt (Huang et al. 2005a). Die Bedeutung der Inhibierung von Typ-II-Zellen als negative Rückkopplung und die Wirkung von Serotonin an afferenten Nervenfaser steht allerdings noch unter Diskussion (Roper 2013). Neben Serotonin und seinen Rezeptoren (5-HT_{1A} und 5-HT₃) wurden in Geschmacksknospen von Nagern auch γ -Aminobuttersäure (GABA), L-Glutamat und Ace-

tylcholin als Neurotransmitter nachgewiesen. Diese Transmitter dirigieren und modulieren in komplexer Weise den Übertragung von Geschmacksinformationen. Acetylcholin stimuliert auf auto- und parakrine Weise muskarinische Rezeptoren (Dando and Roper 2012). GABA wird ebenso wie Serotonin von präsynaptischen Zellen freigesetzt, die durch saure Stimuli oder KCl, nicht aber ATP aktiviert wurden und ist ein weiterer inhibitorischer Transmitter. GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren finden sich ebenfalls auf Typ-II- und Typ-III-Zellen (Dvoryanchikov et al. 2011). Rezeptoren für Glutamat befinden sich nicht nur auf der basolateralen Seite von Geschmackszellen, wo es als Neurotransmitter fungiert, sondern auch als Geschmackssensoren für Umami an der apikalen Seite, was die Erforschung der neuronalen Mechanismen erschwert (Vandenbeuch et al. 2010). Die präzisen Abläufe und ihre Bedeutung sind Gegenstand aktueller Forschung. Ausführlichere Informationen können den aktuellen Übersichtsartikeln entnommen werden (Roper 2013).

Nach Übertragung der Signale aktivierter Geschmackszellen auf angrenzende Nervenfasern erfolgt die Weiterleitung der Geschmacksinformationen über verschiedene Nervenäste zu den geschmacks-verarbeitenden Regionen im Zentralnervensystem. Die an der Weiterleitung beteiligten Nerven sind der Abb. 4 zu entnehmen und umfassen die Hirnnerven *Nervus facialis* (VII), *Nervus glossopharyngeus* (IX) und *Nervus vagus* (X), deren Äste die verschiedenen Papillenregionen der Zunge, des Gaumens und des Kehldeckels innervieren. Die dem VII. Hirnnerv angehörende *Chorda tympani* (CT-Nerv) innerviert dabei die Pilz- und teilweise auch Blätterpapillen, während der *Nervus petrosus major* Geschmacksknospen des Gaumens innerviert. Die Zellkörper der Neuronen dieser beiden Äste befinden sich im *Ganglion geniculi* (GG). Die Äste des IX. Hirnnerv innervieren den Hauptteil der Geschmacksknospen der Blätterpapillen und die Geschmacksknospen der Wallpapillen. Ihre Zellkörper liegen im *Ganglion petrosum* (GP). Schließlich führt der Ast des X. Hirnnerven zur Innervation der Knospen auf dem Kehldeckel (*Nervus laryngeus superior*). Die Zellkörper dieser Fasern liegen im *Ganglion nodosum* (GN). (Lalonde and Eglitis 1961, Mistretta 1984, Belecky and Smith 1990, Hendricks et al. 2002, Yamamoto et al. 2011, Galindo et al. 2012).

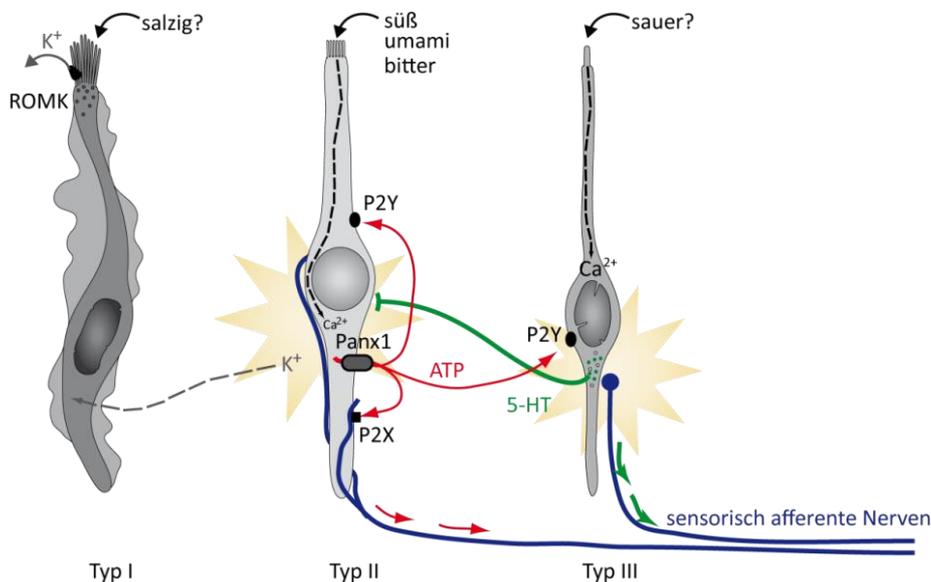


Abb. 3: Zellkommunikation und Signalweiterleitung zwischen verschiedenen Geschmackszelltypen.

Typ-II-Geschmacksrezeptorzellen, welche durch Süß-, Umami- oder Bittergeschmacksstoffe aktiviert werden, setzen den Neurotransmitter ATP frei, der über P2Y-Rezeptoren sowohl zur weiteren Aktivierung der Typ-II-Zelle, als auch zur Aktivierung von Typ-III-Zellen führt. Die Übertragung der Signale an sensorische afferente Nerven erfolgt ATP-vermittelt über P2X-Rezeptoren bzw. weitere unbekannte Mechanismen, wie beispielsweise durch Neurotransmitter wie Serotonin (5-HT). Abbildungen der Zellen von Jonas Töle (Dife), abgewandelt in Anlehnung an (Chaudhari and Roper 2010)

Die Projektionen dieser Nerven leiten die Geschmacksinformation in die erste geschmacksverarbeitende Station des Gehirns, den *Nucleus tractus solitarius* (NTS), im Hirnstamm weiter. Der NTS ist zum einen mit Nervenzellen innerhalb des Hirnstamms zur Übertragung geschmacksabhängiger Reflexe und zur Regulation des Speichelflusses verschaltet, zum anderen ziehen Fasern in die gustatorischen Kerngebiete höherer Ordnung. Hierzu gehören bei Nagern der *Nucleus parabrachialis* (PbN) und letztlich Thalamus und granulärer Inselcortex, welcher den primären gustatorischen Cortex darstellt. Dort werden nicht nur die Geschmacksinformationen verarbeitet sondern diese auch mit Informationen thermischer und taktiler Ereignisse der Mundhöhle verrechnet. Weiterhin werden bei der Maus auch Signale vom PbN, beim Menschen jedoch vom Cortex aus, in das ventrale Vorderhirn (u.a. Hypothalamus, Amygdala und *Nucleus interstitialis striae terminalis*) geleitet und dienen dort der Regulation der Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme, dem konditionierten Geschmacksaversionsverhalten, sowie dem Belohnungs- und Suchtverhalten. (Norgren 1978, Hamilton and Norgren 1984, Spector 2000, Swards and Swards 2001, Rolls and Scott 2003b, Small 2006, Smith and Lemon 2007).

1.1.5 Der Einfluss von Speichelsekreten auf die Geschmackswahrnehmung

Durch die Aufnahme von Nahrung, aber auch allein durch das Erblicken oder die Vorstellung eines Lebensmittels, kann einem im wahrsten Sinne das Wasser im Mund zusammen laufen. Speichel ist eine komplexe Mischung aus den Sekreten der großen² und kleinen³ Speicheldrüsen (Abb. 5) und Gingivalflüssigkeit⁴ (Humphrey and Williamson 2001). Die Sekretion dieser Flüssigkeiten wird dabei von den sympathischen und parasympathischen Nerven kontrolliert (Proctor und Carpenter, 2007).

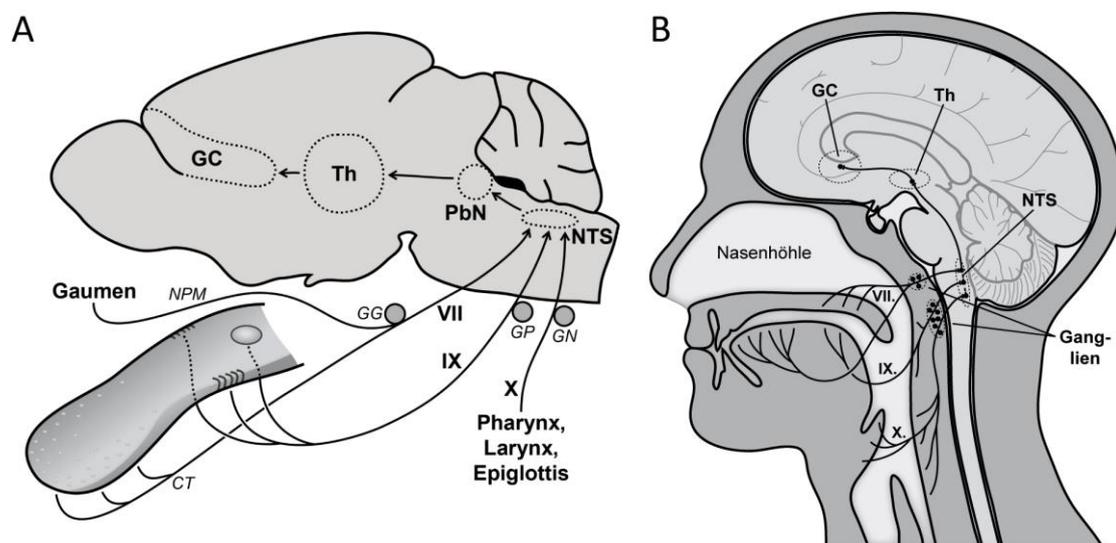


Abb. 4: Neuronale Weiterleitung von Geschmackssignalen bei Maus (A) und Mensch (B). Die in den Geschmackspapillen generierten Geschmackssignale werden über den VII., IX. und X. Hirnnerv zur weiteren Verarbeitung an das Gehirn weitergeleitet. Dort werden sie über den *Nucleus tractus solitarius* (NTS) in höhere Zentren des Thalamus (Th) und den gustatorischen Cortex (GC) geleitet, in dem die Geschmacksinformation verarbeitet und mit thermischen und taktilen Informationen der Mundhöhle integriert wird. Im Unterschied zur Maus ist der *Nucleus parabrachialis* (PbN) des Menschen nicht an der Geschmacksverarbeitung beteiligt. Abbildungen aus (Hübner et al. 2013).

² Ohr-, Unterkiefer- und Unterzungenspeicheldrüsen

³ Lippen-, Wangen-, Zungen-, Gaumen- und Mahlzahndrüsen

⁴ Flüssigkeit aus dem *Sulcus gingivalis* zwischen Zähnen und Zahnfleisch

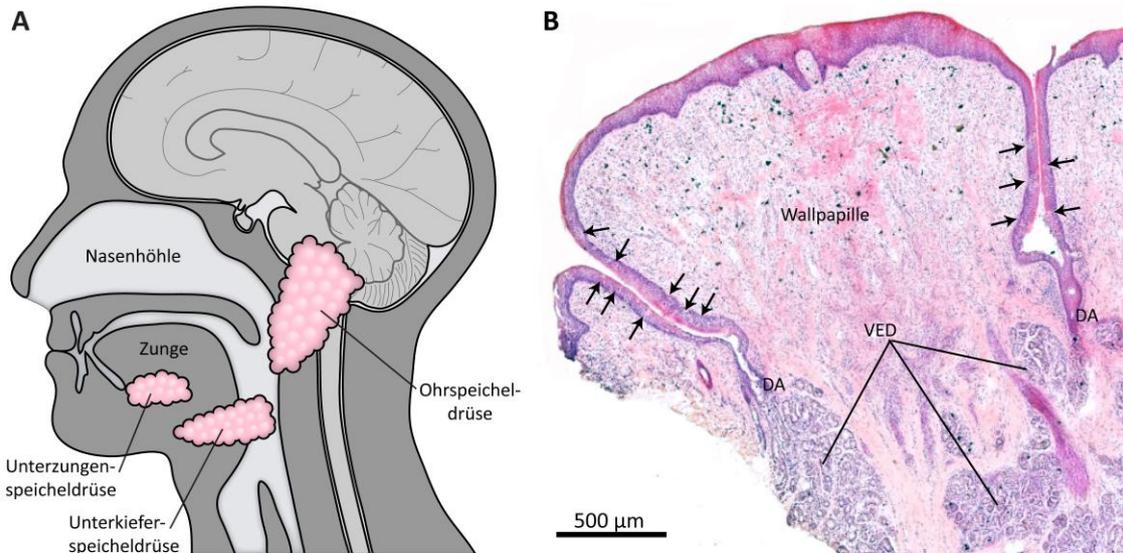


Abb. 5: Große Speicheldrüsen und Von-Ebner-Drüsengewebe des Menschen. (A) Zu den großen Speicheldrüsen zählen (1) die Ohrspeicheldrüse (*G. parotidea*), (2) die Unterkieferspeicheldrüse (*G. submandibularis*) und (3) die Unterzungenspeicheldrüse (*G. sublingualis*). Zu den kleinen Speicheldrüsen zählt u.a. das Von-Ebner-Drüsengewebe (VED) welches im Zungengewebe eingebettet ist und dessen Drüsenausgänge (DA) direkt in die Gräben der Wall- und Bätterpapillen münden. Dort tritt das Von-Ebner-Speichelsekret in direkten Kontakt mit dem Geschmacksepithel und den darin befindlichen Geschmackspapillen (Pfeile). Linke Abbildung von Jonas Töle (Dife).

Die Hauptaufgabe des Speichels ist es, die Mundhöhle, besonders die Zähne, gegen Infektionen und mechanische Verletzungen zu schützen, aber auch die Aufnahme, Zerkleinerung und erste Verdauung der Nahrung zu unterstützen (Mese and Matsuo, 2007). Erst in den letzten Jahren rückte die Funktion des Speichels in das Interesse der Forschung und damit erhöhte sich das Verständnis für die Rolle der Speichelproduktion bei der Geschmackswahrnehmung (Spielman 1990, Matsuo 2000, Neyraud et al. 2012, Neyraud 2014). Es zeigte sich, dass die Speichelflüssigkeit als Lösungsmittel für Geschmackssubstanzen dient, die Geschmackssensitivität beeinflusst und ein gewisses Milieu für die Geschmacksrezeptoren erhält (Spielman 1990, Neyraud et al. 2012). Aufgrund seiner verschiedenartigen enzymatischen Aktivität können vielerlei Nahrungsbestandteile mit dem Speichel vorverdaut werden, hierdurch können weitere Geschmacksstimuli, u.a. Kohlenhydrate und Aminosäuren freigesetzt werden. Die amylytische Aktivität des Speichels wurde bisher am detailliertesten beschrieben (de Wijk et al. 2004), jedoch lassen sich auch proteolytische und lipolytische Aktivitäten (Hamosh and Burns 1977, DeNigris et al. 1988, Helmerhorst and Oppenheim 2007, Stewart et al. 2010) im menschlichen Speichel nachweisen. Der Geschmack von saurer Nahrung wird unter anderem durch die Puffereigenschaften der Speichelflüssigkeit aufgrund von Bicarbonat-Ionen vermindert (Norris et al. 1984), wohingegen für den Geschmack von Glutamat eine synergistische Wirkung durch das im Speichel enthaltene endogene Glutamat beschrieben wurde (Yamaguchi et al. 1987, Spielman 1990). Die Beeinflussung des Geschmacks einiger Bittersubstanzen durch die im Speichel enthaltenen prolinreichen Proteine (PRPs), welche z.B. als Träger für diese Stoffe dienen könnten, wurde ebenfalls diskutiert (Mehansho et al. 1983, Mehansho et al. 1985). Umgekehrt können auch Speichelfluss und -zusammensetzung durch Geschmackssubstanzen beeinflusst werden. Es ist bekannt, dass vor allem saure Geschmacksstimuli wie Zitronensäure die Flussrate und die Konzentrationen an Na^+ -Ionen im Speichel erhöht, während salzige Stimuli zu erhöhten Protein- und Ca^{2+} -Konzentrationen im Speichel führen (Spielman 1990). Die individuelle Variabilität der Speichelzusammensetzung innerhalb der Bevölkerung ist bisher wenig untersucht worden, jedoch konnte ein gewisser Zusammenhang zur Variabilität der Geschmackswahrnehmung und der Ausprägung von Vorlieben gezeigt werden (Perry et al. 2007, Neyraud et al. 2012).

1.2 Einteilung, Vorkommen und Bedeutung von Nahrungsfetten⁵

Fette werden in heutiger Zeit nicht mehr traditionell „nur“ als Energielieferanten und Geschmacks-träger gesehen. Natürlich ist Fett aufgrund seiner hohen Energiedichte (9 kcal/g) einer der wichtigsten Energiespender und -speicher, und damit über das Fettgewebe auch Wärmeregulator für unseren Körper. Dennoch wurde die Bedeutung von aus Fetten stammenden bioaktiven Substanzen, wie den fettlöslichen Vitaminen und essentiellen Fettsäuren, in den letzten Jahren immer deutlicher. Es zeigte sich, dass sie nicht nur an der Entstehung von metabolischen Krankheiten beteiligt sind, sondern auch ein breites Spektrum an physiologischen Funktionen erfüllen, u.a. als Komponenten von Zellmembranen, Vorstufen von Lipidmediatoren, Signalmolekülen und Genregulatoren. Damit haben sie große Bedeutung für die Hirnentwicklung, für Entzündungsprozesse oder auch das Immunsystem. Sie spielen eine Rolle für kardiovaskuläre Krankheiten, neurodegenerative Störungen und Krebserkrankungen.

Unter dem Begriff Nahrungsfett lässt sich eine Vielzahl von auch als Lipide bezeichnete Substanzen mit hydrophoben Eigenschaften zusammenfassen. Hierbei werden unter dem Begriff „Öle“ bei 20°C flüssige Fette verstanden, während sich der Begriff „Fette“ auf Lipidgemische bezieht, welche bei 20°C fest sind. Feste Lipidgemische in Form von Wachsen⁶ werden nicht zu den Nahrungsfetten gezählt. Nahrungsfett besteht zu mehr als 90 % aus Triglyceriden, 0,1 - 4 % freien Fettsäuren, fettlöslichen Vitaminen und Phospholipiden⁷. In pflanzlichen Ölen finden sich auch Squalene und Phytosterole. In tierischen Fetten zählen außerdem sowohl Glycolipide als auch Isoprenoide zu den fettartigen Inhaltsstoffen⁸. Nicht zuletzt beinhalten Nahrungsfette eine Vielzahl von flüchtigen Aromastoffen wie beispielsweise Aldehyde. Der Hauptbestandteil von Triglyceriden sind neben dem Glycerol die Fettsäuren. Eine Übersicht über die qualitativ und quantitativ für den Menschen wichtigsten Fettsäuren und deren Funktion gibt

Tab. 1. Fettsäuren sind unverzweigte Carbonsäuren, die nach Anzahl ihrer C-Atom-Kettenlänge in kurzkettige (SCFA, bis 5 C-Atome), mittelkettige (MCFA, 6-10 C-Atome) und langkettige Fettsäuren (LCFA, >10 C-Atome)⁹ eingeteilt werden. Eine weitere gängige Einteilung der Fettsäuren richtet sich nach ihrem Sättigungsgrad und damit der Anzahl an Doppelbindungen im Molekül. Der Sättigungsgrad bestimmt maßgeblich die chemischen Eigenschaften einer Fettsäure. Ausgehend von gesättigten Fettsäuren (SFA) über einfach ungesättigte Fettsäuren (MUFA) bis hin zu mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) verändert sich beispielweise der Aggregatzustand bei Raumtemperatur von eher fest zu vorwiegend flüssig.

Ein weiteres physiologisch wichtiges Merkmal zur Einteilung von Fettsäuren ist die Position der letzten Doppelbindung, welche sie in ω -9-, ω -6- und ω -3-Fettsäuren unterteilt. ω -6- und ω -3-Fettsäuren können nicht bzw. nur teilweise vom menschlichen Körper synthetisiert werden und sind daher (semi-)essentiell. Zu den essentiellen Fettsäuren gehören die Linolsäure (LA) und α -Linolensäure (ALA), welche wiederum zur Synthese der semi-essentiellen Fettsäuren Docosahexaensäure (DHA), Eicosapentaensäure (EPA) und Arachidonsäure (AA) dienen. Viele Pflanzen hinge-

⁵ Sofern nicht anders angegeben basiert dieses Kapitel auf Informationen und Daten zweier kürzlich verfasster umfangreicher Übersichtsartikel, auf welche für ausführlichere Informationen hingewiesen sein soll (Kremmyda et al. 2011, Tvrzicka et al. 2011).

⁶ Im Gegensatz zu Fetten und fetten Ölen, bilden den Hauptanteil in Wachsen nicht Triglyceride, sondern Ester aus Fettsäuren mit langkettigen, aliphatischen, primären Alkoholen.

⁷ Triglyceride sind Ester aus drei Fettsäuren mit Glycerol. Zu den fettlöslichen Vitaminen zählen Tocopherole (Vitamin E), Cholecalciferol (Vitamin D₃), Vitamin A (Retinal, Retinol, Retinsäuren u.a.) und Vitamin K (Phyllochinon, Menachinon-n, Menadion). Phospholipide sind unter anderem Phosphatidylcholin (Lecithine), Phosphatidylethanolamine (Kephaline), Phosphatidylserin und Sphingomyeline.

⁸ Als Tierische Glycolipide werden unter anderem Cerebroside und Ganglioside bezeichnet. Cholesterol, Gallensäuren und Steroidhormone werden zu den Isoprenoiden gezählt.

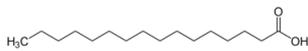
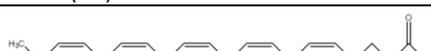
⁹ Die Abgrenzung der drei Gruppen erweist sich in der Literatur jedoch als nicht einheitlich.

gen sind in der Lage, Doppelbindungen in Fettsäuren einzuführen und so z.B. aus Ölsäure Linol- bzw. α -Linolensäure herzustellen. Daher finden sich diese Fettsäuren vor allem in Linsen und Nüssen (ALA) oder auch Getreidekeim, Distel-, Raps- und Sojaöl (LA). Eine Ausnahme bilden Fische, die im Gegensatz zu allen anderen tierischen und pflanzlichen Lebensmitteln durch den Verzehr von Mikroalgen besonders viel EPA und DHA enthalten (Tab. 2).

Für die Fettwahrnehmung spielen vorwiegend langkettige Fettsäuren eine Rolle, welche den Hauptteil der Fette und Öle der menschlichen Nahrung bilden. Tierische Fette enthalten einen hohen Anteil gesättigter Fettsäuren (Palmitin- und Stearinsäure), wohingegen pflanzlichen Fette und Öle einen höheren Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren (LA, ALA) aufweisen. Eine Ausnahme bilden hier Kokosfett, Kakaobutter und gehärtete Margarinen. Die wichtigste Quelle für die langkettigen Fettsäuren EPA und DHA sind jedoch Fisch- und Meeresfrüchte.

Neben den oben erwähnten Einteilungsformen von Fetten und Fettsäuren existieren noch weitaus mehr, die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter ausgeführt werden sollen.

Tab. 1: Wichtige Fettsäuren in der Ernährung des Menschen.

Bezeichnung und Struktur*		Funktion und Bedeutung (Auswahl) ^{1,2}
C16:0 Palmitinsäure		Energielieferant, atherogen, thrombogen, erhöht den Cholesterinspiegel (LDL)
C18:0 Stearinsäure		Energielieferant, mglw. antiatherogen, aber prothrombotisch
C18:1 Ölsäure		Energielieferant, antiatherogen und antithrombotisch, erhöht das HDL/LDL-Verhältnis, verbessert die Insulinsensitivität, anticancerogen
C18:2 ω -6 Linolsäure (LA)		Vorstufe von AA (entzündungsfördernd) und Dihomog-linolensäure (entzündungshemmend), Barrierefunktion der Haut (Ceramide)
C18:3 ω -3 α -Linolensäure (ALA)		als Vorstufe für DHA, EPA, Eicosanoide: entzündungshemmend, verringert bzw. protektiv bei koronaren Herzkrankheiten (KHK), fördert Hirnfunktionen
C20:4 ω -6 Arachidonsäure (AA)		in Zellmembranen durch PLA ₂ freigesetzt, Vorläufer für Prostaglandine und Leukotriene, entzündungsfördernd
C20:5 ω -3 Eicosapentaensäure (EPA)		Vorstufe für DHA und Eicosanoide, Funktionen im Immunsystem und bei der Blutgerinnung, positiv bei KHK und Depressionen
C22:6 ω -3 Docosahexaensäure (DHA)		senkt Blutdruck und Herzfrequenz, fördert die Entwicklung von Augen- und Hirnfunktionen

1: Tvrzicka et al., 2011 . 2: Kremmyda et al., 2011 . *Strukturen der Fettsäuren aus: Motter and Ahern, 2012

1.3 Die Wahrnehmung von Fetten

Fette sind Hauptenergieträger der menschlichen Ernährung und ihre verschiedenen Bestandteile erfüllen vielfältige, essentielle Funktionen im menschlichen Organismus (s. Kap. 1.2). Einerseits stellt die übermäßige Aufnahme einen wesentlichen Risikofaktor für die Entwicklung von Fettleibigkeit und damit einhergehenden Krankheiten dar, andererseits ist die Zufuhr von essentiellen Fettsäuren und fettlöslichen Vitaminen eine Grundvoraussetzung für die Entwicklung und Gesunderhaltung wichtiger körperlicher und geistiger Funktionen (s. Kap. 1.2). Damit ergibt sich für den menschlichen Körper die Notwendigkeit, Fett bzw. Fettbestandteile in der Nahrung zu detektieren, um deren Aufnahme regulieren zu können.

Tab. 2: Fettsäureanteile in Fetten verschiedener Nahrungsmittelgruppen.

Angegeben ist die Menge an Fettsäuren in mg je g Fett des jeweiligen Nahrungsmittels*

Nahrungsmittel bzw. -gruppe		ω -Fettsäuren							n-6/n-3	
		C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	EPA	DHA		AA
Tierische Nahrungsmittel	Tierische Fette und Öle	205	77	343	100	11				9
	Fleisch (ohne Fleischerzeugnisse)	241	146	442	43	11				4
	Milch, Milcherzeugnisse	260	111	251	20	12				2
	Käse	288	106	239	19	8				2
	Hühnerei	212	64	374	147	9			6	17
	Eigelb	216	67	367	149	8		6	7	11
	Wild, Geflügel	218	76	443	115	9		6	13	8
	Fisch, Fischerzeugnisse	140	30	164	26	15	85	102	12	0,2
Krusten- und Weichtiere	154	62	74	36	12	99	72	39	0,4	
Pflanzliche Nahrungsmittel	Pflanzliche Öle	108	58	302	313	90				3
	Obst	165	41	119	271	136				2
	Gemüse, Gemüseprodukte	67	7	95	233	40				6
	Oliven	108	24	719	81	9				9
	Sojabohne	95	33	217	536	51				11
	Nüsse, Schalenfrüchte	80	28	449	330	30				11
	Kakaopulver	265	337	307	27	2				15
	Getreide, Getreideprodukte	170	16	299	394	16				25
Durchschnitt	175	75	280	167	28	92	46	16	1	

*Angegeben sind die Mittelwerte aus den Angaben zu Gesamtfett- und Fettsäuregehalten einzelner Nahrungsmittel. Eine Übersicht der zugrunde liegenden Daten der ausgewählten Nahrungsmittel, die in die jeweilige Gruppe eingeflossen sind, befindet sich im Anhang Tab. A1 und wurden entnommen aus: Souci Fachmann Kraut - Lebensmitteltablette für die Praxis (DFAL 2004).

Die sensorische Wahrnehmung von Fett wurde bisher hauptsächlich auf seine Textureigenschaften zurückgeführt, aber auch visuelle und olfaktorische Aspekte dienen der Abschätzung des Fettgehalts eines Nahrungsmittels. Im Zusammenhang mit Geschmack wurde Fett als Träger von geschmacksaktiven Aromastoffen bezeichnet, jedoch bisher nicht selbst als geschmacksaktiv oder gar als eigene Geschmacksqualität angesehen. Diese traditionelle Sichtweise hat sich in den letzten Jahren verändert. Ursächlich ist zum einen das Auftreten fettarmer Lebensmittel, welche, trotz vielerlei Bestrebungen das Mundgefühl und Aussehen dieser Produkte an ihre fetthaltigeren Äquivalente anzupassen, dennoch als sensorisch minderwertig empfunden werden. Andererseits wurden neue Erkenntnisse aus Nagetierstudien zur oralen Präferenz von Fettlösungen gewonnen.

Dieses Kapitel soll einen Überblick über die Wahrnehmung von Fetten geben. Dabei werden zunächst die traditionellen Aspekte der Fettwahrnehmung in Kapitel 1.3.1 vorgestellt. Kapitel 1.3.2 wird die Datenlage zur gustatorischen Fettwahrnehmung bei Nagetieren und dem Menschen erörtern, wie sie zu Beginn dieser Arbeit vorlag. Das letzte Kapitel (1.3.3) beschäftigt sich mit der Frage nach einer eigenständigen Geschmacksqualität „fettig“.

1.3.1 Traditionelle Aspekte der Fettwahrnehmung

Bei der Wahrnehmung von Fetten spielen, mehr noch als bei der Wahrnehmung von Bitterstoffen oder Süßstoffen, vielfältige Sinneseindrücke eine Rolle. Sie sind im Besonderen durch ihre Textur-eigenschaften, aber auch ihre olfaktorischen und visuellen Merkmale charakterisiert. Im Gegensatz zu visuellen und olfaktorischen Eigenschaften, sind es gerade ihre textuellen Eigenschaften, die nur schwer von möglichen gustatorischen Eigenschaften zu trennen sind. Ein Grund dafür ist, dass Textur und Geschmack anatomisch gesehen am gleichen Ort, nämlich vorrangig der Zunge, detektiert werden.

Visuelle Eigenschaften von Fetten machen sich beispielsweise durch die weiße Maserung von Fleisch, dem glänzend-öligem Aussehen von frittierten Lebensmitteln oder dem Vorkommen gelblicher „Fettaugen“ in flüssigen Produkten wie Suppen bemerkbar.

Die Wahrnehmung von Fetten oder Fettbestandteilen direkt über die Nase (orthonasal) bzw. den Zugang über den Rachenraum (retronasal) wird durch flüchtige Bestandteile (z.B. Aldehyde wie Hexanal) ausgelöst (Olias et al. 1993). Ranzige Fette sind meist eindeutig über den Geruch von oxidierten Fettsäuren zu erkennen (Chale-Rush et al. 2007a). Die olfaktorische Sensitivität gegenüber nichtoxidierten Fetten bzw. Fettsäuren hingegen ist weniger gut charakterisiert. Ratten reagieren auf den Geruch von Fettsäuren (Capronsäure, Valeriansäure oder auch Buttersäure) in Abhängigkeit von Kettenlänge und Konzentration (Johnson et al. 2002). Weitere Studien zeigten außerdem eine Präferenz für den Geruch von geringen Konzentrationen von pflanzlichem Öl und einzelnen langkettigen Fettsäuren (Ramirez 1993, Tsuruta et al. 1999, Fukuwatari et al. 2003). Auch beim Menschen kann eine neuronale Aktivität nach olfaktorischer Stimulation mit kurzkettigen Fettsäuren (z.B. Caprylsäure, Isovaleriansäure) gemessen werden (Rolls 2004). Ebenso konnten langkettige Fettsäuren (Linolsäure, Ölsäure, Stearinsäure) in sensorischen Studien ortho- und retronasal wahrgenommen werden (Chale-Rush et al. 2007b).

Nach Aufnahme der Nahrung in die Mundhöhle können Fette bzw. der Fettgehalt von Lebensmitteln bis zu einem bestimmten Grad über deren Textureigenschaften wahrgenommen werden (Mela and Christensen 1987). Zu den mit Fetten in Verbindung gebrachten Eigenschaften eines Lebensmittels zählen die Viskosität, Cremigkeit, Öligkeit oder auch Schmierigkeit. Freie Fettsäuren allein können dabei als effektive taktile Stimuli ausreichen (Kadohisa et al. 2005). Verschiedene Transduktionsmechanismen wurden für die taktile Wahrnehmung von Fettsäuren diskutiert. Zum einen könnten sie trigeminale Schmerzrezeptoren aktivieren, da sie reizend wirken (Yu et al. 2012). Zum anderen wurden Fettsäuresensoren (u.a. CD36, GPR120, GPR40, DRK-Kanäle) auf trigeminalen Nervenfasern detektiert (Gilbertson et al. 2010, Yu et al. 2012). Als wahrscheinlichster Mechanismus wird allerdings die Stimulation freier Nervenenden und korpuskulärer Rezeptoren diskutiert (Mattes 2011b). Bei der taktilen Wahrnehmung der Fette spielt die Viskosität möglicherweise die Hauptrolle, jedoch werden auch andere taktile Effekte diskutiert u.a. die Schlüpfrigkeit (*engl.: lubricity*) (Ramirez 1994, Verhagen et al. 2003, Rolls et al. 2003a, De Araujo and Rolls 2004). Nicht zuletzt wird auch das Auslösen von post-ingestiven Effekten durch Fette als Ursache für deren Attraktivität diskutiert. So führt die Aufnahme von Fetten unter anderem durch die Dehnung des Magens (Janssen et al. 2011), aber auch durch die Freisetzung von Inkretinhormonen im Gastrointestinaltrakt zu Sättigungsempfinden (Bray 2000, Karhunen et al. 2008) und über hypothalamische Strukturen zur Aktivierung des Belohnungs- bzw. Endocannabinoidsystems (Taha 2010, Dipatrizio 2014).

Alle oben beschriebenen Sinneswege (visuell, olfaktorisch, taktil) und post-ingestiven Einflüsse sind an der Detektion von attraktiven Sinneseindrücken durch Fette und Fettbestandteile beteiligt bzw. tragen über die Sättigungsregulation und die Ausschüttung von Hormonen zu positiven Effekten nach Aufnahme bei. Allerdings erklären all diese Eigenschaften nicht die gesamte Attraktivität von Fetten bzw. Fettsäuren. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass trotz Vermeidung post-ingestiver Einflüsse z.B. durch Kurzzeit-Präferenztests, Blockierung der olfaktorischen Wahrnehmung und Maskierung der Textureigenschaften sowohl bei Nagetieren als auch beim Menschen eine gewisse Fähigkeit zur Wahrnehmung von Fettsäuren und Ölen erhalten bleibt (s. Kap. 1.3.2 und 1.3.3). Somit stellte sich die Frage, ob auch das gustatorische Sinnessystem einen Beitrag zur Wahrnehmung dieser Nahrungskomponenten leistet.

1.3.2 Gustatorische Wahrnehmung von Fetten bei Nagetieren

Hinweise, dass Fett auch durch gustatorische Mechanismen wahrgenommen werden könnte, ergaben sich in den letzten Jahren hauptsächlich durch elektrophysiologische und Verhaltensexperimente an Nagetieren. Auch für den Menschen gibt es Hinweise aus psychophysiologischen und klinischen Studien, allerdings war die Datenlage zu Beginn dieser Arbeit noch spärlich.

Die orale Detektion von Fetten

Erste Hinweise auf eine orosensorische Wahrnehmung von Fetten unabhängig von post-ingestiven Einflüssen erhielt man aus Studien an Ratten, bei denen eine künstliche Magenfistel¹⁰ angelegt wurde, um postingestive Effekte von aufgenommenen Lösungen zu vermeiden. Diese Tiere wurden einem Zwei-Flaschen-Präferenztest unterzogen, bei dem sie zwischen nutritivem Maiskeimöl oder nicht-nutritivem Mineralöl wählen konnten. Trotz gleicher Textur bevorzugten die Ratten das Triglycerid-haltige Maiskeimöl (Mindell et al. 1990). Außerdem konnten Hiraoka und Kollegen an Ratten, denen der Ösophagus abgeklemmt wurde, um eine gastrointestinale Stimulation zu verhindern, ebenfalls zeigen, dass die kephale Phase der pankreatischen Enzymsekretion nach der oralen Aufnahme von langkettigen Fettsäuren (Öl-, Linol- und Linolensäure) erhöht war (Hiraoka et al. 2003). Keinen Effekt zeigten in diesen Experimenten die mittelkettige Fettsäure Caprylsäure und Derivate der langkettigen Fettsäuren (Methyloleat und Methyllinoleat). Da die kephale Phase der Enzymsekretion auf die Wahrnehmung von Geschmacksstimuli beschränkt ist (Ohara et al. 1988), ist auch dies ein Hinweis auf die Detektion der Fettsäuren durch Geschmacksmechanismen. Weiterhin konnte in Kurzzeit-Präferenztests an anosmischen Ratten gezeigt werden, dass sie eine Ölsäure-Lösung gegenüber der texturangepassten Kontrolllösung bevorzugten (Fukuwatari et al. 2003). Diese Experimente und andere Studien sprechen für eine orale Wahrnehmung von Fetten nach Ausschalten der Geruchswahrnehmung, Texturunterschieden und post-ingestiven Einflüssen.

Fettsäuren als Stimulus der oralen Fettwahrnehmung und Einfluss der lingualen Lipase

Zusätzlich konnten Hiraoka und Kollegen in ihrer Studie an ösophagostomierten Ratten einen Hinweis erbringen, dass vor allem Fettsäuren (u.a. Ölsäure), nicht jedoch das Triglycerid Triolein für die orale Stimulation der kephalen Phase der Enzymsekretion verantwortlich sind (Hiraoka et al. 2003). Auch Tsuruta und Kollegen hatten zuvor bereits in Zwei-Flaschen-Präferenztests gezeigt, dass Ratten langkettige Fettsäuren bevorzugen, nicht jedoch ihre Derivate oder das Triglycerid Triolein (Tsuruta et al. 1999). Allerdings wurden in dieser Studie olfaktorische und postingestive Einflüsse nicht ausgeschlossen. Dass Triglyceride dennoch oral von Ratten wahrgenommen werden und dass dies auf die lipolytische Aktivität der lingualen Lipase zurückzuführen ist, zeigten Studien von Kawai und Kollegen (Kawai and Fushiki 2003). In Kurzzeit-Präferenztests demonstrierten sie zum einen, dass Triglyceride gegenüber der Kontrolllösung von den Tieren bevorzugt werden, zum anderen konnte diese Präferenz durch den Lipase-Inhibitor Orlistat (Guercioli 1997) aufgehoben werden. Hingegen wurde die Präferenz von Fettsäuren nicht beeinflusst. Somit konnte gezeigt werden, dass Fettsäuren und durch Lipolyse freigesetzte Fettsäuren aus Triglyceriden die eigentlichen Stimuli der gustatorischen Wahrnehmung sind. Die linguale lipolytische Aktivität konnte für Nagetiere als sehr viel höher als die der gastrischen Lipase bestimmt werden (DeNigris et al. 1988) und wurde im Gewebe der Von-Ebner-Speicheldrüsen, in geringerem Ausmaß auch im Gesamtspeichel, nachgewiesen (Hamosh and Scow 1973, Hamosh et al. 1979, Field and Scow 1983, Field et al. 1989). Zusätzlich ließ sich zeigen, dass die linguale lipolytische Aktivität (nicht jedoch

¹⁰ Magenfistel: ermöglicht eine Scheinfütterung der Tiere, bei der ein künstlicher Abfluss der aufgenommenen Nahrung durch das Einführen einer Sonde erreicht wird. Die Sonde wird operativ durch die Bauchdecke gelegt. Die aufgenommene Nahrung verlässt hierdurch die Speiseröhre ohne den Magen zu erreichen.

die pankreatische lipolytische Aktivität) durch die Aufnahme von Fett (ab 10 %) über einen Zeitraum von einigen Wochen bei Ratten erhöht wird (Armand et al. 1990).

Fettsäuresensitive Rezeptoren und Transduktionsmechanismen im Geschmackssystem

Nachdem erste Nachweise erbracht wurden, dass Fette, im speziellen Fettsäuren, je nach Kettenlänge und Sättigungsgrad von Nagetieren auch gustatorisch detektiert werden können, stellte sich die Frage nach den Rezeptions- und Transduktionsmechanismen, die diesen Beobachtungen zugrunde liegen. Eine Voraussetzung für die gustatorische Wahrnehmung eines Geschmacksstimulus ist die Präsenz von spezifischen Rezeptoren und Signalweiterleitungsmechanismen in den Zellen des Geschmackssystems (Tucker and Mattes 2012).

Schon Ende der neunziger Jahre konnten Gilbertson und Kollegen mehrere fettsäuresensitive Kaliumkanäle, im Besonderen KCNA5 (DRK1.5), in isolierten Geschmackszellen der Ratte nachweisen (Gilbertson et al. 1997). Weitere Hinweise auf das Vorkommen fettsäuresensitiver Rezeptoren bzw. Transporter in Geschmackszellen von Nagern folgten, unter ihnen CD36/FAT in foliaten und circumvallaten Papillen der Ratte (Fukuwatari et al. 1997, Laugerette et al. 2005) und verschiedene G-Protein gekoppelte Rezeptoren. GPR120/FFAR1 fand sich in allen Geschmackspapillenarten der Ratte, hingegen wurde GPR40/FFAR2 in circumvallaten Papillen der Maus, nicht jedoch der Ratte detektiert (Damak et al. 2007, Matsumura et al. 2007, Cartoni et al. 2010). Beide Rezeptoren, sowie CD36 und KCNA5, sind spezifische Rezeptoren für langkettige Fettsäuren, wobei GPR40 und KCNA5 auch durch einige mittelkettige Fettsäuren aktiviert werden. Zusätzlich wurden auch Rezeptoren für kurzkettige Fettsäuren (GPR41 und GPR43) in foliaten und circumvallaten Papillen der Ratte gefunden (Gilbertson et al. 2010).

Neben der Detektion von Fettsäuren über ein Rezeptorsystem gibt es auch die Möglichkeit der Aufnahme von Fettsäuren durch passive Diffusion in Zellen (Hamilton 1999, Hamilton et al. 2001, Kamp and Hamilton 2006). Die Effektivität dieses Mechanismus wurde für lipophile Süß- und Bittersubstanzen bereits gezeigt (DeSimone 2000, Peri et al. 2000, Zubare-Samuelov et al. 2005). Hierbei erfolgt die Initiierung einer Signalkaskade vermutlich durch direkte intrazelluläre Aktivierung von Transducin bzw. G-Proteinen. Dennoch wurde vermutet, dass, obwohl die Diffusion in Millisekunden bis Sekunden erfolgt (Hamilton et al. 2001), Rezeptor-vermittelte Prozesse dominieren, wenn eine geringe Konzentration an Fettsäuren vorliegt (Baillie et al. 1996).

Auf welche Weise nach Aktivierung eines Rezeptors, Kanals oder Transporters das Signal innerhalb der Geschmackszellen entsteht und zur Depolarisierung der Zellen führt, ist jedoch weniger untersucht und scheint auf verschiedene Mechanismen zurückzuführen zu sein. Durch die Bindung von Fettsäuren an den Kaliumkanal KCNA5 wird der Einstrom von Kalium-Ionen durch Blockade des Rezeptors in offener Konformation ausgelöst bzw. erhalten. Dies wiederum kann zur direkten Depolarisierung oder zur Beibehaltung der Zelle in angeregtem Zustand führen. Gilbertson und Kollegen zeigten eine ausreichende, schnelle Blockade des Kanals an isolierten Geschmackszellen allein durch 10 μ M Fettsäure (Gilbertson et al. 2005). Die Hypothese, dass die Inhibierung von Kaliumkanälen vielmehr modulierend auf die Wahrnehmung anderer Geschmacksqualitäten wirkt und eher keine eigenständige Geschmackswahrnehmung „fettig“ existiert, wurde von Gilbertson und Kollegen aufgestellt (Gilbertson et al. 2005). Sie zeigten, dass die Präferenz für süßschmeckende Saccharin-Lösungen durch den Zusatz von Linolsäure erhöht werden kann. Ähnliches zeigte sich auch für Ölsäure und Glukose- bzw. Saccharoselösungen (Sclafani et al. 2007). Allerdings konnten diese Ergebnisse in selbiger Studie mit einem anderen Rattenstamm und in Studien anderer Arbeitsgruppen nicht repliziert werden (Gilbertson et al. 2005, McCormack et al. 2006).

Eine Aktivierung von Geschmacksrezeptorzellen über einen Ca^{2+} -abhängigen Signalweg wurde in CD36-Knockout-Mäusen gezeigt, die im Vergleich zu Wildtyp-Tieren keinen Fettsäure-stimulierten Anstieg an intrazellulärem Ca^{2+} aufwiesen (Gaillard et al. 2008). Alternativ wurde eine Bereitstellung von Fettsäuren durch CD36 für die Blockade des Kaliumkanals KCNA5 spekuliert (Gilbertson

1998). Nachgewiesen ist jedoch, dass durch den Knockout des CD36-Gens die Präferenz für Fettsäuren in entsprechenden Tieren im Gegensatz zu Wildtyp-Tieren nicht vorhanden ist (Fushiki and Kawai 2005, Laugerette et al. 2005). Diese Beobachtung erwies sich als Fettsäure-spezifisch, da selbige Tiere weiterhin eine Präferenz für Saccharose und eine Abneigung gegenüber Bitterstoffen zeigen (Laugerette et al. 2005).

Auch GPR120- und GPR40-Knockout-Mäuse zeigen einen verminderten, jedoch nicht vollständigen Verlust der Präferenz von Maiskeimöl und Ölsäure (Damak et al. 2007). Diese Unterschiede deuten bereits auf das Vorhandensein eines multiplen Rezeptorsystems zur Detektion einer Vielzahl verschiedener Fettsäuren hin.

Weiterleitung der Fettwahrnehmung über gustatorische Nervenbahnen

Nach der Aktivierung von Geschmackszellen durch einen Stimulus erfolgt die Weiterleitung der Signale über die gustatorischen Nervenbahnen des *N. glossopharyngeus* (GP) und der *Chorda tympani* (CT,) um hiernach in den Geschmackszentren des Gehirns den eigentlichen Geschmackseindruck hervorzurufen (s. Kap. 1.1.4). Auch hierzu wurden Studien an Nagetieren durchgeführt, bei denen die Durchtrennung einer oder beider Nerven (Transsektion) durchgeführt und die Präferenz für Fettsäurelösungen untersucht wurde. Durch den Verlust der Funktion des CT-Nervs verdoppelte sich der Schwellwert zur Detektion von Linolsäure bei Ratten und die Aversion gegenüber Linolsäure in *Conditioned-taste-aversion-Tests*¹¹ ging verloren (Pittman et al. 2006, Stratford et al. 2006). Die Präferenz von Maiskeimöl war allerdings nicht betroffen. Ein vollständiger Präferenzverlust wurde jedoch nicht erwartet, da nur einer der Nerven blockiert wurde. Auch der Funktionsverlust des GP-Nervs führte zum Verlust der Präferenz einer Linolsäure-Lösung im Kurzzeit-Präferenztest (Gaillard et al. 2008). Der Verlust beider Geschmacksnerven beseitigte die Reaktion auf Linolsäure vollständig, ebenso wie die Präferenz für süße Saccharose- und die Vermeidung von bitteren Denatonium-Lösungen (Gaillard et al. 2008). In derselben Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass durch Transsektion der Nerven die Sekretion von pankreatischen Enzymen nach Stimulation reduziert war. Diese Studien sind nicht nur ein weiterer Beleg für die Wahrnehmung von Fettsäuren über den Geschmackssinn, sie weisen auch darauf hin, dass taktile Eigenschaften zur Wahrnehmung von Fetten nicht ausreichend sind, da die Fettsäurepräferenz durch den Funktionsverlust der gustatorischen Nerven ohne Beeinflussung der trigeminalen Nerven eliminiert werden kann (Mattes 2009b, Cartoni et al. 2010).

1.3.3 Gustatorische Fettwahrnehmung beim Menschen

Während die Datenlage für eine gustatorische Wahrnehmung von Fettsäuren bei Nagetieren zu Beginn dieser Arbeit schon recht umfangreich war, so war die Anzahl an Studien hinsichtlich der Geschmackswahrnehmung von Fetten beim Menschen begrenzt und es stellte sich die Frage nach der Übertragbarkeit der gefundenen Mechanismen auf den Menschen.

Sensorische Studien an jungen Erwachsenen zeigten die Wahrnehmung verschiedener Fettsäuren trotz maskierter Textur, der Verwendung von Nasenklammern zur Einschränkung des Geruchssinnes, Rotlicht zur Minimierung von visuellen Eindrücken und nach Desensitivierung gegenüber reizenden Stoffen (Chale-Rush et al. 2007a, Chale-Rush et al. 2007b). Hierbei konnten geringe Konzentrationen der langkettigen Fettsäuren Linol-, Öl- und Stearinsäure von nahezu allen Teilnehmern der Studie erkannt werden. Durch das gleiche Vorgehen konnten in einer weiteren Studie Detektionsschwellwerte zur Wahrnehmung von kurz- (Capronsäure) mittel- (Laurinsäure) und langkettigen (Linol- und Stearinsäure) Fettsäuren zwischen 0,0015 und 0,015 % w/v bestimmt

¹¹ Dieser Test beruht auf dem Prinzip der klassischen Konditionierung, wobei ein Geschmacksstimulus mit den negativen Symptomen eines toxischen Stoffes (z.B. Lithiumchlorid) verbunden wird.

werden (Mattes 2009b). Allerdings wurden die Teilnehmer in diesen Studien nicht nach der Art des Geschmacks befragt. Die Schwellwerte sind somit keine Erkennungsschwellwerte und es ist nicht klar, welche Art Attribut von den Teilnehmern wahrgenommen wurde. In einer Studie von Armstrong wurden daher auch Intensitätsbestimmungen von verschiedenen Konzentrationen einer Fettsäurelösung und die Art des Geschmacksempfindens überprüft (Armstrong 2007). Es stellte sich heraus, dass die Geschmacksintensität in Abhängigkeit von der Konzentration zunimmt. Bei der Beschreibung des Geschmacksempfindens wurden allerdings texturbezogene Attribute (ölig, wachsartig, schleimig usw.) aber auch fettig, sowie andere Geschmacksqualitäten (sauer, bitter, süß) erwähnt. Weiterhin gab es Hinweise auf individuelle Unterschiede hinsichtlich der Sensitivität gegenüber Fettsäuren, welche auf eine Gruppe von sensitiven und weniger sensitiven Probanden gegenüber konjugierten Linolsäuren zurückzuführen war (Tepper and Nurse 1997, Nasser 2001). Als Grund wurde allerdings eine erhöhte trigeminale Innervation diskutiert.

Zu Beginn dieser Arbeit vorliegende Studien zur Fettwahrnehmung über den Geschmackssinn beim Menschen beschränkten sich hauptsächlich auf oben genannte psychophysikalische Studien zur oralen Detektion von Fett und Fettsäuren. Nicht klar war jedoch, ob im Menschen ein System zur Freisetzung von Fettsäuren aus Triglyceriden besteht, wie es anhand der lingualen Lipase von Nagetieren demonstriert wurde. Triglyceride bilden jedoch auch für den Menschen den Hauptanteil der relevanten Fettbestandteile der Nahrung. Bisher wurden sehr unterschiedliche Daten zur Lipaseaktivität im menschlichen Speichel und Von-Ebner-Drüsengewebe veröffentlicht (Hamosh and Burns 1977, DeNigris et al. 1988, Spielman 1990). Auch das Vorkommen eines molekularen Detektionsmechanismus in Geschmacksrezeptorzellen in Form von fettsäuresensitiven Rezeptoren und Transduktionsmechanismen, sowie die Weiterleitung über geschmacksspezifische Nervenfasern, wurden für den Menschen bisher nicht gezeigt. Ähnliche Mechanismen wie bei Nagetieren werden allerdings auch für den Menschen vermutet.

1.4 Zielstellung

Wie oben beschrieben gibt es auch für den Menschen erste Hinweise auf eine gustatorische Wahrnehmung von Fetten bzw. Fettsäuren aus psychophysikalischen Studien. Allerdings war die Datenlage zu Beginn dieser Arbeit sehr begrenzt und es existierten keinerlei Untersuchungen zu den molekularen und histologischen Voraussetzungen für eine gustatorische Detektion von Fetten beim Menschen. Daher war es Ziel, im Rahmen eines umfassenden Clusterprojektes¹² mit Partnern aus Industrie und Forschungseinrichtungen, folgende grundlegende Fragestellungen zu klären: Können Menschen Fette gustatorisch als „fettig“ erkennen? Welche speziellen als „fettig“ wahrgenommenen Stimuli gibt es? Wie werden diese dem Geschmackssystem zugänglich gemacht? Gibt es Fettsensoren im Geschmackssystem des Menschen und welche pharmakologischen Eigenschaften besitzen sie? Wird die Wahrnehmung von Fetten über gustatorische Transduktionsmechanismen vermittelt? Während die sensorischen und pharmakologischen Fragestellungen von den entsprechenden Projektpartnern bearbeitet wurden, war es Ziel dieser Doktorarbeit folgende Aspekte zu untersuchen:

- Die Überprüfung auf das Vorhandensein eines Fettsensorsystems in den Geschmackspapillen und -zellen des Menschen, sowie bei Vorhandensein dessen:
- Die Charakterisierung der Fettsäuresensor-exprimierenden Zellpopulation mittels molekularbiologischer und immunologischer Methoden.
- Die molekularbiologische Untersuchung der Existenz eines lipolytischen Enzymsystems im Geschmacksgewebe zur Freisetzung von Fettsäuren (u.a. den Von-Ebner-Speicheldrüsen), nachdem sich im Laufe der Untersuchungen freie Fettsäuren als gustatorisch aktive Stimuli erwiesen.
- Die Untersuchung der Übertragung von Informationen zur Fettwahrnehmung auf gustatorische Nervenbahnen über das P2X-Rezeptorsystem im Rahmen einer Pilotstudie über die Wirkung eines P2X₃-Antagonisten auf die Präferenz von Fettsäurelösung im Kurzzeitpräferenz-Test an der Maus als Modellorganismus.

Der Nachweis der Erfüllung molekularer und histologischer Voraussetzungen zur Fettwahrnehmung im Geschmackssystem des Menschen, wäre eine Grundlage für das Vorhandensein einer gustatorischen Wahrnehmung von Fetten und damit einer möglichen weiteren Geschmacksqualität „fettig“. Ebenso können diese Erkenntnisse einen neuen Ansatzpunkt für das Verständnis der Fettwahrnehmung und Regulation der Fettaufnahme beim Menschen bilden. Dies wiederum ist Voraussetzung zur Klärung der Ursachen für eine überhöhte Aufnahme von Fetten, eine mangelnde Akzeptanz von fettreduzierten Produkten und eröffnet Möglichkeiten zur Entwicklung sensorisch ansprechender fettreduzierter Lebensmittel und damit zur Bekämpfung von Übergewicht und assoziierten Krankheiten.

¹² DFG/AiF-Clusterprojekt „Fettwahrnehmung und Sättigungsregulation: Ansatz zur Entwicklung fettreduzierter Lebensmittel.“

2 Methoden

In diesem Kapitel werden die für diese Arbeit verwendeten Methoden beschrieben. Dabei kamen zum einen molekularbiologische Untersuchungen zur RNA- (Kap. 2.1) und Protein-Expression (Kap. 2.2) von Fettsensoren und lipolytischen Enzymen im menschlichen Geschmackssystem zum Einsatz. Zum anderen wurde in einer tierexperimentellen Pilotstudie (Kap. 2.3) die neuronale Weiterleitung der Fettwahrnehmung über P2X-Rezeptoren an den Geschmacksnerven untersucht. Die für diese Arbeit verwendeten Materialien sind dem Anhang zu entnehmen.

2.1 Untersuchungen zur RNA-Expression

Im Rahmen der Untersuchung der RNA-Expression von Fettsensoren und lipolytischen Enzymen wurde zunächst die Methode der RT-PCR (Kap. 2.1.1 bis 2.1.5) für ein erstes Screening des Gewebes genutzt. Um die Expression auf zellulärer Ebene genauer zu charakterisieren wurde die RNA mit Hilfe der *In-situ*-Hybridisierung (Kap. 2.1.9 und 2.1.10) direkt im Gewebe sichtbar gemacht. Zur Herstellung der Sonden (Kap. 2.1.8) für die *In-situ*-Hybridisierung bzw. für die Sequenzierung von PCR-Produkten (Kap. 2.1.7) wurden ebenfalls diverse Methoden im Rahmen von Klonierungsexperimenten (Kap. 2.1.6) angewandt. Diese werden im Folgenden beschrieben.

2.1.1 Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Geweben

Die in dieser Arbeit verwendete Phenol-Chloroform-Guanidiniumthiocyanat-Methode zur Extraktion von RNA aus Gewebematerial basiert auf den Grundlagen von Chomczynski und Sacchi [1987]. Das verwendete humane Biopsiegewebe wurde, nach Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, in noch gefrorenem Zustand in $500\text{ }\mu\text{l}$ TRIzol überführt und mit Hilfe eines hochfrequenten Gewebelysiergerätes homogenisiert, wobei der Aufschluss der Zellen durch eine in der Suspension befindliche Metallkugel unterstützt wurde. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) folgte die Extraktion durch Zugabe von $100\text{ }\mu\text{l}$ Chloroform, dreiminütiger Inkubation bei RT und Zentrifugation bei $12.000\times g$ für 15 min und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bei dieser Methode kommt es zur Phasenbildung zwischen wässriger RNA-haltiger Phase (oben) und Protein-haltiger saurer Phenol-Chloroform-Phase (unten). Die wässrige Phase wurde sorgfältig abgenommen und mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt. Nach 10 min Inkubationszeit wurde die RNA durch zentrifugieren bei $12.000\times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das zurückbleibende Pellet mit $75\text{ }\%$ -iger Ethanollösung gewaschen. Einer weiteren Zentrifugation ($12.000\times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 min) folgend, wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet in einer Vakuumzentrifuge für $3\text{-}6\text{ min}$ getrocknet. Schließlich wurde die aufgereinigte RNA in RNase-freiem ddH_2O aufgenommen. Die Quantität und Qualität der isolierten RNA wurde durch photometrische Messung (Kap. 2.1.2) und Visualisierung auf einem denaturierenden Agarosegel (Kap. 2.1.3) ermittelt. Die Lagerung der RNA-Proben erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.1.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit wässriger Nukleinsäurelösungen wurde photometrisch anhand der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt: $\text{Konzentration } c\text{ (ng}/\mu\text{l}) = A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Absorptionskoeffizient}$ (doppelsträngige DNA $50\text{ ng}/\mu\text{l}$; einzelsträngige RNA $40\text{ ng}/\mu\text{l}$). Das Verhältnis der gemessenen Extinktionen A_{260}/A_{280} gibt Auskunft über die Reinheit der Probe.

2.1.3 Denaturierende und nicht-denaturierende Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung und Visualisierung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe. Die Visualisierung erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid. Die Intensität der Fluoreszenz unter UV-Licht ist abhängig von der Konzentration des Ethidiumbromids, welches in Nukleinsäuresträngen interkaliert.

Zur Darstellung von DNA bzw. cDNA wurde dabei auf einfache, nicht-denaturierende Gele zurückgegriffen, wobei die Agarose (1-2 % w/v) zur Herstellung der Gele in 1x TAE-Puffer durch mehrmaliges Aufkochen gelöst, mit 0,06 µg/ml Ethidiumbromid versetzt wurde und ca. 20 min in einer Gelkammer erkaltete. Als Laufpuffer in der Elektrophoresekammer diente 1xTAE mit 0,06 µg/ml Ethidiumbromid. Alle Proben wurden in einem Verhältnis von 1:6 mit 6x -Lade-Puffer auf das Gel aufgetragen. Die angelegte Spannung richtete sich nach dem Abstand der Elektroden (bspw. 80–100 V bei 20 cm Elektrodenabstand) und die Laufzeit nach dem gewünschten Auftrennungsgrad. Sie betrug zwischen 30 und 90 Minuten. Die Auswertung der Gele erfolgte mit dem „Gene Genius“-Bio-Imaging-System.

Zur Auftrennung und Visualisierung von RNA (Abb. 6), wurden denaturierende Gele sowie Laufpuffer hergestellt, welche anstelle von 1xTAE-Puffer Formaldehyd-haltigen MOPS-Puffer enthielten. Es wurde 500-1000 ng RNA-Probe aufgetragen, wobei 6x-Ladepuffer mit der Probe im Verhältnis 1:5 versetzt und dieses Gemisch zunächst 10 min bei 65 °C erhitzt wurde, um es hiernach direkt mit Ethidiumbromid im Verhältnis 1:6 zu mischen, da es bei dieser Art Elektrophorese weder dem Gel noch dem Laufpuffer zugesetzt wurde.

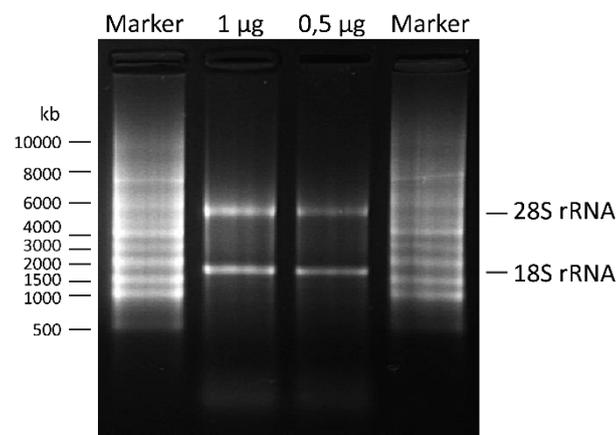


Abb. 6: RNA-Extrakt einer humanen Wallpapille. Zur Kontrolle der RNA-Qualität wurden 1 bzw. 0,5 µg des aufgereinigten Extraktes auf ein denaturierendes 2%-iges Agarosgel aufgetragen. Zu erkennen sind 28S und 18S ribosomale RNA, welche beim Menschen eine Größe von 5 und 1,9 kb besitzt. Im unteren Bereich sind schwach weitere häufige RNA Spezies (< 200 kb) zu erkennen. Größenstandard: 0,5 – 10 kb RNA Marker (Invitrogen).

2.1.4 Synthese von cDNA aus RNA

In den gewonnenen RNA-Proben des humanen Biopsiematerials sollte die mRNA-Expression von Fettsäuresensoren und lipolytischen Enzymen überprüft werden. Dazu wurde die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben, um sie dann mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (Kap. 2.1.5) auf spezifische cDNA-Spezies untersuchen zu können.

Die RNA-Proben wurden zunächst einem DNase-I-Verdau unterzogen, um im RNA-Extrakt verbliebene DNA-Rückstände zu entfernen. Hierfür wurden 1,5 µg RNA in einem Gemisch bestehend aus 1 µl DNase I, 1,5 µl 10x DNase-I-Puffer, 1,5 µl DTT (10 mM), 0,25 µl RNase-Inhibitor sowie ddH₂O zu einem Gesamtvolumen von 15 µl zusammengeführt und bei RT inkubiert. Nach 30 min erfolgte

ein Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 1,25 µl EDTA und einer Hitzebehandlung (65 °C, 10 min). Für die cDNA-Synthese wurde die zuvor behandelte RNA-Lösung mit 1,5 µl Random Primer (250 ng/µl) und 1,5 µl dNTPs (1 mM) versetzt, zur Auflösung von Sekundärstrukturen für 5 min auf 65 °C erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt. Weiterhin wurden dem Gemisch 6 µl 5x Erststrangpuffer, 2,85 µl DTT (100 mM), 1,275 µl MgCl₂ (25 mM) sowie 0,375 µl RNase-Inhibitor beigemischt. Anschließend wurde der Probenansatz geteilt (je 14,5 µl). Der Kontrollansatz (-RT) blieb frei von Reverser Transkriptase (diese wurde durch die entsprechende Menge ddH₂O ersetzt), während dem eigentlichen Ansatz (+RT) 1,5 µl Superscript II Reverse Transkriptase zugesetzt wurde. Beide Ansätze wurden für das Binden der Oligonukleotide 10 min bei RT inkubiert und dann der Transkriptionsreaktion (42 °C, 2 h) im Thermocycler unterzogen. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte im Anschluss durch Erhitzen der Proben auf 70 °C für 15 min und Abkühlung auf 4 °C. Die Qualität der synthetisierten cDNA wurde durch Amplifikation (Kap. 2.1.5) des Haushaltsgens GAPDH kontrolliert. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

2.1.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR (von engl. *Polymerase Chain Reaction*) ist eine Methode zur Amplifikation von spezifischen DNA-Abschnitten und wurde von der Arbeitsgruppe um Kary Mullis in den 80er Jahren entwickelt [Mullis *et al.* 1986]. Unter Verwendung einer thermostabilen Polymerase und dem Durchlaufen mehrerer Temperaturzyklen (bestehend aus Denaturierungs-, Primeranlagerungs- und Verlängerungsphase) erfolgt eine Amplifikation der Matrizen-DNA theoretisch um den Faktor 2ⁿ, wobei n die Anzahl der durchlaufenen Zyklen darstellt. Die PCR wurde in dieser Arbeit vorrangig zur Untersuchung der mRNA-Expression von Fettsensoren und lipolytischen Enzymen im humanen Geschmacksgewebe genutzt. Zur Überprüfung der Amplifikationseffizienz und Spezifität der Primerpaare kamen auch Plasmide als Matrize zum Einsatz, die ursprünglich für die Expression der Fettsensoren im Rahmen von Calcium-Imaging-Analysen hergestellt wurden und daher die komplette Sequenz der Rezeptoren enthielten. Zur Kontrolle der Funktionalität der Primerpaare an cDNA aus Geweben und später auch zur Kontrolle des eigentlichen PCR-Experiments, wurden ferner cDNAs aus verschiedensten Geweben als Matrize genutzt, für die bekannt war, dass sie den jeweiligen Fettsensor exprimieren.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten PCRs wurde entweder *Taq*-DNA-Polymerase (Elongationstemperatur T_E = 68 °C) der Firma 5PRIME oder *Pfu*-DNA-Polymerase (T_E = 70 °C) der Firma Clontech eingesetzt, von denen die *Pfu*-Polymerase eine höhere Sequenzgenauigkeit bei der Vervielfältigung durch ihre sogenannte *Proof-reading* (dt. Korrekturlese-) Aktivität besitzt. Sie wurde hauptsächlich für die Klonierung und Herstellung von *In-situ*-Hybridisierungs sonden genutzt, bei denen eine korrekte Sequenz der aufgereinigten PCR-Produkte unerlässlich ist um eine spezifische, sensitive Bindung an die Ziel-RNA im Gewebe zu gewährleisten. Die entsprechenden Enzymgemische für die PCR setzten sich wie folgt zusammen:

1,0 µl Matrizen-DNA	
2,5 µl 10x Enzym-spezifischer Puffer	
2,0 µl dNTPs (jeweils 2,5 mM)	
0,5 µl Vorwärts-Primer (10 µM)	
0,5 µl Rückwärts-Primer (10 µM)	
0,25 µl DNA-Polymerase	
<u>18,25 µl UV-bestrahltes ddH₂O</u>	
25 µl	

Die Komponenten wurden auf Eis angesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde erst in die PCR-Maschine überführt, nachdem diese auf 95 °C hochgeheizt war (sog. *HOT-Start*). Nach einer initialen fünfminütigen Denaturierung setzte sich das Temperaturprogramm folgendermaßen fort:

1. 95 °C 0,5 min Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Matrize
 2. T_A 1,0 min Primeranlagerung: bei Primer-spezifischer *Annealing*-Temperatur
 3. T_E 1,0 min DNA-*Verlängerung* : bei Polymerase-spezifischer *Elongations*-Temperatur
- Schritte 1-3 wurden 39-mal (bzw. 29-mal für das Haushalts-Gen GAPDH) wiederholt. -
4. T_A 5,0 min finales *Annealing*
 5. T_E 10,0 min finale *Elongation*
 6. 4 °C ∞ Kühlung bis zur weiteren Bearbeitung

Nach Beendigung der PCR wurden die PCR-Produkte auf einem Agarosegel aufgetrennt (Kap. 2.1.3) und mit dem „Gene Genius“-Bio-Imaging-System ausgewertet.

Für die PCR selbst und zum Verdünnen aller PCR-Bestandteile wurde UV-Licht-bestrahltes ddH₂O zur Vorbeugung von DNA-Kontaminationen verwendet. Auch Pipetten und Reaktionsgefäße wurden in regelmäßigen Abständen UV-bestrahlt.

Für einige der entworfenen Primerpaare musste die PCR hinsichtlich der Sensitivität, und damit einhergehender Anpassung der Komponenten des Enzymgemischs (u.a. Menge an zusätzlichem MgCl₂, Primerkonzentration) bzw. Anpassung der *Annealing*- und *Elongations*-schritte (Länge und Temperatur), optimiert werden. Als Ausgangspunkt für die *Annealing*-Temperatur wurde eine um 5-10 °C geringere Temperatur als die vom Hersteller angegebene Schmelztemperatur der Oligonukleotide gewählt.

2.1.6 Klonierung von PCR-Produkten

Die in der PCR erhaltenen Fragmente sollten zum einen als Ausgangspunkt für die Herstellung von Sonden zur *In-situ*-Hybridisierung (im Falle der Untersuchungen zur zellulären Expression lipolytischer Enzyme) dienen, zum anderen wiesen einige PCR-Reaktionen zusätzliche, wiederkehrende Banden im Gel auf. Diese sollten auf ihre Sequenz hin untersucht werden, um herauszufinden, ob es sich um Varianten der Rezeptoren/Enzyme oder unspezifische Nebenprodukte handelte.

Zu diesem Zweck wurden die PCR-Produkte aus dem Gel aufgereinigt (Kap. 2.1.6 Aufreinigung) und, je nach vorheriger Amplifikation mit *Taq*- oder *Pfu*-DNA-Polymerase, in *pTOPO-TA* bzw. *pTOPO-blunt*-Vektoren eingebracht (Kap. 2.1.6 Ligation). Die korrekte Integration wurde anhand eines Restriktionsverdau (Kap. 2.1.6 Restriktionsverdau) kontrolliert. Plasmide aus positiven Bakterienklonen wurden zur Sequenzierung (Kap. 2.1.7) verschickt. Die Vervielfältigung der Plasmide erfolgte durch Transformation kompetenter Bakterien, Kultivierung und Aufreinigung aus diesen (Kap. 2.1.6).

Sollten die Sequenzen zur Herstellung von *In-situ*-Hybridisierungs-Sonden genutzt werden, wurden sie umklont in einen *pBluescript*-Vektor, welcher zu diesem Zweck T3- bzw. T7-RNA-Polymerase-Promotoren enthielt. Dabei wurden die spezifischen Sequenzen der lipolytischen Enzyme aus den *pTOPO*-Vektoren durch Restriktionsverdau ausgeschnitten und in den zuvor ebenfalls geschnittenen, dephosphorylierten *pBluescript*-Vektor durch Ligation (Kap. 2.1.6) eingebracht. Es erfolgte ebenso eine Vervielfältigung über Transformation, Kultivierung und Aufreinigung aus kompetenten Bakterien, ein Kontrollrestriktionsverdau (Kap. 2.1.6) des entstandenen Vektors und die Sequenzierung (Kap. 2.1.7) zur Überprüfung der Korrektheit der Sequenz.

Aufreinigung von PCR-Produkten aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von PCR-Produkten aus Agarosegelen erfolgte mit dem High Pure PCR-Product Purification Kit von Roche Applied Sciences nach Angaben des Herstellers. Die Gele wurden zur Visualisierung der Banden auf eine UV-Apparatur gelegt, die Banden ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Danach erfolgte die Aufreinigung der PCR-Produkte aus diesen Gelstücken basierend auf dem Prinzip der selektiven Bindung von DNA an Silikat-Material in Anwesenheit des chaotropen Salzes Guanidiniumthiocyanat. Aufgereinigte PCR-Produkte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Restriktionsverdau

DNA-Produkte wurden mit Restriktionsendonukleasen verdaut um sie zu charakterisieren bzw. ihre Integration in Vektoren zu kontrollieren (analytischer Restriktionsverdau) oder für ihre Klonierung aufzubereiten (präparativer Restriktionsverdau). Dafür wurden verschiedene Enzyme der Firma MBI Fermentas im Universalpuffersystem von Fermentas verwendet. Die DNA-Lösung wurde gegebenenfalls mit Wasser verdünnt und nach der Zugabe von Puffer und Enzym(en) bei 37 °C für 30-180 min verdaut.

Dephosphorylierung des *pBluescript*-Vektors

Die Dephosphorylierung des geschnittenen, aufgereinigten *pBluescript*-Vektors erfolgte mit Shrimp-Alkalische-Phosphatase (SAP), mit der der Ansatz für 1 h bei 37 °C inkubiert wurde. Anschließend wurde der verdaut, dephosphorylierte Vektor direkt auf einem Agarosegel aufgetrennt, daher entfiel die Hitzeinaktivierung der Phosphatase. Nach Aufreinigung aus dem Gel konnte die Ligation mit entsprechenden DNA-Fragmenten erfolgen.

Ansatz für die Dephosphorylierung von Vektor-DNA:

x µl verdauter Vektor-DNA (5 µg)

ad 25 µl ddH₂O

2 µl SAP (1 U/µl)

3 µl 10x SAP-Puffer

Σ 30 µl

Ligation

Für die Ligation wurden restriktionsverdaut, über Agarosegelelektrophorese aufgereinigte DNA-Fragmente und Vektoren verwendet. Die *pBluescript*-Vektor-DNA wurde vor der Ligation dephosphoryliert.

Ansatz für die Ligation von Vektor- und Fragment-DNA:

6 µl Fragment-DNA

2 µl Vektor-DNA (ca. 0,05 µg/µl)

1 µl T4-DNA-Ligase (400 U/µl)

1 µl 10x T4-DNA-Ligase Puffer

Σ 10 µl

Anschließend wurden 1,5 µl des Ansatzes zur Vervielfältigung für die Transformation kompetenter Bakterien verwendet (Kap. 2.1.6).

Transformation kompetenter Bakterienzellen

Für die Vervielfältigung der angefertigten Plasmid-DNA-Konstrukte wurden kompetente *E.coli TOP10* oder *E.coli BIOblue 10⁻⁹* transformiert. Die Anzucht und Selektion der transformierten Bakterien erfolgte auf ampicillinhaltigen (100 µg/ml) LB-Agarplatten. Zur Aufreinigung der Plasmid-DNA wurden danach einzelne Kolonien in flüssiges ampicillinhaltiges LB-Medium überimpft. Für die Transformation wurden 50 µl Bakteriensuspension mit 1,5 µl Ligationsprodukt gemischt und nach Angaben der Hersteller behandelt. Meist bedeutete dies die Suspension für 30 min auf Eis zu lagern, die Bakterien einem Hitzschock durch 45 s Inkubation im Wasserbad bei 42 °C zu unterziehen, erneut auf Eis zu stellen und 1 h bei 37 °C in SOC-Medium auf einem Schüttler (200 rpm) anzuziehen, bevor die Kultur auf entsprechenden Platten angeimpft wurde.

Sollten Bakterienklone aufbewahrt werden, wurden diese in Glycerinkultur bei -80 °C gelagert. Dazu wurde aus einer 5-ml-Kultur des gewünschten Klon 1,275 ml Kulturlösung mit 225 µl Glycerin (20%) vermischt und sofort eingefroren.

Isolation von Plasmid-DNA

a) Isolation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab (TELT)

Um eine größere Anzahl von Klonen präparieren und analysieren zu können, wurde ein Plasmid-DNA-Isolations-Protokoll ohne Aufreinigung an Silikatmembranen verwendet. Es handelt sich dabei um eine verkürzte Version des TELT-Protokolls zur Plasmidpräparation im Mini-Maßstab von He und Kollegen (He et al. 1990), mit dem Plasmid-DNA in für Restriktionsanalysen hinreichender Qualität isoliert wird. Dazu wurden 500 µl der dicht bewachsenen Bakterienkultur bei 16.000xg für 1 min zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Das Bakterien-Pellet wurde in 42 µl Tris-EDTA-LiCl-Triton-Puffer und 4,2 µl Lysozym (10 mg/ml) lysiert und anschließend im Heizblock bei 100 °C für 1 min erhitzt. Nachdem die Proben auf Eis abgekühlt waren, wurden sie 10 min bei 16.000xg zentrifugiert und das dabei entstandene Pellet verworfen. Der Überstand wurde mit 46,2 µl Isopropanol vermischt. Die dabei gefällten Nukleinsäuren wurden bei 16.000xg 20 min abzentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 16.000xg). Die Proben wurden in einer Vakuumzentrifuge 5 min getrocknet und zur weiteren Verwendung in 10 µl UV-bestrahltem ddH₂O gelöst.

Für einen analytischen Restriktionsverdau der TELT-Präparation wurde RNase A zu einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugegeben. Damit wurde störende RNA entfernt, was die Sichtbarkeit kleiner DNA-Fragmente bei der Agarosegelelektrophorese verbessert.

b) Isolation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab

Die Verwendung von Plasmid-DNA für Sequenzierung und Transfektion eukaryotischer Zelllinien erfordert einen deutlich höheren Reinheitsgrad als mit TELT-Minipräparationen erreicht werden kann. Die reinere Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA (bis zu 25 µg) wurde mit Hilfe von Silikat-Membranen realisiert. In Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze bindet DNA an Silikat-Material und kann nach dem Auswaschen unerwünschter Komponenten mit Lösungen geringer Salzkonzentration, wie ddH₂O oder Tris-EDTA-Puffer, eluiert werden. Nach Anweisung des Herstellers wurde Plasmid-DNA aus 4 ml Bakterienkultur (Präparation im Mini-Maßstab) mit Hilfe des „NucleoSpin® Plasmid Kit“ (Macherey-Nagel) isoliert. Große Mengen reiner Plasmid-DNA (bis zu 500 µg, Präparation im Midi- oder Maxi-Maßstab) wurden mit dem „Nucleo-Bond® PC Plasmid DNA Purification Kit“ (Macherey-Nagel) nach Anweisung des Herstellers isoliert. Die Konzentration der Plasmide wurde UV-spektrophotometrisch bestimmt (Kap. 2.1.2)

2.1.7 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon (Martinsried). Entsprechend der Anweisung der Firma wurden 1 µg DNA und 30 pmol Primer zu einem Endvolumen von 15 µl in ddH₂O gelöst und der Firma zugesandt. Jedes Vektor-Konstrukt wurde jeweils mit einem vorwärts und einem rückwärts gerichteten Primer sequenziert, um die DNA beidsträngig zu analysieren. Für die Sequenzierung von *pBluescript*- und *pTOPO*-Vektoren wurden jeweils M13 vorwärts/rückwärts-Primer genutzt. Sollten auf *pcDNA5/FRT* basierende Vektorkonstrukte sequenziert werden, kamen CMV- (vorwärts) und BGH-Primer (rückwärts) zum Einsatz. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm ContigExpress aus dem VectorNTI-Softwarepaket.

2.1.8 Herstellung von RNA-Sonden

Zur Untersuchung der Expression lipolytischer Enzyme in humanem Geschmacksgewebe wurde in dieser Arbeit neben der Methode der PCR auch die Methode der *In-situ*-Hybridisierung durchgeführt, um die Expression der mRNA auf zellulärer Ebene zu betrachten und morphologisch charakterisieren zu können.

Die *In-situ*-Hybridisierung beruht dabei auf dem Nachweis spezifischer mRNA-Spezies durch die Hybridisierung mit Sonden-RNA. Diese ist komplementär zur nachzuweisenden mRNA und kann über eine Digoxigeninmarkierung der Sonde und immunologische Digoxigenin-Detektion nachgewiesen werden. Die Herstellung der Sonden erfolgte in dieser Arbeit über die *In-vitro*-Transkription (Kap. 2.1.8) der Zielsequenz aus einem durch Restriktionsverdau linearisierten (Kap. 2.1.8) *pBluescript*-Vektor-Konstrukt, einem folgenden DNase-Verdau zur Eliminierung der DNA-Matrize und nachfolgende Aufreinigung der RNA-Sonde über Ammoniumacetat-Ethanol-Präzipitation (Kap. 2.1.8).

Linearisierung von Vektor-Konstrukten

Die Linearisierung der *pBluescript*-Vektorkonstrukte erfolgte je nach Konstrukt mit Hilfe unterschiedlicher Restriktionsenzyme. Zur Herstellung der T7-Sonde wurde das jeweilige Konstrukt mit dem Enzym XhoI geschnitten. Bei der Herstellung der T3-Sonden kamen die Enzyme SpeI (Lipase-K-Konstrukt), XbaI (Lipase-M-Konstrukt) und NotI (Lipase-N-Konstrukt) zum Einsatz. Folgender Ansatz wurde für die jeweilige Linearisierung verwendet:

10 µg *pBluescript*-Vektorkonstrukt
ad 32 µl ddH₂O
4 µl Restriktionsenzym
4 µl 10x Puffer
40 µl

Der Ansatz wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 3 µl EDTA und zehninütiges Erhitzen bei 65 °C inaktiviert.

In-vitro-Transkription

Bei der *In-vitro*-Transkription wurde ausgehend von den DNA-Sequenzen der lipolytischen Enzyme, die zuvor in den *pBluescript*-Vektor kloniert wurden, einzelsträngige digoxigeninmarkierte cRNA synthetisiert. Hierbei kamen RNA-Polymerasen zum Einsatz, die aus den Bakteriophagen T3 und T7 stammen. Die T7-RNA-Polymerase wurde zur Synthese einer einzelsträngigen RNA-Sonde genutzt, die die gleiche Sequenz wie die mRNA der Lipasen aufweist und somit nicht an die mRNA

binden kann. Diese Sonde wird im Folgenden „sense“-Sonde genannt. Die T3-RNA-Polymerase hingegen synthetisiert eine einzelsträngige RNA-Sonde, die komplementär zur mRNA der Lipasen ist und somit an diese binden kann. Bei dieser Sonde handelt es sich um die als „antisense“ benannte Sonde. Die beiden *In-vitro*-Transkriptions-Ansätze (T3 und T7) wurden wie folgt bei Raumtemperatur angesetzt:

1 µg linearisierter *pBluescript*-Lipase-Vektor
 ad 14 µl ddH₂O
 2 µl 10x Transkriptionspuffer
 2 µl 10x RNA-Digoxigenin-Labeling-Mix
 1,75 µl T3- bzw. T7-Polymerase
0,25 µl RNase Inhibitor
 20 µl

Die *In-vitro*-Transkriptions-Ansätze wurden für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert, anschließend je Ansatz 1 µl RNase-freie DNase I hinzugegeben und ein 30-minütiger DNase-I-Verdau zur Eliminierung der Vektor-Matrize bei 37 °C im Wasserbad durchgeführt.

Ammoniumacetat-Ethanol-Präzipitation

Nachdem die *In-vitro*-Transkriptions-Reaktion durch Abkühlung auf Eis abgestoppt wurde, wurden je Ansatz Ammoniumacetat zu einer Endkonzentration von 2 M zugegeben. Nach sorgfältigem Mischen wurde das Zweifache des Volumens an 100 % Ethanol zugesetzt. Der sorgfältig gemischte Ansatz wurde eine Stunde bei -80 °C oder über Nacht bei -20 °C gekühlt. Die Pelletierung der RNA erfolgte durch Zentrifugation für 20 min bei 15.000xg und 4 °C. Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurde das Pellet mit 100 µl 80 % Ethanol gewaschen und 5 min bei 15.000xg und 4 °C erneut pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 3-6 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Aufnahme des Pellets erfolgte in 20 µl DEPC-H₂O. Nach einer zweiten Präzipitationsrunde wurden 2 µl Sonde mit 4 µl 6x Ladepuffer auf ein 1,5-%iges Agarosegel aufgetragen und für 30 min bei 80 V gelelektrophoretisch aufgetrennt, um die Qualität der Sonde zu kontrollieren. Die Konzentration der Sonden wurde UV-spektrophotometrisch bestimmt (Kap. 2.1.2).

2.1.9 *In-situ*-Hybridisierung

Mit Hilfe der *In-situ-Hybridisierung* (ISH) lassen sich Nukleinsäuren in der Zelle am histologischen Schnittpräparat nachweisen. Sie birgt - im Unterschied etwa zur PCR-Technik - den Vorteil, dass nicht nur ein qualitativer Nachweis der Expression erbracht wird, sondern vielmehr die Signalgebung auch eine Lokalisation der Expression auf zellulärer Ebene erlaubt. Bei der ISH werden einzelsträngige Nukleinsäuren, die mit einer Markierung versehen wurden, als sogenannte Sonden eingesetzt. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten ISH wurden digoxigeninmarkierte Sonden verwendet, die mit Hilfe eines Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Anti-Digoxigenin-Antikörpers und entsprechendem Farbsubstrat (NBT-BCIP-Gemisch) nachgewiesen werden konnte.

Am ersten Tag wurden die Schnitte bei Raumtemperatur vorbehandelt. 10-µm-(Gefrier-)Schnittpräparate (Kap. 2.2.2) von Wallpapillen und anhängendem Drüsengewebe des Menschen, wurden 5 min mit 4 % Paraformaldehyd in 1xPBS und 1 mM MgCl₂ (pH 7,2) zur Fixierung des Gewebes behandelt. Nach einem Waschschrift mit 1xPBS wurde das Gewebe durch Inkubation in 0,2 M HCl für 10 min und anschließender Behandlung mit 1 % Triton X-100 in 1xPBS für 2 min permeabilisiert. Um positive Ladungen im Gewebe zu maskieren, wurden die Schnitte 10 min mit 0,1 M

Triethanolamin (pH 8,0) und 0,25 % Essigsäureanhydrid behandelt und einem weiteren Waschschriff unterzogen.

Für die Prähybridisierung wurde Prähybridisierungslösung bei 85 °C für 10 min erhitzt und je 500 µl auf die vorbehandelten Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden in einer Hybridisierungskammer, welche 100 ml 50 % Formamid enthielt für 5 h bei 50 °C prähybridisiert. Für die Hybridisierung wurden je Schnitt 100 µl Hybridisierungslösung, welche zusätzlich 10 % Dextran-sulfat enthielt, mit 5 - 10 µl (40 bis 80 ng) Sonde versetzt und 10 min bei 85 °C inkubiert. Die Prähybridisierungslösung wurde von den Schnitten ablaufen gelassen und es wurde die in Hybridisierungslösung gelöste Sonde auf den jeweiligen Schnitt gegeben. Die Schnitte wurden dann mit Deckgläschen bedeckt und über Nacht bei 50 °C in der luftdicht-verschlossenen Formamid-Kammer inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden die Deckgläser von den Schnitten abgleiten gelassen und es wurde dreimal 5 min mit 2xSSC bei Raumtemperatur gewaschen. Es folgte ein 30-minütiger RNase-Verdau bei 37 °C in RNase-Puffer, sowie ein 15-minütiger Waschschriff mit 0,4x SSC bei RT, gefolgt von zwei Waschschriffen mit 0,4x SSC bei 50 °C für jeweils 30 min. Im Folgenden wurden die Schnitte durch kurze Behandlung mit 1x Puffer 1 für 5 min bei RT äquibriert und mit 500 µl 1 % Puffer 2 je Schnitt bei RT für 1 h blockiert. Die Inkubation mit dem gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper (1:750 in 1 % Puffer 2), der mit Alkalischer Phosphatase konjugiert war, erfolgte ebenfalls in der Feuchtkammer bei RT für 1 h. Nach zweimaligem Waschen á 30 min bei RT in Puffer 1 folgte eine fünfminütige Äquibrierung der Schnitte bei RT mit Puffer 3. Die Farbreaktion fand über Nacht mit 500 µl Farbreaenz je Schnitt in der Feuchtkammer bei RT im Dunklen statt. Am nächsten Tag wurde die Reaktion durch fünfminütige Inkubation mit TE-Puffer gestoppt und die Schnitte mit Eindeckmedium eingedeckt. Bis zur Auswertung am MIRAX-Scansystem wurden die Schnitte bei 4 °C dunkel gelagert.

2.1.10 *Dotblot*-Hybridisierung

Die *Dotblot*-Hybridisierung wurde in dieser Arbeit genutzt, um die Digoxigenin-markierten RNA-Sonden auf ihre Hybridisierungseffizienz zu überprüfen und das Hybridisierungsverhalten der „anti-sense“-Sonde im Vergleich zur „sense“-Sonde zu beurteilen. Hierfür wurden die Sonden, die zuvor in der ISH für den Nachweis der Expression lipolytischer Enzyme in humanem Geschmacksgebe verwendet wurden, auf einer Nylon-Membran mit den zur Sondenherstellung genutzten *pBluescript*-Vektorkonstrukten hybridisiert.

Es wurden auf ca. 1,5 x 0,6 cm große Stücke einer positiv geladenen Nylon-Membran (Hybond-N+) jeweils 1 µl der Plasmidlösungen mit folgenden Konzentrationen als Tropfen aufgebracht: 1 ng/µl, 100 pg/µl, 10 pg/µl und 1 pg/µl. Die Membranen wurden an der Luft getrocknet und jeweils in 0,5-ml-Reaktionsgefäße überführt. Daraufhin wurden sie mit jeweils 500 µl Denaturierungspuffer 5 min bei RT inkubiert, um die doppelsträngige Plasmid-DNA zu Einzelsträngen zu denaturieren. Anschließend wurde die Denaturierungsreaktion durch fünfminütige Inkubation mit Neutralisierungspuffer beendet. Im Folgenden wurde mit 1xPBS für 5 min gewaschen und die Prähybridisierung mit 400 µl Prähybridisierungslösung für 3 h bei 50 °C durchgeführt. Die nachfolgende Hybridisierung über Nacht wurde jeweils mit 200 µl Hybridisierungslösung und entsprechender Menge Sonde (analoge Mengen zur ISH) bei 50 °C durchgeführt, wobei auch hier der Sondenansatz vorher 10 min bei 85 °C inkubiert worden war. Die Nachbehandlung der Membranen erfolgte analog zur ISH (Kap. 2.1.9), einzig der RNase-Verdau wurde nicht durchgeführt. Nach dem Abstoppen der Farbreaktion mit TE-Puffer wurde die Membran an der Luft getrocknet und zur Auswertung eingescannt.

2.2 Untersuchungen zur Protein-Expression

In dieser Arbeit war es eine Zielstellung, die Expression von Fettsäuresensoren in humanem Geschmacksgewebe zu untersuchen. Dies geschah zum einen durch die Untersuchung der mRNA-Expression mittels PCR, die eine Transkription der mRNA zeigt und eine Expression der Fettsäuresensor-Proteine wahrscheinlich macht, jedoch nicht nachweist. Der direkte immunologische Nachweis der translatierten Proteine ist daher aussagekräftiger. Zusätzlich wird bei immunhistochemischer Färbung die genaue Lokalisation der Sensoren auf zellulärer Ebene möglich. Biopsiematerial humaner Geschmackspapillen enthält neben den eigentlichen Geschmackszellen der Geschmacksknospen zusätzlich epitheliales Gewebe sowie anhängendes Drüsen- oder auch Muskelgewebe (Abb. 7G). Daher sollte die Proteinexpression von Fettsäuresensoren mit Hilfe immunhistochemischer Methoden untersucht werden. Der Nachweis erfolgt mit Hilfe von Antikörpern, die an spezifische Regionen (Epitope) der nachzuweisenden Proteine binden. Der Primärantikörper wird in der Regel über die Bindung eines markierten Sekundärantikörpers nachgewiesen. Die Markierung kann entweder direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff ohne Signalverstärkung erfolgen (Abb. 7A) oder aber signalverstärkend z.B. mit Hilfe einer Biotinkopplung an ein Enzymsystem. Hier stehen sowohl monochromatische (z.B. Diaminobenzidinfärbung, Abb. 7B) oder fluoreszierende (z.B. Fluoresceintyramidfärbung, Abb. 7C) Systeme zur Verfügung. Weiterhin ermöglicht die direkte Konjugation des Primärantikörpers mit einem Fluoreszenzfarbstoff einen direkten, einfachen Nachweis der Antikörperbindung (Abb. 7D), dessen Anwendbarkeit jedoch stark in Abhängigkeit der Sensitivität des Primärantikörpers steht, da hier die geringste Signalstärke zu erwarten ist.

Jede dieser Methoden hat ihre Vor- und Nachteile. So ist die DAB-Methode im Vergleich zur einfachen Fluoreszenzfärbung sensitiver, gibt jedoch nicht die Möglichkeit über eine Kofärbung mit mehreren Antikörpern eine Kolo-kalisation zweier Proteine zu untersuchen. Die signalverstärkenden Methoden sind zwar oft sensitiver, bieten jedoch meist auch den Nachteil einer starken unspezifischen Hintergrundfärbung und eines aufwendigeren Protokolls. Somit musste in dieser Arbeit für die Fettsäuresensoren zum einen ein funktioneller Antikörper gefunden werden, wobei die Auswahl für menschliche Proteine beschränkt ist, und es musste zur weiteren Charakterisierung des Zelltyps eine Fluoreszenzmethode etabliert werden, die eine Kofärbung mit mindestens zwei Antikörpern ermöglichte. Nicht zuletzt war es nötig ein Antikörper für verschiedene Zelltypen zu finden, der sensitiv genug ist und sich mit dem Färbeprotokoll des Fettsensors parallel nachweisen ließ. Die begrenzte Menge an humanem Biopsiematerial und dessen schwankende Qualität erschwerte die Etablierung der Färbeprotokolle zusätzlich.

Im Folgenden werden die verschiedenen getesteten immunologischen Färbeprotokolle vorgestellt. Dabei wurde die Funktionalität der Antikörper für die Fettsäuresensoren auch im Rahmen immunocytochemischer Färbungen in einer humanen Zelllinie untersucht, die das jeweilige Fettsensorprotein transient exprimiert.

2.2.1 Immunocytochemie zur Überprüfung der Antikörperfunktionalität

Für die zur Überprüfung der Antikörperfunktionalität angewandte immunocytochemische Methode wurden humane Zellen verwendet, deren Kultivierung und Transfektion mit Fettsäuresensoren-DNA im Vorfeld beschrieben wird.

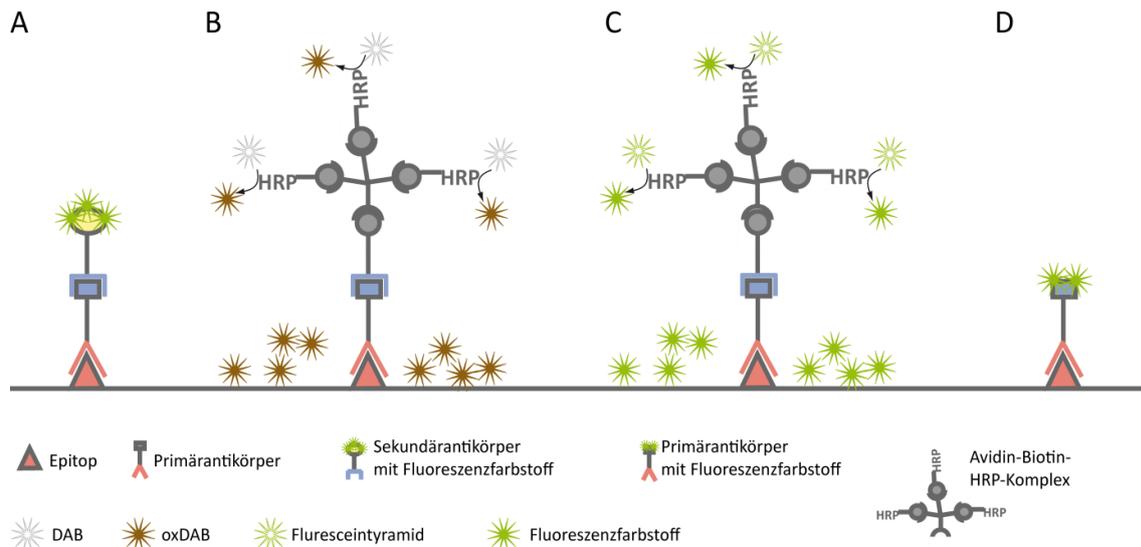


Abb. 7: Schematische Darstellung der verschiedenen immunologischen Nachweismethoden. Nachweis des Primärantikörpers über (A) fluoreszierenden Sekundärantikörper, (B) signalverstärkende monochromatische DAB-Methode, (C) signalverstärkende Fluorescein-Tyramid-Methode oder (D) direkte Kopplung eines Fluoreszenzfarbstoffs an den Primärantikörper.

Kultivieren von HEK293T-Zellen

Für alle zellbiologischen Experimente wurden HEK293T-Zellen verwendet, die die G-Protein-Chimäre $\alpha 16\text{gust}44$ stabil exprimieren, welche unter anderem in funktioellen Calcium-Imaging-Untersuchungen der Abteilung genutzt wurde.

Die Zellen wurden auf Poly-D-Lysin-beschichteten (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 10-cm-Schalen in serumhaltigem DMEM bei einer Temperatur von 37 °C, 5 % CO_2 -Partialdruck und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre gehalten. Um die Zellen zu passagieren, wurde das Medium vollständig abgenommen und die Zellen mit Trypsinlösung (0,05 % (w/v) Trypsin, 0,5 mM EDTA in PBS) abgelöst. Die Reaktion wurde mit serumhaltigem DMEM abgestoppt und die Zellen durch Resuspendieren vereinzelt. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (900 rpm, 5 min, RT) und der Überstand verworfen. Nachdem die Zellen in 5 ml frischem serumhaltigem DMEM resuspendiert wurden, konnten sie für Experimente oder weitere Passagen in geeigneter Verdünnung ausgesät werden.

Die HEK293T-Zellen wurden bis etwa Passage 30 gehalten. Um die Zellen neu in Kultur zu nehmen, wurde ein in flüssigem Stickstoff gelagertes Aliquot der Zelllinie im Wasserbad aufgetaut und in eine 10-cm-Kulturschale mit serumhaltigem DMEM gegeben. Nach 10-16 h wurde das Medium gewechselt, um tote Zellen und DMSO zu entfernen.

Um zu verhindern, dass Zellen sich während eines Experiments ablösen, wurden alle Zellkulturplatten wie oben erwähnt mit Poly-D-Lysin beschichtet. Durch die Beschichtung mit diesem synthetischen Molekül erhalten negativ geladene Polystyrol-Oberflächen eine positive Ladung, was die Anhaftung von Zellen verbessert. Damit sich die Zellen an Poly-D-Lysin-beschichtete Oberflächen gewöhnen, wurden auch 10-cm-Kulturschalen beschichtet. Dafür wurde poly-D-Lysin in Wasser verdünnt (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und auf den Platten bei RT für 10 min inkubiert. Danach wurden die Platten mit Wasser gewaschen, steril verpackt und bei 4 °C aufbewahrt.

Für immunzytochemische Experimente wurden HEK293T-Zellen auf Poly-D-Lysin-beschichteten Glasdeckplättchen (\varnothing 12 mm) kultiviert. Diese wurden vor dem Beschichten abgeflammt, kurz abgekühlt und einzeln in die Löcher einer 24-Loch-Platte gelegt. Anschließend wurden die Glasdeckplättchen mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Poly-D-Lysin in Wasser für 20-30 min inkubiert. Die Zellen wurden danach direkt auf die mit Wasser gewaschenen Deckgläschen ausgesät.

Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen

Für die immuncytochemische Färbung erfolgte eine Transfektion der HEK293T-G α 16gust44-Zellen mit einem Vektorkonstrukt, welches die Sequenz des jeweiligen Fettsäuresensors enthielt, für den ein Antikörper auf Funktionalität getestet werden sollte. Die Vektorkonstrukte basierten auf *pcDNA5/FRT*-Vektoren und wurden von Dr. Maria Mercedes Galindo im Rahmen der funktionellen Untersuchungen der Fettsensoren hergestellt. Sie kamen entweder in der Variante ohne oder mit SST/HSV-Tags¹³ zum Einsatz, wobei sich die getagte Variante als Kontrolle der Expression der Fettsensoren eignete, da sie mittels HSV-Antikörper Fettsensorantikörper-unabhängig gefärbt werden konnten. Diese Färbung diente unter anderem der Kontrolle auf eine erfolgreiche Transfektion. Die Zellen wurden, wie oben beschrieben, auf Deckgläsern in 24-Loch-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70 % kultiviert. Als Transfektionsreagens wurde Lipofectamine™ 2000 nach Anweisung des Herstellers verwendet. Die Vektor-DNA (800 ng je Loch) wurde in 50 μ l serumfreiem DMEM gelöst und bei RT für 20 min mit Lipofectamine™-2000 (2 μ l) in Serum-freiem DMEM (50 μ l) inkubiert. Während dieser Zeit assoziiert die DNA mit Lipofectamine™-2000-Molekülen zu Komplexen, die später von den Zellen aufgenommen werden können. Das Medium auf den HEK293T-Zellen wurde gegen serumfreies DMEM ausgetauscht. Nach der Zugabe von 100 μ l des DNA-Lipofectamine™ 2000-Gemischs wurden die Zellen im Brutschrank für 3-5 h inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsmedium gegen serumhaltiges DMEM ersetzt. Die immuncytochemische Färbung der transient transfizierten HEK293T-Zellen konnte circa 24 h nach Beginn der Transfektion durchgeführt werden.

Immuncytochemische Färbung transfizierter HEK293T-Zellen

Am ersten Tag der Färbung wurden die Zellen zunächst dreimal 5 min vorsichtig mit 37 °C warmen 1xPBS gewaschen und danach 30 min auf Eis inkubiert, um die zelluläre Endozytose zu inhibieren, welche die Concanavalin-A-Membranfärbung behindern würde. Biotinyliertes Concanavalin A (10 mg/ml) wurde 1:2000 (Endkonzentration 5 μ g/ml) in eiskaltem 1xPBS verdünnt und jeweils 500 μ l je Loch für 1 h auf Eis zu den Zellen gegeben.

Danach wurde dreimal 1 min mit eiskaltem 1xPBS gewaschen, bevor die Zellen mit eiskaltem Aceton-Methanol-Gemisch (1:1) für 2 min fixiert wurden. Die folgenden Schritte wurden hiernach bei RT durchgeführt. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 1xPBS wurden unspezifische Antikörper-Bindungsstellen mit Blockierlösung (3 % Pferdeserum in 1xPBS) für 60 min blockiert, bevor die Inkubation mit dem Primärantikörper (gelöst in Blockierlösung) über Nacht bei 4 °C erfolgte.

Am zweiten Tag der Färbung wurden die Zellen erneut in 1xPBS gewaschen, für 60 min blockiert und mit entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert. Dabei wurde für den Nachweis des biotinylierten Concanavalin A AF633-konjugiertes Streptavidin verwendet. Zuletzt wurden die Zellen erneut mit 1xPBS dreimalig und mit ddH₂O einmalig gewaschen, bevor die Deckgläschen mit den gefärbten Zellen vorsichtig aus der Loch-Platte genommen und mit Eindeckmedium auf einen Glasobjekträger verbracht wurden. Die Analyse und Auswertung der Färbung erfolgte am konfokalen Laserscanning-Mikroskop mit der entsprechenden Leica Imaging Software.

¹³ HSV-Tag: Aminosäuresequenz welche dem Zielprotein über die Vektor-DNA-Ssequenz in der multiplen Klonierungsstelle angehängt wurde (sog. *expressed sequence tag*; HSV: Sequenz QPELAPEDPEDC des Herpes Simplex Virus). SST-Tag: Im Gegensatz zum HSV-Tag eine nicht exprimierte DNA-Sequenz, welche der im Vektor befindlichen cDNA vorgeschaltet ist zum Zwecke der Markierung und Identifizierung (sog. *signature sequence tag*).

2.2.2 Immunhistochemische Methoden

Für die Untersuchung der zellulären Expression von Fettsensor-Proteinen in humanem Geschmacksgewebe stand im Rahmen dieser Arbeit humanes Biopsiematerial von Wallpapillen zur Verfügung. Zum einen wurden Gefrierschnitte nicht fixierten Gewebes, zum anderen Paraffinschnitte von Formalin-fixiertem Gewebe (Kap. 2.2.2) angefertigt. Die Gewebeschnitte wurden verschiedenen immunhistochemischen Färbemethoden unterzogen. Zum einen sollte die Funktionalität der Antikörper bei verschiedenen Präparationstechniken getestet und optimiert werden. Zum anderen sollte auch ein Kofärbeprotokoll aus Fettsensor-, Zelltypmarker- und Kernfärbung etabliert werden. Dieses dient der genaueren Charakterisierung der Expression des Fettsensors und gibt Hinweise auf zelluläre Mechanismen der Fettwahrnehmung im Geschmackssystem.

Herstellung von Gewebeschnitten

a) Gefrierschnitt-Technik (Cryoschnitte)

Die menschlichen Papillen wurden nach Entnahme bei -80 °C aufbewahrt und kurz vor Beginn der Schnittpräparation auf -20 °C im Kryostat (Mikrotom) temperiert (Abb. 8A). Sofern ersichtlich, wurde das Gewebe mit der Papillenoberfläche nach oben zeigend ausgerichtet und in Gefriermedium auf eine Aufspannvorrichtung aufgefroren (Abb. 8B). Es wurden $10\text{-}16\text{ }\mu\text{m}$ dünne Schnittpräparate geschnitten und auf *Super-Frost-Plus*-Objektträgern aufgebracht.

Beim Schneiden humaner Wallpapillen war im gefrorenen Biopsiematerial, im Gegensatz zum Wallpapillengewebe der Maus, eine eindeutige Identifizierung des Beginns und Endes einer Wallpapille in den meisten Fällen nicht möglich. Die Gewebestücke besaßen eine Größe von $3\text{-}6\text{ mm}$, welches etwa $300\text{-}600$ Schnitten á $10\text{ }\mu\text{m}$ entspricht. Diese wurden wie in Abb. 8E und Abb. 8F gezeigt auf eine Serie von ca. $100\text{ - }200$ Objektträgern (OT) aufgebracht, so dass sich am Ende jeweils der 1., 101., 201. usw. Schnitt des Gewebes auf einem OT befanden. Die Methode hat den Vorteil, sicherzustellen, dass sich am Ende auf jedem OT mindestens ein Schnitt der eigentlichen Wallpapille zu finden ist (geht man davon aus, dass eine Wallpapille durchschnittlich $1\text{-}2\text{ mm}$ Durchmesser besitzt und sich daher über $100\text{-}200$ Schnitte erstreckt). Nachteilig ist jedoch, dass je Färbung ein ganzer OT mit $3\text{-}5$ Schnitten verwendet werden muss, da nicht sicher ist auf welchem der Schnitte sich Geschmacksgewebe befindet. Da humanes Geschmacksgewebe nur in sehr begrenzten Mengen vorhanden war, wurde bei Biopsiematerial, welches eine genaue Identifizierung des Beginns und Endes einer Wallpapille erlaubte, eine andere Methode angewendet. Schnitte von solchen Papillen wurden fortlaufend jeweils zu $3\text{-}4$ pro OT aufgezogen. Damit konnte, unter Zuhilfenahme einer hydrophoben Abgrenzung, jeder einzelne Schnitt für eine andere Färbung bzw. Kontrollfärbung genutzt werden. Um die Morphologie, die Qualität und etwaige Anzahl an Geschmackspapillen vor Durchführung der immunologischen Färbungen zu überprüfen, wurden je geschnittener Papille einer der ersten, mittleren und letzten OT einer H&E Färbung unterzogen. Die Schnittpräparate wurden bei -80 °C aufbewahrt.

b) Formalin-fixierte in Paraffin-eingebettete Schnitte (FFPE-Schnitte)

Bei der Methode zur Herstellung von FFPE-Schnitten wurden die Gewebe in Formalin fixiert, über eine Alkoholreihe entwässert und in Xylol getränkt. Darauffolgend wurde das Gewebe in erwärmtes Paraffin gebettet und erkalten gelassen. So entstandene Paraffinquader wurden dann im Mikrotom zu $5\text{ }\mu\text{m}$ Dicke geschnitten und auf OT, wie für die Cryoschnitt-Technik beschrieben, aufgebracht. Die Schnittpräparate wurden bei 4 °C trocken gelagert. Die Herstellung dieser Art Schnitte erfolgte durch Frau Elisabeth Meyer des Max-Rubner-Laboratoriums. Im Vergleich zur Gefrierschnitttechnik hat diese Methode den Vorteil, dass das Gewebe einen besseren morphologischen Zustand auf-

weist. Sie hat jedoch den Nachteil, dass durch die Formalin-fixierung und Erhitzung oftmals die Zugänglichkeit und der Zustand des nachzuweisenden Antigens (Proteins) leiden und somit die Sensitivität des Nachweises mindert.

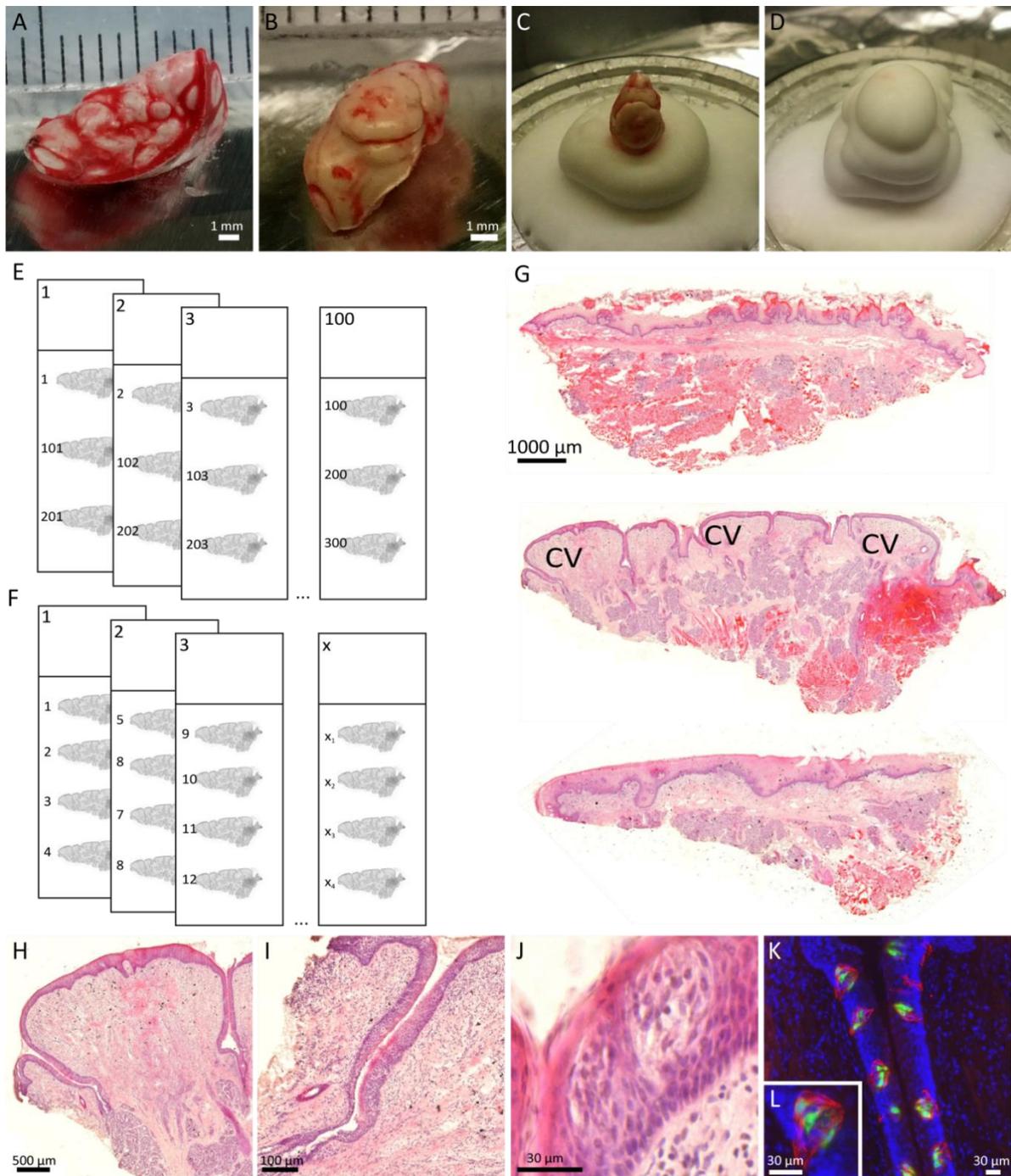


Abb. 8: Herstellung und Charakterisierung humaner Wallpapillen-Gefrierschnitte. Gefrorenes Biopsiematerial der menschlichen Zunge mit (A) schwer und (B) leicht identifizierbarem humanen Wallpapillen vor Einbettung in das Gefriermedium (C und D). Die für schwer (E) bzw. leicht (F) identifizierbare Wallpapillen angewendete Schnitttechnik. (G) Der 50., 150. und 250. Schnitt durch humanes Biopsiegewebe mit mehreren Wallpapillen auf Schnitt 150. Eine Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Wallpapille (H) mit anhängendem Drüsengewebe und dem in den Gräben befindlichen Geschmacksepithel (I) in dem sich mehrere Geschmacksknospen (J) finden. Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung der Geschmackszellen (K+L). rot: Cytokeratin-20. grün: Phospholipase C β 2. blau: DAPI-Zellkernfärbung.

Vorbehandlung von FFPE-Schnitten

Bevor FFPE-Schnitte zur Färbung eingesetzt werden konnten, mussten sie zum einen rehydriert werden und zum anderen, je nach benutztem Antikörper, einer Antigen-*Retrieval*-Prozedur (dt. etwa Antigen-Wiederherstellungsprozedur) unterzogen werden.

Rehydrierung von FFPE-Schnitten

Die Rehydrierung von FFPE-Schnitten erfolgte über eine absteigende Alkoholreihe. Dazu wurden die Schnitte zuerst für 2 min und 5 min mit Xylol behandelt um sie dann in folgenden Ethanol-Konzentrationen zu inkubieren: 100 % (3x3 min), 96 % (2x3 min), 70 % (3 min) und 40 % (2 min). Zum Schluss erfolgte ein zweimaliges Tränken in ddH₂O für je 5 min.

Antigen-*Retrieval*-Prozedur

Um das möglicherweise durch die Formalin-Fixierung, Erhitzung bzw. De- und Rehydrierung denaturierte Antigen wieder für den Antikörper besser zugänglich zu machen, wurden die Schnitte für 20 min in Natriumcitratpuffer (0,01 M, pH 6,0) kurz vor dem Sieden in einer Mikrowelle gehalten. Nach 20-minütigem Abkühlen bei RT und zweimaligem Waschen in ddH₂O für je 2 min, wurden die Schnitte den jeweiligen Färbeprozeduren unterzogen.

Gewebestrukturfärbung mit Hämatoxylin-Eosin-Methode

Die Hämatoxylin-Eosin-(HE-)Färbung ist eine weitverbreitete Gewebefärbung zur morphologischen Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen. Dabei werden durch die Anwendung eines basischen Farbstoffs (Hämalaun) alle basophilen (sauren) Strukturen (Zellkern, DNA, Ribosomen, raues endoplasmatisches Retikulum) blau angefärbt, wohingegen alle acidophilen (basischen) Strukturen durch Verwendung eines sauren Farbstoffs (Eosin) rot erscheinen (Zellplasmaproteine, Mitochondrien, glattes endoplasmatisches Retikulum, Kollagen). Diese Färbung wurde in dieser Arbeit genutzt, um die spezifischen Strukturen des menschlichen Wallpapillengewebes zu differenzieren und einen Überblick über das Vorhandensein von Geschmacksknospen und Von-Ebner-Drüsengewebe der angefertigten Schnitte zu erhalten. Dazu wurden der 1., 30., 60. und 90. angefertigte OT einer Serie von 100 OT je Papille mit dieser Methode gefärbt.

Zunächst wurden die Schnitte 5 min in kalter 4-%-Paraformaldehydlösung fixiert und dreimalig mit ddH₂O gespült. Hiernach erfolgte die Färbung mit 500 µl Hämalaun pro OT für 3 min. Einem dreimaligen Spülen mit warmem ddH₂O folgte dann die Färbung mit 500 µl Eosin pro OT. Nach wiederholtem dreimaligen Spülen mit ddH₂O wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (40, 70, 96 und 100 % EtOH jeweils 1 min) entwässert und anschließend 2 min in Rotihistol geklärt. Die Schnitte wurden mit DPX-Eindeckmedium eingedeckt und bei 4 °C bis zur Analyse am Zeiss-Axioplan-Mikroskop bzw. dem Mirax-Scanssystem aufbewahrt.

Einfache Färbung mittels fluoreszierenden Sekundärantikörpern

Als erster Schritt zur Etablierung einer Antikörper-Färbung wurde in dieser Arbeit die einfache Färbung mit fluoreszierendem Sekundärantikörper auf Cryoschnitten gewählt. Dieses Protokoll enthält eine relativ geringe Anzahl von Behandlungen und ist daher zeitsparend, beeinflusst damit weniger die Zugänglichkeit des Antigens (z.B. durch Denaturierung bei FFPE-Technik), weist weniger unspezifische Fluoreszenz (z.B. Formalin-induziert bei FFPE-Schnitten) auf und ermöglicht eine spätere Fluoreszenz-Kofärbung.

Dabei wurden die bei -80 °C gelagerten Cryoschnitte direkt in eiskaltem 4-%-PFA für 5 min fixiert und anschließend dreimal 5 min in 1xPBS gewaschen. Es folgte eine Blockierung unspezifischer Bindungsstellen sowie Permeabilisierung des Gewebes mit PBS-Blockierpuffer für 60 min, bevor

der Primärantikörper, in entsprechender Verdünnung in PBS-Antikörperpuffer über Nacht bei 4 °C auf die OT in einer feuchten Kammer appliziert wurde. Dabei wurde, sofern durchführbar, für jede Färbung eine Kontrollfärbung mitgeführt, bei der der Primärantikörper zuvor mit dem für ihn spezifischen Blockierpeptid (BP) inkubiert wurde (2-4 h in 4-facher Konzentration des Antikörpers und kleinem Reaktionsvolumen von 50 µl). Diese Färbung diente als Negativkontrolle, um eine spezifische Bindung des nicht blockierten Primärantikörpers zu zeigen. Weiterhin wurde als Negativkontrolle eine Färbebehandlung ohne Primärantikörper durchgeführt, um auf unspezifische Signale durch den Sekundärantikörper zu kontrollieren.

Nach Inkubation mit Primärantikörper bzw. mit blockiertem Primärantikörper, wurden die Schnitte dreimal 10 min in 1xPBS gewaschen und dann für 60 min bei RT mit dem jeweiligen, gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper inkubiert. Der verwendete Sekundärantikörper war dabei mit einem fluoreszierenden Farbstoff, meist AF488 (grün) oder AF633 (rot), konjugiert, so dass die Behandlung von hier an lichtgeschützt weitergeführt wurde. Nach finalem Waschen für dreimal 5 min in 1xPBS konnten die gefärbten Schnitte mit DAKO-Eindeckmedium und Deckgläschen eingedeckt werden. Bis zur Auswertung am Fluoreszenzmikroskop, konfokalem Laserscanning-Mikroskop oder dem MIRAX-Scansystem wurden die Schnitte dunkel bei 4 °C gelagert.

Signalverstärkende Färbung mittels monochromatischer DAB-Methode

Es stellte sich im Laufe der Arbeit heraus, dass Antikörper, die sich funktionell in der immunocytochemischen Überprüfung zeigten, keine oder nur unzureichende Signale in der einfachen immunhistochemischen Fluoreszenzfärbung aufwiesen. Daher wurde zwischenzeitlich auf die sensitivere Methode der monochromatischen Färbung mit Diaminobenzidin zurückgegriffen, um die Fettsensoren mit höherer Sensitivität im Gewebe zu lokalisieren. Bei dieser Methode tritt eine Signalverstärkung ein, da die Farbstoffbildung auf einer enzymatischen Reaktion beruht. Der genutzte Sekundärantikörper ist hierbei an Biotin gekoppelt und wurde über Streptavidin mit einem Peroxidasekomplex verbunden. Zum einen können mehrere Streptavidin-Peroxidase-Komplexe an Biotin binden und damit das Signal der Färbung verstärken, zum anderen kann über die Dauer der Enzymreaktion die Signalausbeute reguliert werden. FFPE-Schnitte wurden nach Vorbehandlung (Kap. 2.2.2) für 5 min in 1xTBS gewaschen und anschließend mit einer Lösung aus jeweils 3 % Methanol und H₂O₂ behandelt um endogene Peroxidasen zu blockieren und damit die Hintergrundfärbung möglichst gering zu halten. Weiterhin wurden die Schnitte dreimal 5 min in 1xTBS gewaschen, mit einer Lösung aus 0,2 % Triton-X-100 und 0,1 % Gelatine 30 min permeabilisiert. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurden die Schnitte 60 min in einer feuchten Kammer mit TBS-Blockierlösung blockiert. Danach erfolgte die Inkubation mit Primärantikörper in entsprechender Verdünnung in TBS-Antikörperpuffer (bzw. Kontrollen s. Kap. 2.2.2) über Nacht bei 4 °C.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte zuerst dreimal in 1xTBS gewaschen und für 60 min bei RT mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (verdünnt in TBS-Antikörperpuffer) inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in 1xTBS erfolgte die Kopplung des Streptavidin-Peroxidase-Komplexes (ABC-Reaktion nach Angaben des Herstellers) für 30 min. Die Schnitte wurden wiederum in 1xTBS dreimal gewaschen und 2-10 min der DAB-Farbreaktion unterzogen, welche mit ddH₂O abgestoppt wurde.

Zum Schluss mussten die Schnitte dehydriert werden. Dies erfolgte analog, jedoch in umgekehrter Reihenfolge der Rehydrierung von FFPE-Schnitten (Kap. 2.2.2). Das Eindecken der fertig gefärbten Schnitte erfolgte mit Vectastain-Eindeckmedium für monochromatische Färbungen. Die Analyse der Schnitte wurde am Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioplan unter Hellfeldeinstellungen durchgeführt.

Signalverstärkende Färbung mittels Fluorescein-Tyramid-Methode

Nachdem sich die Funktionalität einiger Antikörper mit der monochromatischen signalverstärkenden Methode herausstellte, sollte für diese Antikörper die fluoreszierende Variante der signalverstärkenden Färbung etabliert werden, um eine spätere Kofärbung mit Zelltypmarkern zu ermöglichen. Dazu wurde in dieser Arbeit eine Fluorescein-Tyramid-Färbung durchgeführt, die der DAB-Färbung grundlegend ähnlich ist. Hierbei wurden vorbehandelte FFPE-Schnitte bzw. mit in 4 % PFA fixierte Gefrierschnitte zweimal 5 min in 1xTBS gewaschen. Es folgte die Blockierung endogener Peroxidasen mittels Methanol-H₂O₂-Blockierpuffer für 30 min und erneutes zweimaliges Waschen in 1xTBS. Nach einer Behandlung mit 0,2 % Triton X-100 in 1xTBS wurden die folgenden Waschschriffe mit TNT-Puffer durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungen mit TNB-Puffer für 30 min und die Primärantikörperinkubation über Nacht bei 4 °C. Die Antikörper wurden bei dieser Methode in TNB-Puffer verdünnt. Am nächsten Tag wurde wiederum dreimal 5 min gewaschen und für 60 min bei RT mit biotinyliertem Sekundärantikörper inkubiert. Einem weiteren dreifachen Waschgang folgte die Inkubation mit dem Streptavidin-HRP-Komplex. Hierbei ist Streptavidin an das Enzym Meerrettich-Peroxidase (*engl.: horseradish peroxidase*) gekoppelt, welches, nach erneutem Waschen, das Farbsubstrat Fluorescein-Tyramid aktiviert, so dass dieses sich lokal im Gewebe ablagert. Diese Reaktion erfolgte für 3-10 min und wurde mit ddH₂O abgestoppt. Bei dieser Methode wurden die Schnitte hiernach direkt mit DAKO-Eindeckmedium für fluoreszierende Färbungen eingedeckt und die Schnitte dunkel bei 4 °C gelagert. Die Auswertung erfolgte mit dem Konfokalen Laserscanning Mikroskop oder dem MIRAX-Scansystem.

Direkte Färbung durch Fluoreszenz-konjugierte Primärantikörper

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Charakterisierung des GPR120-exprimierenden Zelltyps mit Hilfe von fluoreszierenden Doppelfärbungen untersucht werden. Sofern beide Primärantikörper aus verschiedenen Spezies gewonnen wurden, lassen sich diese mit zwei verschiedenen fluoreszierenden Sekundärantikörpern bzw. einem fluoreszierenden Sekundärantikörper (AF647 bzw. AF633 rot) und der Fluorescein-Tyramid-Färbung (grün) nebeneinander sichtbar machen. Jedoch stammten die meisten kommerziellen Antikörper, die als Zelltypmarker zur Verfügung standen, aus derselben Spezies (Kaninchen) wie der Primärantikörper des Fettsäuresensors. Daher musste die Methode der direkten Färbung durch Konjugation eines der beiden Primärantikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff erfolgen, um dennoch eine Kofärbung durchführen zu können. Diese Methode ist stark abhängig von der Sensitivität des Primärantikörpers, da durch die direkte Konjugation keine Signalverstärkung erfolgt.

Die direkte Konjugation von aus dem Kaninchen stammenden Antikörpern erfolgte mit dem Zenon-rabbit-IgG-direct-AF647-labeling-Kit. Die Antikörper wurden laut Angaben des Herstellers mit den Fab-Fragment-AF647-Komplexen konjugiert. Diese Konjugation wurde bei jeder IHC erneut durchgeführt, da es sich um eine nicht-permanente Konjugation handelte und das Konjugat nur für etwa 1,5 h stabil war. Die Komplexe wurden nach der Färbung des ersten nachzuweisenden Proteins für 1 h bei RT auf die Schnitte aufgetragen. Es folgten ein dreimaliger Waschschriff in TNT-Puffer, sowie ein zweimaliger Waschschriff in 1xTBS. Damit die Komplexe nicht wieder dissoziierten, wurde die Färbung mit 4 % PFA für 15 min nachfixiert. Zum Schluss wurden die Schnitte gewaschen, in DAKO-Eindeckmedium eingedeckt und dunkel bei 4 °C gelagert. Die Auswertung erfolgte mit dem konfokalen Laserscan-Mikroskop oder dem MIRAX-Scansystem.

Kofärbungen und Zellkernfärbung mit DAPI

Zur Charakterisierung des GPR120-exprimierenden Zelltyps wurden Kofärbungen zwischen Fettsensor und Zelltypmarkerproteinen etabliert. Hierbei konnte durch eine sensitivere GPR120-Antikörpervariante auf eine direkte Konjugation des Antikörpers mit Fluoreszenzfarbstoff zurückgegriffen werden. Hierbei konnte auf die Verwendung eines Sekundärantikörpers verzichtet werden. Damit eröffnete sich die Möglichkeit Kofärbungen zweier Proteine mit etablierten Antikörpern derselben Spezies durchzuführen, indem sich nach der Färbung eines Zelltypmarker-Antikörpers (über einen fluoreszierenden Sekundärantikörper) die Inkubation mit direkt-markiertem GPR120-Antikörper anschließt. Das etablierte Protokoll ist dem Ergebnisteil zu entnehmen (Kap. 3.1.4).

Zur besseren Lokalisierung einzelner Zellen bzw. der automatisierten Fokussierung während der Aufnahme mit dem Mirax-Scan-system wurde zusätzlich eine dritte Färbung an das Protokoll angefügt. Durch den blau fluoreszierenden Farbstoff DAPI werden Zellkerne im Gewebe angefärbt. Dies vereinfacht eine Differenzierung zweier benachbarter Zellen. Dazu wurde am Ende eines Protokolls eine zehnminütige Färbung mit DAPI (1:1000 in PBS) durchgeführt.

Somit ließen sich bei der Auswertung die Zellkerne in blau (DAPI), die GPR120-exprimierenden Zellen in rot (AF647) und die entsprechenden Zelltypmarker in grün (AF488) am MIRAX-Scan-System darstellen. Kolokalisierte Färbungen von GPR120 und Zelltypmarker kennzeichneten sich durch eine Gelbfärbung nach Überlagerung des Rot- und Grünkanals.

Quantifizierung gefärbter Zellen

Zunächst wurden alle Gewebeschnitte am Mirax-Scansystem über alle drei Farbkanäle (AF647 rot, AF488 grün, DAPI-blau) gescannt (Mirax Scan 1.12), wobei die DAPI-Zellkernfärbung der automatischen Justierung der Schärfenebene diente. Anhand der Komplettaufnahme eines Gewebequerschnitts erfolgte die Bestimmung der Anzahl und die Nummerierung aller Geschmacksknospen mit Hilfe der Software Mirax Viewer 1.12. Anschließend wurde jede einzelne Geschmacksknospe mit dem Zeiss Konfokalmikroskop in 0,5- μm -Ebenen gescannt. Die Ebene mit der besten Qualität (meist eine der Mittleren) einer Knospe wurde für die Auszählung der einzelnen Zellen gewählt. Die Anzahl der Zellen wurde in Photoshop anhand der Einzelkanäle und der Überlagerung der Farbkanäle bestimmt (Abb. 9). Es wurde die Anzahl GPR120-exprimierender Zellen, die Anzahl der Zellen, die den jeweiligen Zellmarker exprimierten, und die Anzahl an Zellen, die eine Koexpression aufwiesen bestimmt. Eine Quantifizierung der Gesamtanzahl der Zellen einer Geschmacksknospe anhand der Kernfärbung mit DAPI war aufgrund des Fehlens eines entsprechenden Filtersystems für die Aufnahme der DAPI-Fluoreszenz am Konfokalmikroskop nicht möglich.

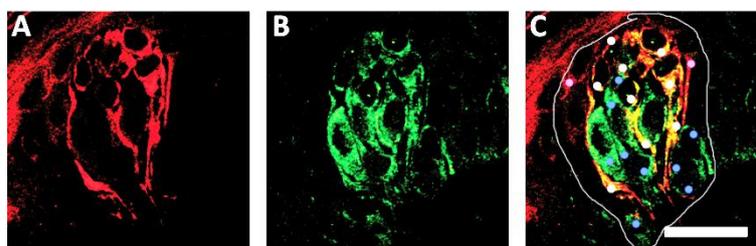


Abb. 9: Auswertung der Kofärbungen mit Hilfe von Photoshop. Photoshop ermöglichte ein ein- und ausblenden der einzelnen Farbkanäle (A: rot und B: grün) zur Besseren Beurteilung der Koexpression (C: gelb). C: Zu dokumentativen Zwecken und einfacheren Auszählung wurden die gezählten Zellen mit einem Farbcode markiert (pink: rote Zellen, blau: grüne Zellen, weiß: gelbe Zellen). Maßstab: 30 μm .

2.3 Tierexperimentelle Untersuchungen

Das Ziel der tierexperimentellen Pilotstudie war es die Weiterleitung der Fettsäurewahrnehmung über P2X-Rezeptoren (s. Kap. 1.1.4 und 1.3.2) zu untersuchen. Dazu sollte mit Hilfe eines Kurzzeit-Präferenztests (*engl.: brief-access test*) und pharmakologischer Intervention mit einem P2X₃-spezifischen Antagonisten die Präferenz gegenüber der attraktiven Linolsäure und als Kontrollstimulus Saccharose mit und ohne Antagonisten-Gabe untersucht werden. Hiermit sollten Rückschlüsse über die neuronale Weiterleitung der Wahrnehmung von Linolsäure über ATP-Ausschüttung und P2X_{2/3}-exprimierende Geschmacksnerven gezogen werden.

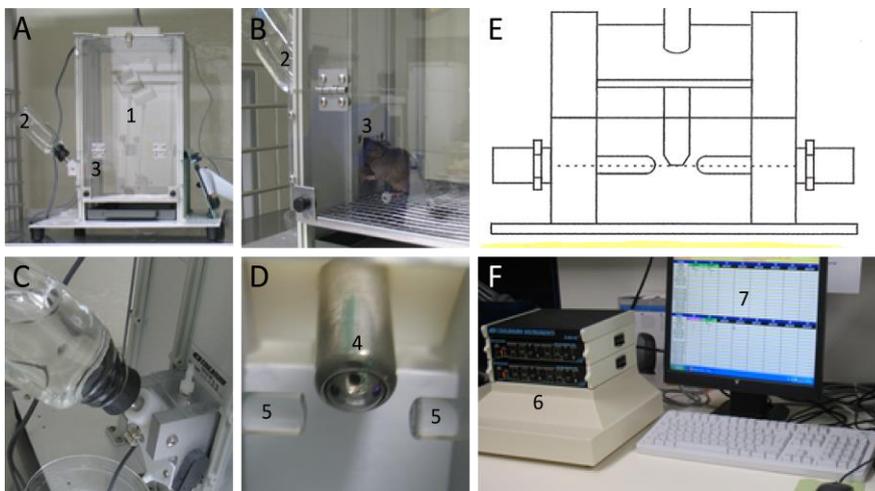
2.3.1 Tiere und Haltungsbedingungen

Für den durchgeführten Tierversuch lag die entsprechende Tierversuchsgenehmigung durch das Landesamt für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz unter dem Geschäftszeichen 23-2347-27-2010 vor und wurde unter der internen Nummer des Max-Rubner-Laboratoriums G-04-11-MOGE (Kurzbezeichnung: Neuronale Mechanismen der Fettgeschmackswahrnehmung) geführt. Die Versuchstiere wurden gemäß den Richtlinien zur Tierhaltung und des Tierschutzes gehalten.

Es wurden ausschließlich männliche, mindestens 8 Wochen alte Tiere des Stammes C57BL/6 verwendet. Den Tieren stand außerhalb des Experiments ein Standardfutter zur Haltung von Nagern sowie sterilisiertes, entkalktes Wasser ad libitum zur Verfügung. Gehalten wurden die Tiere auf entstaubter Weichholzfaser in Makrolon-Käfigen bei einer konstanten Temperatur von 20 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 55±5 %. Um 6 Uhr morgens begann der 12-stündige Hell-Dunkel-Zyklus.

2.3.2 Lickometersystem

Die Geschmackspräferenztests wurden mit Hilfe eines optischen Lickometers durchgeführt. Das Lickometersystem besteht aus einem Testkäfig, an dessen Seitenwand sich der Zugang zu einer Trinkflasche befindet (Abb. 10). Ein Infrarot-Lichtstrahl verläuft waagrecht zur Flaschenöffnung. Leckt die Maus an der Öffnung, wird der Strahl unterbrochen, die Leckantwort vom Detektor registriert und an ein Computersystem weitergegeben. Das Lickometer ermöglicht auf diese Weise Kurzzeitmessungen zu Geschmackspräferenzen und minimiert somit metabolische sowie Lerneffekte, die in Langzeituntersuchungen (z.B. Zwei-Flaschen-Präferenztest) für die Aussage der Ergebnisse als kritisch bewertet werden.



Fotos zur Verfügung gestellt von Dr. Sabine Frenzel.

Abb. 10: Lickometermesssystem. (A) Testkäfig (1) mit Flaschenhalterung (2) und Zugang zur Trinkflasche (3). (B) Maus am Zugang zur Trinkflasche. (C) Flaschenhalterung mit Messsystem. (D) Flaschenöffnung mit Kugelverschluß (4) und Infrarotvorrichtung (5). (E) Der Infrarotstrahl (----) verläuft horizontal zur Flaschenöffnung. Leckt die Maus an der Flasche wird der Strahl unterbrochen und (F) von einem Detektor registriert (6) und einem Computer ausgegeben (7).

2.3.3 Motivation der Tiere durch Futter- und Wasser-Restriktion

Bei Kurzzeit-Präferenztests ist eine Wasser- und Nahrungsrestriktion nötig, um die Tiere zu motivieren während des kurzen Messzeitraums zu trinken. In bisherigen Studien bekamen die Tiere daher 22 h vor dem Experiment nur 1 g feste Nahrung und 2 ml Trinkwasser, was etwa 19 bis 30 % ihres normalen Tagesbedarfs entspricht (Glendinning et al. 2002). Es hat sich gezeigt, dass diese Einschränkung der Verfügbarkeit von Nahrung und Trinkwasser bei der Untersuchung von bevorzugten Geschmacksqualitäten, zu denen der Süß- und der Fettgeschmack zählen, für die Motivation der Tiere, die Testlösungen zu trinken ausreicht (Glendinning et al. 2002, Damak et al. 2006). Obwohl die erwähnten Publikationen zeigen, dass Mäuse nach 22 h mit beschränktem Nahrungs- und Trinkwasserangebot nicht unkontrolliert durstig sind, sondern sich weiterhin Geschmacksvorlieben auf die konsumierte Trinkwassermenge auswirken, sollte zunächst eine kürzere Restriktionsphase von 16 h getestet werden, um unnötige Belastungen der Tiere zu vermeiden. Die Tiere sollten daher das Experiment zunächst mit 16 h Restriktionszeit pro Tag durchlaufen und nur, wenn diese nicht ausreicht um das nötige Interesse für das Lickometerangebot zu wecken, für 22 h restriktiert werden. Während der 16-h-Restriktion wird den Tieren Zugang zu 0,7 g Futter und 1,5 ml Wasser gewährt, was den anteiligen Mengen des 22-h-Restriktionsprotokolls entspricht.

2.3.4 Gewichtsverläufe und Stressbeobachtung

Während der Restriktionsphasen wurde der Gewichtsverlauf der Tiere sowie ihr Verhalten beobachtet und aufgezeichnet. Die Messung des Gewichts erfolgte sowohl vor als auch nach den Restriktionsphasen. Ist das Gewicht häufiger als zwei Mal hintereinander unter 80 % des Ausgangsgewichtes abgefallen oder traten starke Distress-Symptome auf, wurde das betreffende Tier aus dem Versuch genommen.

2.3.5 Attraktive Stimuli

Als attraktiver Stimulus kam 300 mM Saccharose gelöst in ddH₂O in Gruppe I und 10 mM Linolsäure gelöst in 0,3 % Gummi-arabicum-Lösung in Gruppe II zum Einsatz. Dabei diente in Gruppe II das Gummi arabicum der Maskierung der durch die Fettsäure hervorgerufenen Textureigenschaften (somit besaßen Kontrolllösung und Stimuluslösung dieselbe Textur).

2.3.6 Pharmakologische Intervention

Zur Inhibierung der ATP-vermittelten Weiterleitung gustatorischer Informationen von den Geschmackszellen auf angrenzende Nervenfasern, welche über P2X-Rezeptormultimere, im Besonderen dem P2X₃-Rezeptor erfolgt (Finger et al. 2005), wurde der P2X₃-spezifische Antagonist A-31749 verwendet. Dieser zeigte in Experimenten zum Schmerzempfinden bei Mäusen eine hohe Wirksamkeit bei einer Inkubationszeit von 30 min und einer Konzentration von 30 nmol/g Körpergewicht (McGarraughty et al. 2003, Jarvis et al. 2004). Denn Tieren wurde in Abhängigkeit des Körpergewichts intraperitoneal ein Volumen von 100-180 µl appliziert.

2.3.7 Versuchsablauf

Gruppeneinteilung

Die Mäuse wurden in zwei Gruppen á 20 Tiere geteilt. Der Gruppe I wurde Saccharoselösung präsentiert und bildete die Kontrollgruppe für eine bekannte attraktive Grundgeschmacksqualität (süß). Der Gruppe II wurde eine Fettsäurelösung (Linolsäure) präsentiert.

Trainingsphase

Der Gesamtversuchsablauf für jeweils eine Gruppe ist der Tabelle 3 zu entnehmen. Die Tiere wurden zunächst einem fünftägigen Lickometertraining unterzogen, welches täglich entsprechend dem Ablauf eines Versuchstages (Abb. 11) durchgeführt wurde. Die Tiere erhielten jedoch in dieser Phase keine Restriktion und nur Wasser als Testlösung. Das Training diente der Gewöhnung an das Lickometersystem und den Versuchablauf, um etwaige Trainingseffekte in der eigentlichen Messwoche auszuschließen.

Restriktionstest

Mit den Tieren der Gruppe I wurde zunächst das 16-h-Restriktionsprotokoll (Abb. 11A) durchlaufen, jedoch stellte sich heraus, dass die Tiere nicht genügend motiviert waren zu trinken (siehe Ergebnisteil 3.3.1). Somit wurde dieser Teil vorzeitig abgebrochen und mit dem 22-h-Restriktionsprotokoll (Abb. 11 B) nach einer Woche Erholungsphase fortgeföhren.

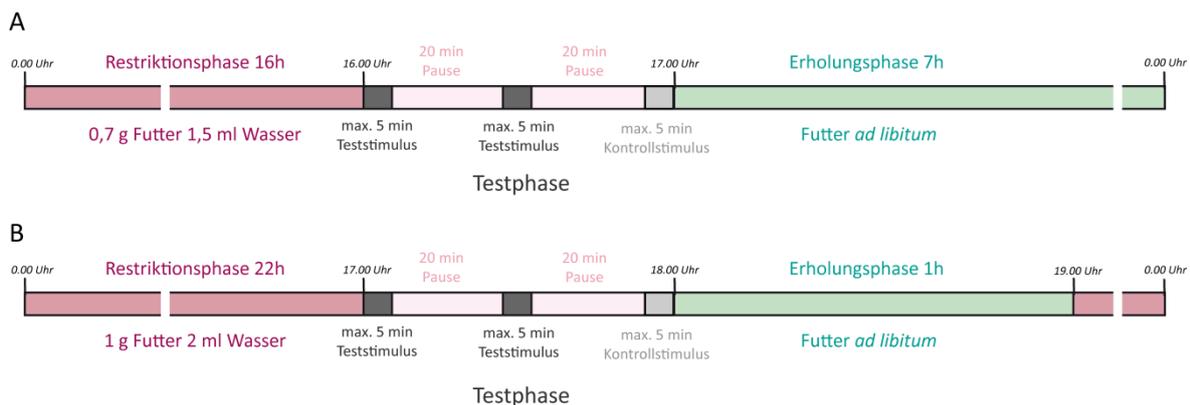


Abb. 11 Ablauf eines Versuchstages im 16 h und 22 h Protokoll. Einer 16-stündigen (A) bzw. 22-stündigen (B) Restriktionsphase folgte eine Testphase, in der 2-3 Messungen á 5 min im Testkäfig mit 20-minütigen Pausen erfolgte. Nach dem Test erhielten die Tiere in der Erholungsphase Futter und Wasser ad libitum. Die Testphase sollte während des Lichtzyklus, jedoch nahe dem Dunkelzyklus erfolgen, damit die nachtaktiven Tiere ausreichend mobil sind.

Testphase

In der eigentlichen Testphase wurden die Tiere vor jedem experimentellen Tag der Restriktion unterworfen. An den ersten beiden Tagen wurden die Tiere nur auf das Leckverhalten gegenüber der Kontrolllösung (Gruppe I: ddH₂O, Gruppe II: 0,3 % (w/v) Gummi arabicum in ddH₂O) getestet, welcher zur Bestimmung der basalen individuellen Leckfrequenz und als Kontrolle des Leckverhaltens über zwei Restriktionstage hinweg diente. Es wurden je Tier drei Messungen á 30 s im Abstand von 20 min durchgeführt. Dabei starteten die 30-s-Aufzeichnungen erst nachdem die Maus das erste Mal leckte. Den Tieren wurde 5 min Zeit gegeben die Aufzeichnung durch ein erstes Lecken zu starten. Leckte die Maus in dieser Zeit nicht wurde die Leckfrequenz als 0 gewertet.

Nach einem Erholungstag ohne Restriktion folgten wiederum zwei Testtage mit Restriktion. Dabei wurde am ersten Tag auf den attraktiven Stimulus ohne pharmakologische Intervention getestet.

Am zweiten Tag hingegen wurden die Tiere in zwei Teilgruppen á 10 Tiere aufgeteilt. Eine Gruppe erhielt 30 min vor dem Test eine intraperitoneale Injektion mit dem P2X₃-Antagonisten A31749 (gelöst in ddH₂O, 30 nmol/g KG), die andere Gruppe á 10 Tiere erhielt eine Injektion mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl). Hierbei wurden ebenfalls drei Messungen wie oben beschrieben durchgeführt, wobei die letzte Messung noch einmal mit der Kontrolllösung erfolgte. Nach weiteren zwei Erholungstagen wurden die zwei Testtage mit attraktiver Testlösung wiederholt (Tab. 3).

Tab. 3: Gesamtversuchsablauf mit 22h Restriktionsprotokoll je Gruppe (I bzw. II)

Tag	Restriktion	Test	
1-5	-	Lickometertraining mit Wasser	
6	-	kein Experiment	
7		Erholungstag, Beginn der Restriktion am Abend	
8	22h zuvor	1. Test des Kontrollstimulus (Basiswert)	
9	22h zuvor	2. Test des Kontrollstimulus (Basiswert)	
10		Erholungstag, Beginn der Restriktion am Abend	
11	22h zuvor	1. Test des attraktiven Stimulus	1. Test des attraktiven Stimulus
12	22h zuvor	1. Test des attraktiven Stimulus mit Injektion des Antagonisten	1. Test des attraktiven Stimulus mit Injektion von Kochsalzlösung
13-14	-	kein Experiment	
15		Erholungstag, Beginn der Restriktion am Abend	
16	22h zuvor	2. Test des attraktiven Stimulus	2. Test des attraktiven Stimulus
17	22h zuvor	2. Test des attraktiven Stimulus mit Injektion des Antagonisten	2. Test des attraktiven Stimulus mit Injektion von Kochsalzlösung
Anzahl Tiere		n = 10	n = 10

2.3.8 Funktionalität des P2X₃-Antagonisten

Im Laufe des Experiments stellte sich heraus, dass der P2X₃-spezifische Antagonist schon auf die Präferenz des Kontrollstimulus Saccharose keinen Einfluss zu haben schien, obwohl dessen Süßgeschmack nach Finger (2005) über das P2X_{2/3}-Rezeptor-Heteromer vermittelt wird (Finger et al. 2005). Daher sollte geklärt werden, ob die Funktionalität des Antagonisten unter anderen pharmakologischen Bedingungen im Geschmackssystem gegeben war. Dazu wurden zum einen der Einfluss der Inkubationszeit und der Konzentration des Antagonisten überprüft. Hierbei wurden Gaben von 30 und 100 nmol/g KG des Antagonisten getestet, sowie Inkubationszeiten von 30-60 min im Vergleich zu 90-120 min. Zum anderen konnte in einem Pilotversuch mit drei Tieren die Wirkung des Antagonisten auf die Präferenz eines aversiven, nicht-kalorischen Bitterstimulus (300 µM Denatoniumbenzoat) mit oben beschriebenen Versuchsprotokoll, jedoch mit einer Wasserrestriktion von 18h ohne Futterrestriktion¹⁴, getestet werden.

2.3.9 Auswertung und Statistik

Die Auswertung des Tierversuchs basiert auf folgenden aufgezeichneten Werten: Leckwerte (je 30 s) und Latenzzeit (s) bis zum ersten Lecken. Weiterhin wurde das Kontrollstimulus/Stimulus-Verhältnis der Leckwerte bestimmt. Die genannten Daten wurden mit der vom Hersteller angebotenen Lickometer-Software aufgezeichnet und mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 2010 analysiert. Die Signifikanz zwischen zwei Werten wurde mit einem zweiseitigen t-Test für ungleiche Varianzen in Excel berechnet.

¹⁴ Dieses Protokoll wurde in anderen Studien der Abteilung für aversive Stimuli etabliert.

3 Ergebnisse

In diesem Kapitel sollen die Ergebnisse dieser Arbeit dargestellt werden. Basierend auf den in der Zielstellung (Kap. 1.4) genannten Vorhaben werden zunächst die Untersuchungen zur Expression und Charakterisierung von Fettsensoren im menschlichen Geschmacksgewebe geschildert (Kap. 3.1). Danach werden die Ergebnisse der Untersuchungen zur Expression von lipolytischen Enzymen in der Zungenspeicheldrüse erläutert (Kap. 3.2) und in einem dritten Teil die Ergebnisse der Pilotstudie zur neuronalen Weiterleitung der oralen Fettsäurewahrnehmung am Mausmodell vorgestellt (Kap. 3.3).

3.1 Fettsäuresensoren im menschlichen Geschmacksgewebe

3.1.1 Auswahl der Fettsensorkandidaten

Der Hauptanteil der mit der Nahrung zugeführten Fette besteht beim Menschen, wie auch bei Nagetieren, aus freien und in Triglyceriden gebundenen Fettsäuren. Das Fettsäurespektrum erstreckt sich von kurzkettigen (bis C6), über mittelkettige (C7-12) bis hin zu langkettigen (>C12) gesättigten und ungesättigten Fettsäuren. Den größten Anteil bilden jedoch die langkettigen Fettsäuren, allen voran Ölsäure (C18:1), Palmitinsäure (C16:0), Stearinsäure (C18:0) und Linolsäure (C18:2). Den geringeren, jedoch physiologisch relevanten Anteil, stellen die mehrfach ungesättigten Fettsäuren Linolensäure (C18:3), Eicosapentaensäure (C20:5) und Docosahexaensäure (C22:6) dar (s. Tab. 1 und Tab. 2). So lässt sich vermuten, dass fettsäuresensitive Rezeptoren mit einem Agonistenspektrum für langkettige Fettsäuren eine größere Relevanz für den Menschen, als jene für mittel- oder gar kurzkettige Fettsäuren. Erste sensorische Studien am Menschen zeigten, dass besonders langkettige, aber möglicherweise auch mittel- und kurzkettige Fettsäuren (C6 und C12), nach Maskierung der Textur und Minimierung der Geruchswahrnehmung, oral wahrgenommen werden können (Chale-Rush et al. 2007b, Mattes 2009a, Mattes 2009b). Auch aus Studien an Nagetieren ist bekannt, dass vorrangig Fettsäuresensoren mit einer Spezifität für langkettige Fettsäuren im Geschmacksgewebe von Mäusen und Ratten zu finden sind (vgl. Kap. 1.3.2). Zu diesen zählen die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren GPR120 und GPR40, der Fettsäuretransporter CD36 und der fettsäuresensitive Kaliumkanal KCNA5. Diese Fettsäuresensoren sind auch für den Menschen bekannt und in vielerlei anderen Geweben zu finden (s. Tab. 4). Desweiteren werden auch die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren GPR43 und GPR41 für Nagetiere als Fettgeschmacksrezeptoren diskutiert (Hansen et al. 2006), deren Agonistenspektrum auf kurzkettige Fettsäuren beschränkt ist. Für diese Arbeit wurden demnach die Fettsäuresensoren CD36, GPR120, GPR40 und KCNA5 als Hauptkandidaten ausgewählt. Um das gesamte Fettsäurespektrum abzudecken, wurden auch GPR43 und GPR41 als Sensoren für kurzkettige Fettsäuren, und GPR84 als spezifischer Sensor für mittelkettige Fettsäuren (C9-C14) (Wang et al. 2006) in die ersten Untersuchungen eingeschlossen.

3.1.2 mRNA-Expression von Fettsäuresensoren in humanen Wall- und Pilzpapillen

Die ausgewählten Fettsäuresensoren wurden zunächst auf die Expression ihrer Gene in humanem Geschmacksgewebe hin untersucht. Hierfür stand Biopsiematerial von humanen Wall- und Pilzpapillen zur Verfügung. Aus diesen wurde mittels Trizol®-Extraktion Gesamt-RNA gewonnen (Kap. 2.1.1) und zur Entfernung restlicher genomischer DNA einem DNase-I-Verdau unterzogen. Die verdaute RNA wurde über reverse Transkription in cDNA umgeschrieben (Kap. 2.1.4).

Tab. 4: Agonistenspektrum, Vorkommen und Funktion der ausgewählten Rezeptorkandidaten zur oralen Wahrnehmung von Fettsäuren.

Fettsäurelänge	Rezeptor	Fettsäurespektrum	Vorkommen (extraoral)	Funktion (extraoral)	orale Expression in Nagetieren
langkettig	CD36	>C13	Muskelgewebe, Blutzellen, GIT	Plättchenaggregation, Fettsäuretransport und Fettmetabolismus, Entzündungs- und Immunprozesse	Wallpapille Blätterpapillen
	GPR120	C14-C22	Fettgewebe, GIT, Lunge, Pankreas, Niere, Milz, Thymus, Gehirn	GLP-1-Sekretion Entzündungsmodulator, Adipozytendifferenzierung	Wallpapille Blätterpapillen Pilzpapillen
mittel- und langkettig	KCNA5	>C13	Gehirn, Herz, Leber Colon, Milz, Leukozyten	Erregungsleitung im Herz-, Gefäß- und Nervensystem	Wallpapille Blätterpapillen Pilzpapillen
	GPR40	C7-C22 (auch C6)	Pankreas GIT, Gehirn, Milz, Mononukleäre Blutzellen	Insulin- und Glukagonsekretion, GLP-1- und GIP-Sekretion	Wallpapille
mittelkettig	GPR84	C9-C12 (auch C13, C14)	Leuko-/Monozyten, Makrophagen, T-/B-Zellen, Lunge, GIT, Gehirn, Niere, Herz, Schilddrüse, Milz, Muskelgewebe, Leber, Mikroglia, Knochenmark	proinflammatorisch, immunmodulatorisch, Regulation der Adiponectin Expression	(Wallpapillen, Blätterpapillen)
kurzkettig	GPR41	C1-C6	Immunzellen Fettgewebe Lunge	Leptinproduktion, Inhibierung der Lipolyse, Regulation der Plasmafettsäurekonzentration	(Wallpapille Blätterpapillen)
	GPR43	C1-C6	Fettgewebe, GIT, Pankreas, Milz, Lymphknoten, Knochenmark, Muskelgewebe	Serotonin- und PYY-Sekretion, Regulation des Plasmalipidlevels	(Wallpapille Blätterpapillen)

(Febbraio et al. 2001, Briscoe et al. 2003, Le Poul et al. 2003, Fedida et al. 2005, Hirasawa et al. 2005, Wang et al. 2006, Hirasawa et al. 2008, Ichimura et al. 2009, Milligan et al. 2009, Xu et al. 2009, Mattes 2009c, Gilbertson et al. 2010, Wellendorph et al. 2010, Nergiz-Unal et al. 2011, Vallejo-Gracia et al. 2013, Hara et al. 2014, Zhang and Leung 2014)

Um zu kontrollieren, dass die erhaltene cDNA keine Rückstände an genomischer DNA enthält, wurde jeweils eine Probe in der cDNA-Synthese mitgeführt, welche keine Reverse Transkriptase enthielt (-RT). Die Qualität aller cDNA-Proben wurde anhand der Expression des Haushaltgens GAPDH kontrolliert (Abb. 12A). Die Genexpression ist anhand der Polymerase-Kettenreaktion (Kap. 2.1.5) mit Gen-spezifischen Oligonukleotiden untersucht worden. Für alle untersuchten Gene wurden Primerpaare (vorwärts und rückwärts gerichtete Oligonukleotide) entworfen und die jeweiligen Reaktionsbedingungen der PCR optimiert. Hierfür wurde cDNA von Kontrollgeweben, von denen bekannt war, dass sie den jeweiligen Rezeptor exprimieren, als Matrize genutzt. Die Sensitivitäten der Primerpaare wurden anhand der Amplifikation verschiedener Konzentrationen an Plasmidvektoren überprüft, die die jeweilige Rezeptor-cDNA enthielten.

Um die An- bzw. Abwesenheit von Geschmacksrezeptorzellen zu dokumentieren, wurde die Expression des Bitterrezeptors TAS2R16 in den cDNA-Proben der Geschmackspapillen bzw. des Geschmackszell-freien Zungengewebes untersucht (Abb. 12B). Das Ergebnis des Screenings der Rezeptorkandidaten ist in Abb. 12 C und D, dargestellt. Die Funktionalität der Primerpaare und der PCR wurde mit der Amplifikation der Rezeptoren in den entsprechenden humanen Kontrollgeweben gezeigt. Die Abwesenheit eines Amplifikationsproduktes in den Wasserkontrollen und -RT-Ansätzen zeigt, dass der PCR-Reaktionsansatz und die cDNA-Proben frei von Kontamination mit genomischer oder Fremd-DNA waren. Fünf der sieben fettsäuresensitiven Rezeptorkandidaten liessen sich in der cDNA der humanen Geschmackspapillen amplifizieren. Dazu zählten die Hauptkandidaten CD36, KCNA5 und GPR120, sowie die Rezeptoren für mittel- bzw. kurzkettige Fettsäuren GPR84 und GPR43. Kein Amplifikationsprodukt konnte für die Rezeptoren GPR41 und GPR40 detektiert werden.

Alle detektierten Rezeptoren fanden sich sowohl in der Wall- als auch in der Pilzpapillen-cDNA, wobei der Kaliumkanal KCNA5 vorrangig in der cDNA der Wallpapillen amplifiziert wurde. Allerdings war die Expression der Geschmacksrezeptorkandidaten auch in der cDNA des Geschmackszell-freien Zungengewebes sichtbar. Ein Grund hierfür kann das Vorkommen dieser Rezeptoren in Blut- und Immunzellen (CD36, GPR84, GPR43, GPR41, GPR40) bzw. Muskelgewebe (CD36, GPR84) sein, welche ebenfalls neben dem Geschmacksepithel im Zungen- und Papillengewebe vorhanden sind (vgl. Abb. 8). Daher lässt sich zunächst keine spezifische Expression der Rezeptorkandidaten im Geschmacksgewebe ableiten. In einem nächsten Schritt sollten daher Gewebeschnitte der Wallpapillen angefertigt und immunhistochemisch untersucht werden, um sowohl die genaue zelluläre Lokalisation der Rezeptorkandidaten, als auch die Expression ihres Proteins zu überprüfen.

3.1.3 Protein-Expression der Fettsäuresensoren in humanem Wallpapillengewebe

Um neben der mRNA-Expression auch die Proteinexpression der Rezeptorkandidaten, sowie ihre genaue zelluläre Lokalisation zu untersuchen, wurden 10-µm-Gefrierschnitte von humanen Wallpapillen hergestellt (Kap. 2.2.2). Die Proteinexpression sollte mit Hilfe von spezifisch gegen die Rezeptorproteine gerichteten Antikörpern und möglichst über Fluoreszenzfärbung erfolgen, um eine spätere Kofärbung mit Zelltyp- und Geschmacksrezeptor-spezifischen Markern zu ermöglichen. Hierzu musste zunächst ein funktionelles Antikörperscreening für jeden der Rezeptorkandidaten erfolgen. Die Sensitivität der Antikörper wurde mit einer Standard-Fluoreszenzmethode (Kap. 2.2) zytochemisch in Rezeptor-transfizierten HEK293T-Zellen (Kap. 2.2.1) und parallel histochemisch auf Gefrierschnitten der humanen Wallpapille getestet. Hierbei erfolgte die Detektion des Primärantikörpers über die Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörpers.

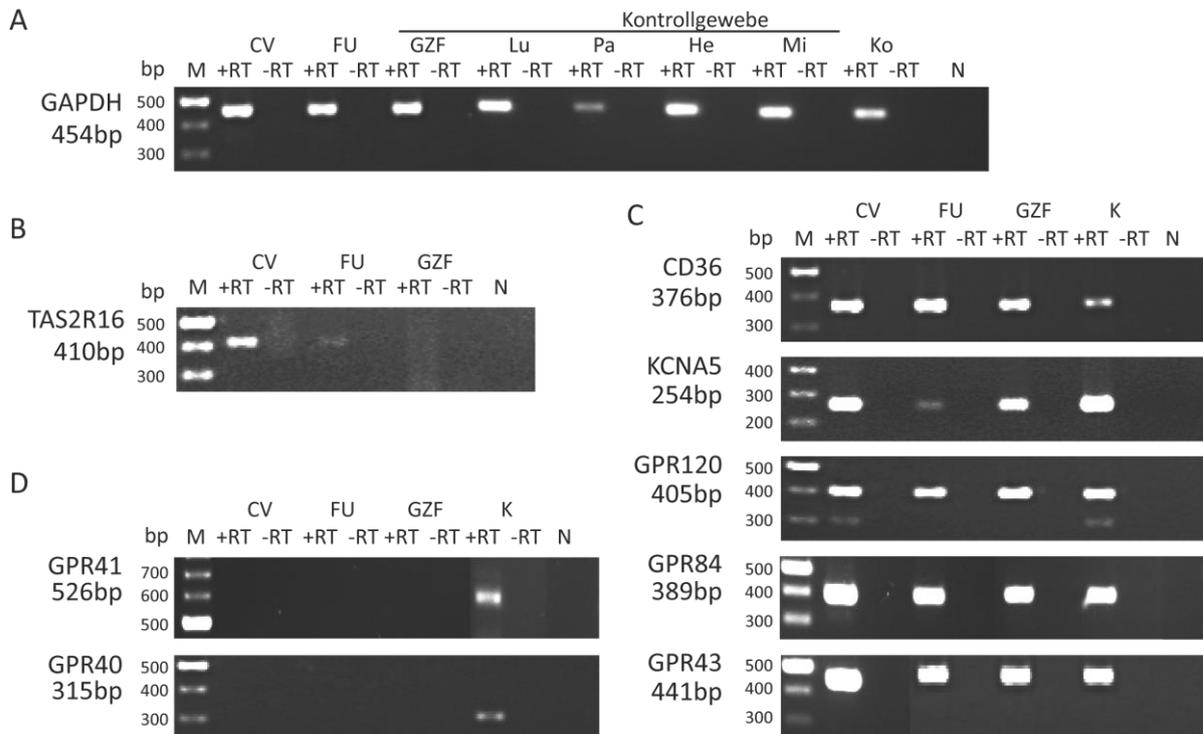


Abb. 12: mRNA-Expression der Fettsensorkandidaten in humanen Wall- und Pilzpapillen. Aus Biopsiematerial der humanen Geschmackspapillen und Geschmackszell-freiem Zungenmaterial, sowie verschiedenen Kontrollgeweben wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels PCR auf die Genexpression der Fettsensorkandidaten untersucht. **(A)** Die Qualität der cDNA wurde anhand der Amplifikation des Haushaltsgens GAPDH kontrolliert. **(B)** Die An- bzw. Abwesenheit von Geschmackszellen in den Geschmackspapillen bzw. anhängendem Geschmackszell-freiem Material wurde anhand der Amplifikation des Bitterrezeptors TAS2R16 gezeigt. **(C)** Die mRNA-Expression der Fettsensorkandidaten CD36, KCNA5, GPR120, GPR84 sowie GPR43 konnte sowohl in der cDNA des Geschmackspapillengewebes, als auch in der cDNA des Geschmackszell-freien Gewebes amplifiziert werden. **(D)** Die Rezeptoren GPR41 und GPR40 waren in keiner der cDNA-Proben des Zungengewebes zu detektieren. In den cDNA-Proben der Kontrollgewebe konnten alle Rezeptoren amplifiziert werden. CV: *P. circumvallatae* - Wallpapille. FU: *P. fungiformes* - Pilzpapille. GZF: Geschmackszell-freies Zungengewebe. K: Kontrollgewebe: CD36 und GPR120 – Kolon (Ko), KCNA5 – Herz (He), GPR84 und GPR41 – Lunge (Lu), GPR43 – Milz (Mi), GPR40 – Pankreas (Pa). N: Negativkontrolle (Wasser). +/-RT: cDNA-Synthese mit/ohne Zusatz von Reverser Transkriptase. M: DNA-Größenmarker. bp: Basenpaare.

Für jeden Antikörper wurde eine Spezifitätskontrolle mitgeführt. Hierfür wurde der jeweilige Primärantikörper mit einem für sein Epitop spezifisches Blockierpeptid vorinkubiert, woraufhin eine spezifische Bindung des Antikörpers im Gewebe unterbunden ist. Eine unspezifische Färbung des Gewebes bzw. der Zellen, z.B. durch den Sekundärantikörper oder auch Gewebeeigenfluoreszenz, wurde durch eine Färbung ohne Primärantikörper kontrolliert und war in allen Fällen negativ¹⁵. Für die immunhistochemischen Experimente wurde als technische Positivkontrolle und zur Überprüfung der Anwesenheit von Geschmacksknospen/-zellen stets parallel eine Färbung der Phospholipase C β 2 durchgeführt, welche spezifisch in Geschmackszellen zu finden ist (Abb. 13 J). Für die immunzytochemischen Experimente wurden die Zellen mit einem Vektor transfiziert, der die jeweilige Rezeptor-cDNA enthielt. Hierbei waren die Vektorkonstrukte mit einem HSV-Tag (s. Kap. 2.2.1) versehen. Der immunzytochemische Nachweis des HSV-Tags ermöglichte die Kontrolle der korrekten Transfektion und Expression des Rezeptorgens. Ebenfalls wurden mit einem Leervektor transfizierte Zellen für die Kontrolle einer unspezifischen Färbung durch den Vektor

¹⁵ Die entsprechenden Negativkontrollen finden sich im Anhang A3.1.

mitgeführt. Die Zellen wurden durch Färbung der Glykoproteine der Zellmembran mit Concanavalin A sichtbar gemacht.

Es wurden insgesamt neun Antikörper unter verschiedenen Bedingungen getestet. Drei der getesteten Antikörper waren weder in den cytochemischen, noch in den histochemischen Experimenten sensitiv genug (Abb. 13 B, D, I). Zwei der Antikörper wiesen eine unspezifische Färbung auf. Hierbei zeigte der KCNA5-Antikörper (Nr. 288/289, Abb. 13 G) unspezifische Signale sowohl auf den HEK293T-Zellen, als auch innerhalb und außerhalb der Geschmacksknospen des Wallpapillengewebes. Auch die Signale eines bereits publizierten CD36-Antikörpers¹⁶ (Nr. 354/355, Abb. 13 F) konnten in der Immunocytochemie nicht spezifisch mit dem ihm zugehörigen Blockierpeptid geblockt werden. Allerdings zeigt dieser Antikörper eine Färbung der Porus-Region der Geschmacksknospen der Wallpapille, die in der Blockierpeptid-Kontrolle nicht zu finden war. Allgemein ist jedoch bekannt, dass eine Färbung der Porus-Region als kritisch zu betrachten ist, da sich hier der Antikörper oftmals unspezifisch ansammelt (Behrens et al. 2012). Aus diesen Gründen, und da diese Art Färbung keine aussagekräftige Kofärbung mit Zelltypmarkern ermöglicht¹⁷, wurde dieser Antikörper nicht für weitere Analysen verwendet. Für jeden der Hauptrezeptorkandidaten (CD36, GPR120 und KCNA5) und GPR84 (Abb. 13 A, C, E, H) konnte in den immunocytochemischen Färbungen ein funktioneller spezifischer Antikörper gefunden werden. Allerdings konnte mit diesen Antikörpern zunächst mit der Standard-Fluoreszenzmethode keine Färbung im Gewebe der Wallpapillen detektiert werden. Die Standardfluoreszenzfärbung mit einem direkt markierten Sekundärantikörper besitzt im Vergleich zu signalamplifizierenden enzymatischen Methoden eine geringere Sensitivität (vgl. Kap. 2.2). Daher wurden mit den funktionellen Antikörpern als nächstes eine monochromatische Diaminobenzidin-Färbung, sowie eine Fluoresceintyramid-Färbung durchgeführt (Kap. 2.2). Hierfür wurden 5 µm dicke FFPE-Schnitte angefertigt (Kap. 2.2.2). Auch hier war es mit beiden Methoden nicht möglich eine Proteinexpression der Rezeptorkandidaten CD36 und KCNA5 zu detektieren. Für den Rezeptorkandidaten GPR84 konnten mit beiden Methoden blockierbare Signale in den Geschmacksknospen der Wallpapille erhalten werden. Allerdings waren diese Färbungen nur sehr schlecht replizierbar, da eine variierende, starke Hintergrundfärbung, insbesondere bei der Fluoresceintyramid-Methode auftrat. Diese Hintergrundfärbung verstärkte sich später in Kombination mit dem Kofärbeprotokoll noch zusätzlich und lies keine verlässlichen Aussagen zu. Im Gegensatz zu allen anderen Antikörpern konnte mit dem für den G-Protein-gekoppelten Rezeptor 120 genutzten Antikörper eine spezifische, replizierbare Färbung mit beiden Amplifikationsmethoden erhalten werden (Abb. 13 A, gefüllte Pfeile). Hierbei zeigte sich eine Immunreaktivität innerhalb der Geschmacksknospen in einzelnen Geschmackszellen. Interessanterweise zeigte sich auch eine Färbung im Geschmackszell-freien basalen Bereich des Epithels (Abb. 13 A, leere Pfeile). Aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit von humanem Gewebematerial, wurde auf ein weiteres extensives Antikörper-Screening der Rezeptorkandidaten verzichtet. Hinzu kam, dass erste sensorische Ergebnisse unseres Projektpartners zeigten, dass humane Probanden vorrangig langkettige Fettsäuren als fettig wahrnehmen, nicht jedoch mittelkettige Fettsäuren (Galindo et al. 2012). Mittelkettige Fettsäuren wurden einzig als „kratzig“ wahrgenommen. Daher wurde sich im Rahmen dieser Arbeit auf den Geschmacksrezeptorkandidaten GPR120 konzentriert, welcher spezifisch langkettige Fettsäuren detektiert.

¹⁶ Simons et al. (2011) zeigten ebenfalls eine apikale Porusfärbung in humanen und porcinen Wallpapillen.

¹⁷ Anhand einer punktförmigen Färbung des Porus ist eine genaue Zuordnung dieser Färbung zu einer bestimmten Zelle nicht möglich.

3.1.4 Etablierung eines Kofärbeprotokolls zur GPR120-Zelltypcharakterisierung

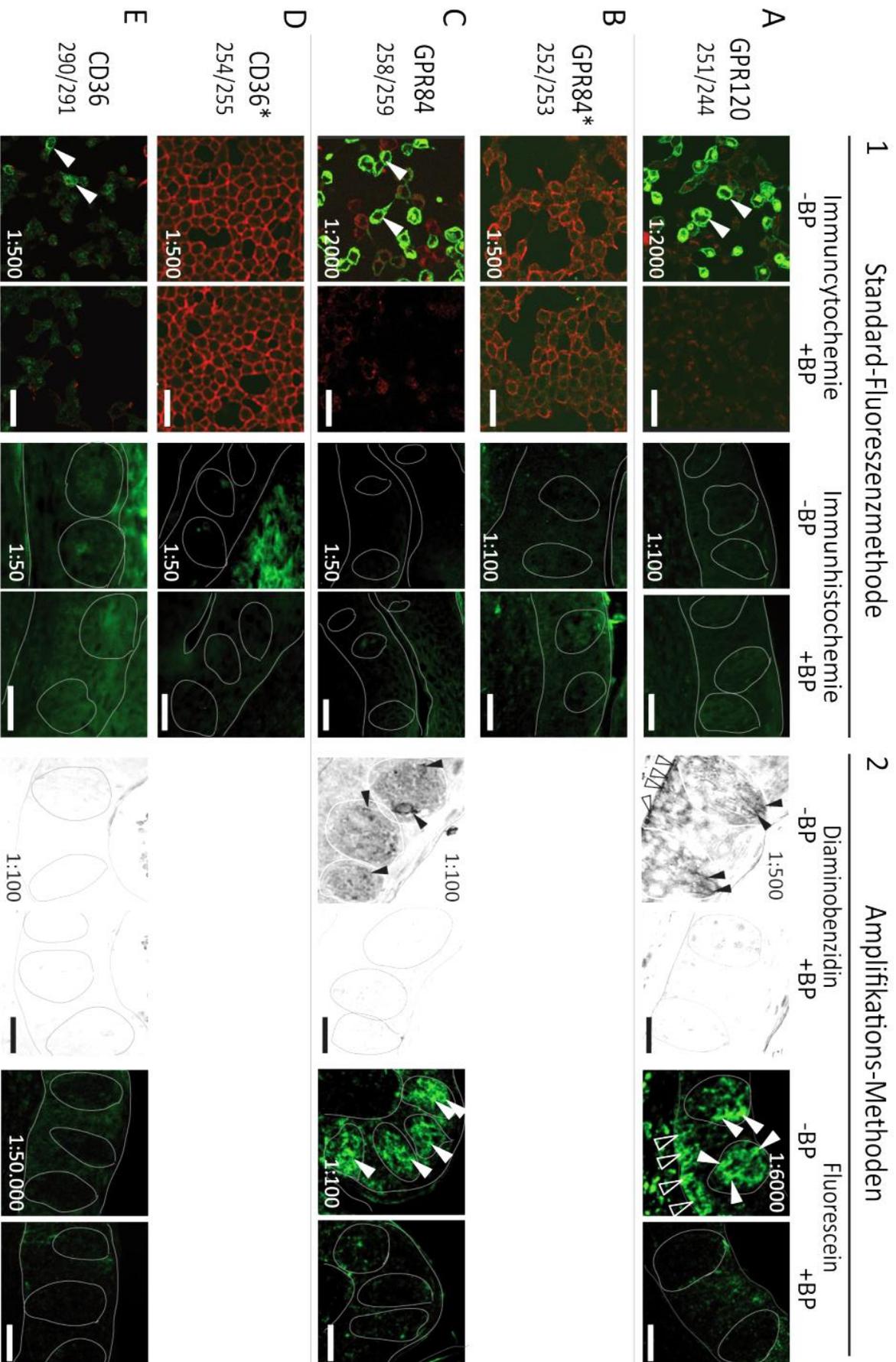
Nachdem für den fettsäuresensitiven Rezeptor GPR120 ein ausreichend sensitiver Antikörper und damit die Expression seines Proteins in den Geschmackszellen der humanen Wallpapille gefunden war, sollten die GPR120-exprimierenden Zellen näher untersucht werden. Hierzu war es nötig zum einen die GPR120-Antikörper-Färbung zu optimieren und ein Kofärbeprotokoll zu etablieren werden. Es sollte die Koexpression von Zelltyp-spezifischen Markern und anderen Geschmacksrezeptoren untersucht werden. Hierzu wurde ebenfalls zunächst ein funktionelles Screening humaner Zelltyp-marker-Antikörper durchgeführt.

Optimierung der immunhistochemischen GPR120-Färbung

Um den Zelltyp der GPR120-positiven Zellen zu bestimmen, ist es notwendig eine kombinierte Färbung mit verschiedenen Zelltypmarkern durchzuführen. Hierzu ist zum einen ein Fluoreszenz-basiertes Kofärbeprotokoll nötig, zum anderen eine Reihe sensitiver, spezifischer Antikörper zur Färbung der Geschmackszelltypen. Zusätzlich bedingt die Kofärbung zweier Antigene die Verwendung von Antikörpern, welche aus unterschiedlichen Spezies stammen, damit eine unabhängige Färbung dieser Antigene über Sekundärantikörper ermöglicht wird. Eine andere Möglichkeit bietet die direkte Fluoreszenz-Markierung wenigstens eines der beiden einzusetzenden Primärantikörper. Diese bietet den Vorteil, dass auch Kofärbungen mit Primärantikörpern der gleichen Spezies durchgeführt werden können. Sie hat jedoch den Nachteil, dass eine direkte Markierung oft mit Signalverlusten durch die fehlende Amplifikation einhergeht und daher nur sehr sensitive Antikörper für diese Markierung verwendet werden können. Bisher konnte das GPR120-Protein nur über eine Signal-verstärkende Amplifikationsmethode mit dem vorhandenen Antikörper sichtbar gemacht werden. Die direkte Färbung dieses Antikörpers über die Konjugation an einen Fluoreszenzfarbstoff (Kap. 2.2.2) war aufgrund geringer Sensitivität daher nicht möglich. Auch eine direkte Markierung einer Reihe getesteter Zelltypmarker-Antikörper erwies sich, bis auf die direkte Markierung des äußerst sensitiven PLC β 2-Antikörpers, als nicht ausreichend sensitiv. Zusätzlich erwiesen sich erste Kofärbungsversuche des GPR120 (Fluoresceintyramidmethode) mit dem Typ-II-Zellmarker PLC β 2 (direkt AF647-markiert) als nicht aussagekräftig, da sich die GPR120-Färbung im Kofärbeprotokoll stark verschlechterte (vgl. Abb. 14 A und B). Dies war auf eine obligatorische Nachbehandlung mit Paraformaldehyd¹⁸ zur Fixierung des Antikörper-Konjugats zurückzuführen.

Aus den beschriebenen Gründen musste zunächst das GPR120-Färbeprotokoll optimiert werden. Dazu wurde auch ein weiterer GPR120-Antikörper (u.a. publiziert für die Maus durch Cartoni et al. 2010) getestet. Hierbei wurden wiederum immunzytochemische Experimente mit GPR120-Vektor transfizierten HEK293T-Zellen, sowie immunhistochemische Experimente auf 10- μ m-Gefrier- und 5- μ m-FFPE-Schnitten durchgeführt. In den immunzytochemischen Experimenten erwies sich der Antikörper nach Aceton-Methanol-Fixierung als unzureichend sensitiv. Hingegen zeigten Färbungen mit vorheriger Fixierung in 4%igem Paraformaldehyd eine spezifische Färbung der transfizierten Zellen (Abb. 14 C). In immunhistochemischen Experimenten erwies sich der neue GPR120-Antikörper als ausreichend sensitiv für die Verwendung auf FFPE-Schnitten, erbrachte jedoch spezifische Färbungen auf Gefrierschnitten humaner Wallpapillen (Abb. 14 D). Hierbei konnte gar auf eine signalamplifizierende Färbemethode verzichtet werden, da sich der Antikörper auch mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper sensitiv genug nachweisen ließ.

¹⁸ Der *Zenon rabbit IgG direct labeling Kit* (Invitrogen) ermöglicht keine stabile permanente Konjugation des Antikörpers an die AF647-Fab-Fragmente. Dies bedingte eine, vom Hersteller vorgeschriebene, Nachfixierung der Konjugate mit Paraformaldehyd. Die permanente Konjugation war mit den verwendeten Antikörpern und dazu getesteten Kits nicht möglich.



Fortsetzung der Abbildung auf der nächsten Seite

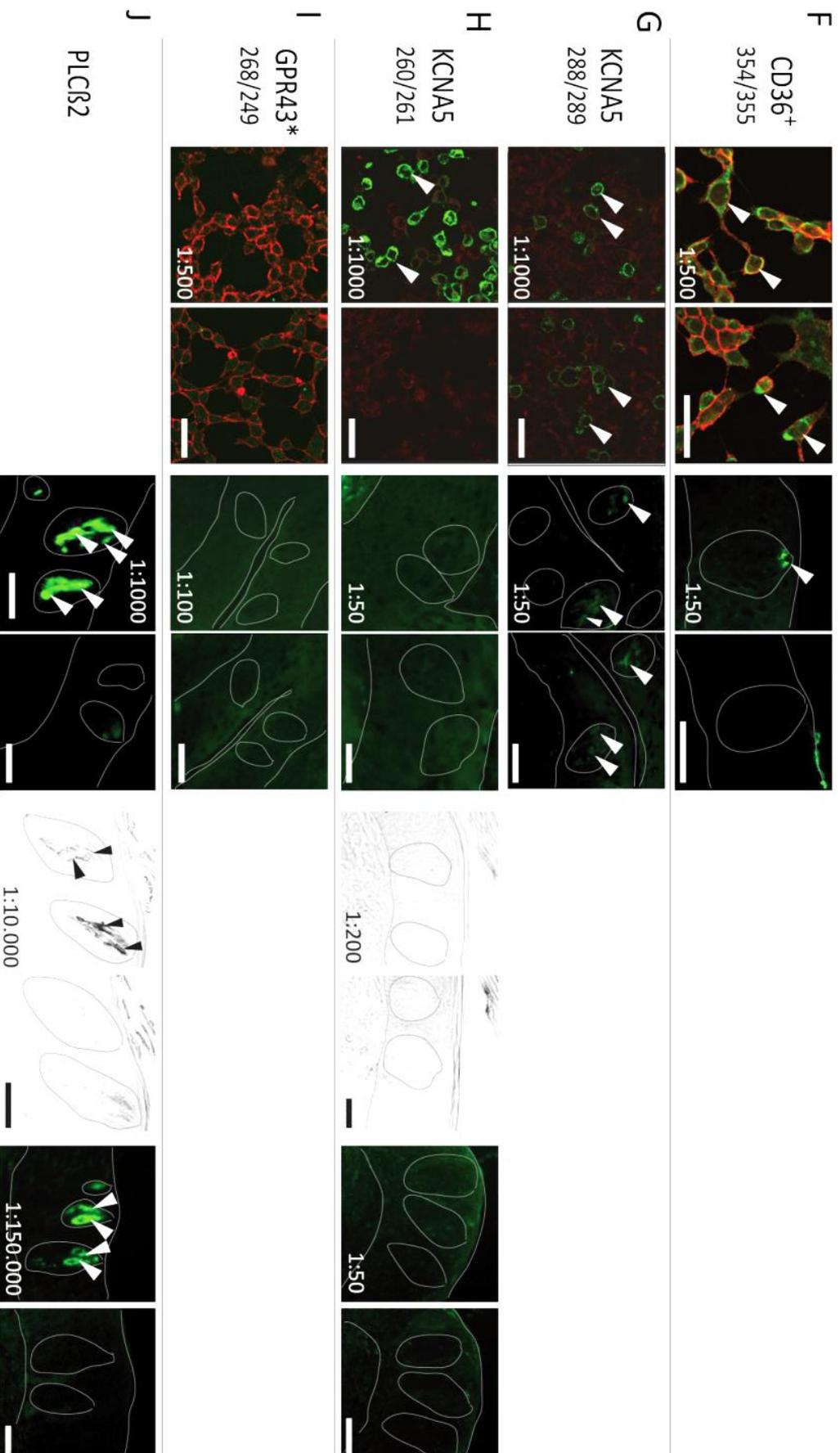


Abb. 13: Antikörperscreening der Fettsensorkandidaten. (1) Für jeden Kandidaten wurde die Funktionalität der Antikörper (AK) zunächst mit einer Standardfluoreszenzmethode untersucht. Für die Immunocytochemie wurden HEK293T-Zellen mit einem Rezeptor-cDNA-enthaltenden Vektor transfiziert und die Zellmembran durch Concanavalin-A-Färbung sichtbar gemacht (rot). Die immunhistochemische Färbung erfolgte über einen AF488-konjugierten Sekundär-AK (grün) auf 10-µm-Gefrierschnitten von humanen Wallpapillen. AK B, D, I erwiesen sich als nicht ausreichend sensitiv (weiße Pfeile). AK F und G zeigten unspezifische Färbungen bzw. ausschließlich Färbung im Porusbereich. Je ein AK für GPR120 (A), GPR84 (C), CD36 (E) und KCNA5 (H) erwies sich als ausreichend sensitiv und spezifisch auf transfizierten HEK293T-Zellen, jedoch nicht im Wallpapillengewebe. (2) Daher wurden diese AK weiter mittels Diaminobenzidin- und Fluoresceintyramid-Methode auf 5-µm-FFPE-Schnitten der Wallpapille untersucht, wobei eine enzymatische Signalverstärkung zur Erhöhung der Sensitivität erfolgt. Es zeigte sich allerdings nur für GPR120 eine spezifische, replizierbare Färbung. Die Färbung für GPR84 erwies sich als nicht reproduzierbar. Die GPR120-Immunreaktivität zeigte sich in einzelnen Geschmackszellen (gefüllte Pfeile) und im basalen Bereich des Geschmackszell-freien Epithels (leere Pfeile). -/+ BP: ohne/mit Vorinkubation des AK-spezifischen Blockierpeptids. J: funktionelle und Geschmackszell-spezifische Kontrollfärbung mit Anti-Phospholipase-Cβ2-AK. Zur einfacheren Zuordnung ist die interne Nummerierung der AK und BP angegeben. *Immunocytochemie durchgeführt von MM Galindo (DfE). +Protokoll nach Simons et al. 2011. Maßstab: 30 µm.

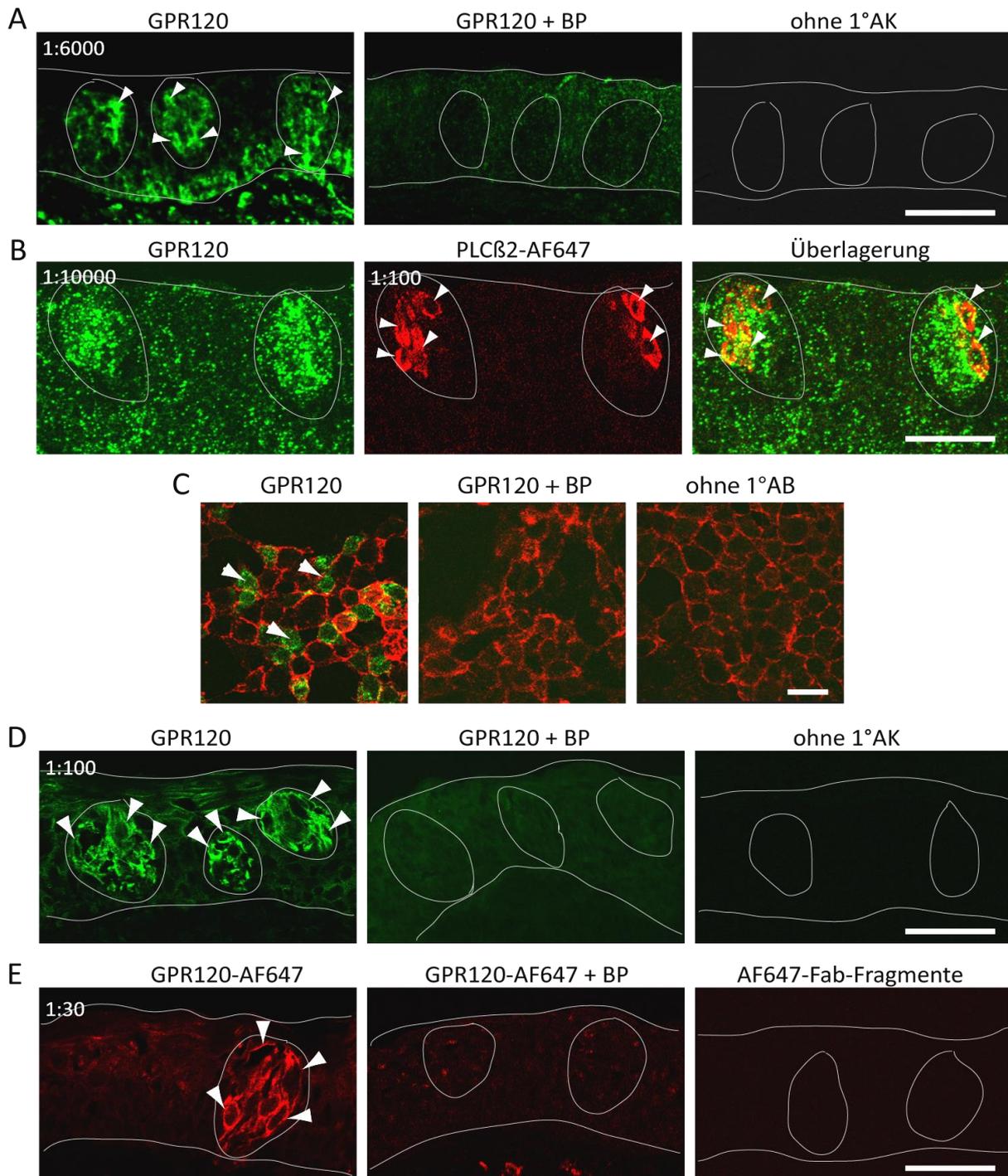


Abb. 14: Optimierung der GPR120-Proteinfärbung. (A) Immunhistochemische Färbung mit dem bisherigen GPR120-AK (MBL-A2003) über eine FT-Amplifikation auf FFPE-Schnitten der humanen Wallpapille. Die Spezifität ist durch die Vorinkubation mit spezifischem Blockierpeptid und Weglassen des Primärantikörpers gezeigt. (B) Die Kombination des FT-GPR120-Färbeprotokolls (grün) mit dem Färbeprotokoll des AF647-konjugierten PLCβ2-Antikörpers führte jedoch zu einer starken Verschlechterung der GPR120-Färbung, die keine Aussage über eine Kolorisation zulässt. (C und D) Die Immunzyto- und -histochemische Färbung des GPR120-Proteins mit einem neuen AK (MBL-A2004) erwies sich als sensitiv und spezifisch. Hierbei konnte auf die Standardmethode mit fluoreszierendem Sekundärantikörper und 10-µm-Gefrierschnitten der humanen Wallpapille zurückgegriffen werden. (E) Auch eine direkte Markierung mit dem an Fab-Fragmente (anti-Kaninchen IgG) gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff AF647 erwies sich für diesen Antikörper als durchführbar, wenn auch unter Sensitivitätsverlust und dementsprechenden Einsatz höherer Konzentrationen des Antikörpers (1:30). Eine unspezifische Färbung durch unkonjugierte AF647-Fab-Fragmente trat nicht auf. Pfeile: positive gefärbte Zellen. AK: Antikörper. FT: Fluoresceintyramid. BP: Blockierpeptid. -1°AK: Färbung nach Weglassen des Primärantikörpers. Aufnahmen: Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) (A, D) und Kofokalmikroskop (Leica) (B, C, E). Größenmarker: 50 µm (A, B, D, E) und 10 µm (C).

Die Möglichkeit zur Verwendung von Gefrierschnitten und der Standard-Fluoreszenzmethode, vereinfachte und verkürzte zusätzlich das Gesamtfärbeprotokoll (Tab. 5). Eine weitere Verbesserung der Färbung und der Gewebeschnittqualität erbrachte die Vergrößerung der Gewebeschnittdicke von 10 auf 16 μm . Zusätzlich war mit diesem Antikörper eine Färbung über eine direkte Konjugation an den Fluoreszenzfarbstoff AF647 möglich (Abb. 14 E). Somit eröffnete sich die Möglichkeit einen Zelltypmarker-Antikörper zu nutzen, der aus derselben Spezies stammte wie der GPR120-Antikörper. Hierdurch wurde die Auswahl an Zelltypmarker-Antikörpern für das funktionelle Screening beträchtlich erhöht.

Identifizierung funktioneller Antikörper für humane Geschmackszelltypmarker

Um den GPR120-exprimierenden Zelltyp in immunhistochemischen Kofärbungen näher zu charakterisieren wurde ein Zelltypmarkerscreening durchgeführt um ausreichend sensitive, humanreaktive Antikörper zu finden, die mit dem etablierten Kofärbeprotokoll für den GPR120-Antikörper A2004 kombiniert werden konnten. Die humanreaktiven Antikörper sollten auf Gefrierschnitten eine möglichst eindeutige, spezifische Geschmackszellfärbung aufweisen, um eine Aussage bezüglich der Kolo-kalisierung mit dem GPR120-Protein erhalten zu können.

Zum einen sollte geklärt werden in welchem Geschmackszelltyp das GPR120-Protein exprimiert ist. Zum anderen stellte sich die Frage, ob der Fettsäuresensitive Rezeptor mit Rezeptoren anderer Geschmacksqualitäten koexprimiert ist. Allgemein ist eine Unterteilung der Geschmackszellen hinsichtlich ihrer morphologischen Eigenschaften u.a. in Typ-I, -II- und -III-Zellen gängig (vgl. Kap. 1.1.1). Es wurden daher für jeden Geschmackszelltyp Antikörper verwendet, welche gegen ein für diesen Zelltyp spezifisches Markerprotein gerichtet ist. Für die Grundgeschmacksqualitäten süß, umami und bitter wurden Antikörper gegen die für diese Qualitäten spezifischen Rezeptoren (TAS1R1, -R2 und -R3) bzw. im Fall von bitter einem stellvertretenden Bitterrezeptor (TAS2R38) verwendet. Insgesamt wurden 36 verschiedene Antikörper getestet. Hiervon waren 18 Antikörper mit der Standardfluoreszenz-Methode auf Gefrierschnitten der humanen Wallpapille nichtsensitiv genug und erbrachten keine Färbung. Vier weitere Antikörper zeigten eine sehr schlechte und/oder unspezifische Färbung. Sechs Antikörper erwiesen sich zwar als mehr oder weniger sensitiv, jedoch war die Qualität der Färbung entweder nicht ausreichend oder verschlechterte sich in Kombination mit dem Kofärbeprotokoll. Letztendlich konnten jedoch für jeden Zelltyp (I: Glast, II: PLC β 2, III: SNAP-25), für die Geschmacksqualitäten süß (TAS1R1, -R3), umami (TAS1R1, -R3) und bitter (TAS2R38), sowie einer weiteren Phospholipase-Variante (PLC β 3) jeweils ein Antikörper gefunden werden, der eine erste Beurteilung der Koexpression und Charakterisierung der GPR120-exprimierenden Zellen ermöglichte. Die immunhistochemischen Färbungen dieser Antikörper sind mit ihren Spezifitätskontrollen in Abb. 15 gezeigt. Als Spezifitätskontrolle wurden, wo möglich, Färbungen nach Vorinkubation des Antikörpers mit einem spezifischen Blockierpeptid, oder Färbungen, bei denen der Primärantikörper weggelassen wurde, durchgeführt.

3.1.5 Charakterisierung GPR120-exprimierender Zellen

Nachdem die immunhistochemische GPR120-Proteinfärbung optimiert und funktionelle Geschmackszelltyp-Marker gefunden waren, erfolgte die Charakterisierung der GPR120-exprimierenden Geschmackszellen. Hierfür sollte geklärt werden, welchem Geschmackszelltyp die GPR120-exprimierenden Zellen angehören und ob es eine Koexpression mit Rezeptoren anderer Geschmacksqualitäten gibt. Hierzu wurden 16- μm -Gefrierschnitte humaner Wallpapillen angefertigt und mit dem zuvor etablierten Kofärbeprotokoll gefärbt. Die Zelltypmarker-Färbung erfolgte dabei über einen grün fluoreszierenden Sekundärantikörper (AF488) und die GPR120-Färbung über die direkte Konjugation des Primärantikörpers mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff AF647.

Außerdem erfolgte eine Zellkernfärbung über den blau fluoreszierenden Farbstoff DAPI, um die Schnitte zunächst am automatisierten Fluoreszenz-Scanmikroskop Mirax MIDI (Zeiss) einheitlich und vollständig einzuscannen. Für eine bessere Auflösung und detailliertere Auswertung sowie zur Differenzierung einzelner Zellen wurden die einzelnen Geschmacksknospen aller 16- μ m-Schnitte nochmals mit Hilfe eines konfokalen Laserscanmikroskops auf verschiedenen z-Ebenen (Abstand $\sim 0,5 \mu\text{m}$) gescannt und ausgewertet. Die Kofärbung des GPR120-Proteins mit verschiedenen Zelltypmarkern und mit Rezeptoren anderer Geschmacksqualitäten ist in Abb. 16 dargestellt. Zunächst soll jedoch die genauere Morphologie der GPR120-Zellen betrachtet werden.

Tab. 5: Vergleich der etablierten Kofärbeprotokolle der GPR120-Antikörper A2003 und A2004 (MBL).

Methode	A2003: Fluoresceintyramid (FFPE-Schnitte)	A2004: Standard-Fluoreszenz (Gefrierschnitte)
Vorbehandlung	Deparaffinieren und Rehydrieren	35 min
	Antigen-Wiederherstellung durch NaCitrat-Behandlung	40 min
	Waschen	3x 5 min
	Blockieren endog. Peroxidasen	30 min
	Waschen	3x 5 min
	Permeabilisieren des Gewebes	10 min
	Waschen	3x 5 min
	Blockieren unsp. Bindungen	30 min
1. Färbung	1°Antikörper bei 4°C/RT (GPR120)	ü.N./60 min
	Waschen	3x 5 min
	2°Antikörper bei RT	60 min
	Waschen	3x 5 min
	Inkubation mit HRP-Komplex	30 min
	Waschen	3x 5 min
	Fluoresceintyramid-Reaktion	6 min
	Waschen	3x 5 min
2. Färbung	1°AK-Konjugat bei RT (Zelltypmarker)	60 min
	Waschen	3x 5 min
	Nachfixieren in 4% PFA	15 min
	Waschen	3x 5 min
Kernfärbung	DAPI bei RT	5-10 min
	Waschen	5 min
	Eindecken	

RT: Raumtemperatur. HRP: horse radish peroxidase (Meerrettichperoxidase). PFA: Paraformaldehyd. FFPE: Formaldehyd-fixierte Paraffinschnitte.

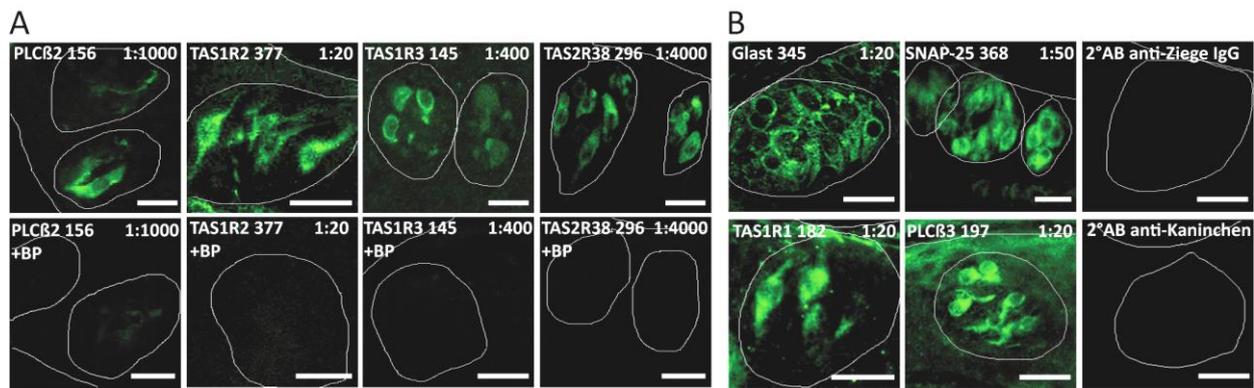


Abb. 15: Färbung mit ausreichend sensitiven Antikörpern humaner Geschmackszelltypmarker und Geschmacksrezeptoren. Es wurden immunhistochemische Färbungen über einen fluoreszierenden Sekundärantikörper auf 16- μ m-Gefrierschnitten humaner Wallpapillen durchgeführt. (A) Färbung der Phospholipase C β 2 (Typ-II-Zellmarker) und der Geschmacksrezeptoren TAS1R2 (süß), TAS1R3 (süß und umami) und TAS2R38 (bitter). Kontrollfärbungen nach Vorinkubation mit dem spezifischen Blockierpeptid (untere Reihe) zeigen die Spezifität der Färbung. (B) Färbung des Typ-I-Zellmarkers Glast, des Typ-II-Zellmarkers PLC β 3, des Typ-III-Zellmarkers SNAP-25 und des Geschmacksrezeptors TAS1R1 (umami). Da für diese Antikörper keine Blockierpeptide verfügbar waren, erfolgte die Kontrolle auf unspezifische Färbung durch Inkubation ohne Primärantikörper - jeweils für die Verwendung der Sekundärantikörper gegen Anti-Kaninchen- oder Anti-Ziegen-IgG. Zur einfacheren Zuordnung ist die jeweilige interne Nummerierung des Antikörpers angegeben. +BP: Vorinkubation des Primärantikörpers mit dem für sein Epitop spezifischen Blockierpeptid. Aufnahmen: Mirax Scansystem. Größenmarker: 30 μ m.

Morphologie der GPR120-exprimierenden gustatorischen Zellen

Bei Betrachtung der mit dem GPR120-Antikörper gefärbten Zellen, ließen sich zwei morphologische Zelltypen unterscheiden. Ein Teil der GPR120-exprimierenden Zellen zeigte eine klare spindelförmige Struktur mit großem, runden Zellkern wie sie Zellen vom Typ II oder Typ III zeigen (Abb. 16), während ein anderer Teil der Zellen eher einen Typ-I-artigen Charakter aufwies. Diese Zellen haben eine lamellenartige Struktur und wickeln sich um andere Zellen herum. Daher ist ihr Zellkern eher schmal, oftmals nicht rund/oval und der Zellkörper eher unregelmäßig, mit langen dünnen Ausläufern. Querschnitte von Geschmacksknospen, in welchen das GPR120-Protein mit einem in Typ-II-Zellen exprimierten Protein kogefärbt ist, lassen den „umwickelnden“-Charakter der Typ-I-Morphologie einiger GPR120-Zellen vermuten (Abb. 16A und Abb. 17A PLC β 3).

Kofärbung des GPR120-Proteins mit Proteinen verschiedener Geschmackszelltypmarker

Bei der immunhistochemischen Färbung mit verschiedenen Zelltypmarkern zeigte sich eine Kolo-kalisation der GPR120-Färbung mit den Färbungen eines Typ-I- und eines Typ-III-Zellmarkers. Hierfür konnte eine große Anzahl an Geschmacksknospen ausgewertet werden (27 bzw. 40 Knospen). Wie schon zuvor anhand der GPR120-Einzelfärbung vermutet, gehört ein Großteil der GPR120-exprimierenden Zellen dem Typ I an, wie die Kofärbung mit dem Typ-I-Zellmarker GLAST zeigt (Abb. 17A). Wie beschrieben, umhüllen Zellen vom Typ I meist lamellenartig andere Zelltypen. Diese Morphologie birgt jedoch die Schwierigkeit, weder einzelne Typ-I-Zellen voneinander abzugrenzen (vgl. Abb. 17A GLAST), noch die Kofärbung mit anderen Zelltypen genau zu beurteilen. Häufig tritt durch die Ummantelung der anderen Zellen eine falsch-positive Kofärbung auf (Abb. 16C). Für die Kofärbung mit dem Typ-III-Zellmarker SNAP-25 zeigte sich ebenfalls keine komplette Überlagerung der Zellen. Es fanden sich neben den kogefärbten Zellen sowohl GPR120-positive aber SNAP-25-negative Zellen, als auch umgekehrt, SNAP-25-positive aber GPR120-negative Zellen. Für die Kofärbung mit Phospholipase C β 2, welche in einem Großteil der Typ-II-Zellen exprimiert ist, ließen sich keine Zellen finden, die sowohl GPR120- als auch PLC β 2 exprimieren (Abb. 17A). Hierbei muss allerdings erwähnt werden, dass die Anzahl an gut gefärbten Geschmacksknospen hier nur sehr gering war (6 Knospen), da sich die PLC β 2-Färbung im Kofärbeprotokoll durch die

erforderliche Nachfixierung mit Paraformaldehyd stark verschlechterte (statt klar abgegrenzten Zellen - vgl. Abb. 15A PLC β 2, eher ungenaue Zellstrukturen - Abb. 17A PLC β 2- oder gar ein „wolki-ger“ Farbverlauf). Die Färbung mit einer weiteren in den Typ-II-Zellen exprimierten Phospholipase C β 3, ergab jedoch ebenfalls keine Kollokalisierung mit dem GPR120-Protein (Abb. 17A).

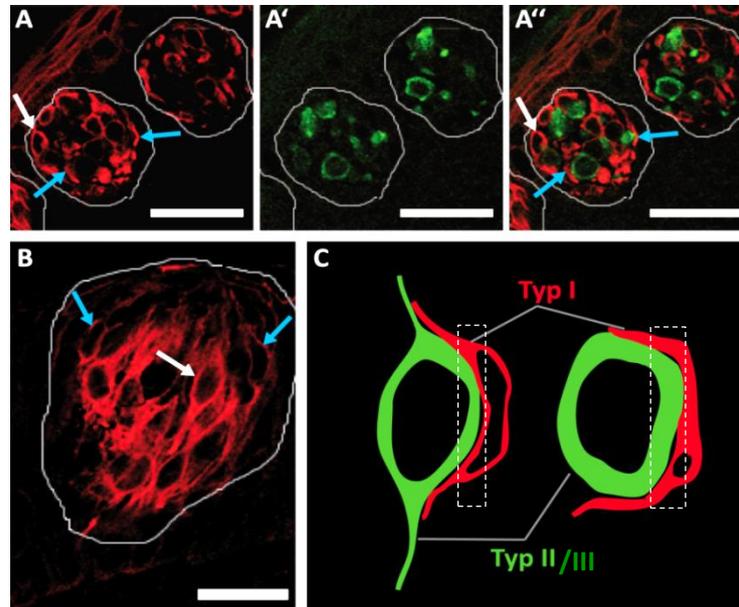


Abb. 16: Morphologie der GPR120-Zellen im Vergleich zu Typ-I- und Typ-II/III-Zellen. A-A'': Beispiel der Kofärbung von GPR120 (rot) und TAS1R3 (grün), welcher in Zellen des Typ II exprimiert ist, in quer angeschnittenen Geschmacksknospen. **B:** Vergrößerung der Aufnahme einer GPR120-Färbung in einer längs angeschnittenen Geschmacksknospe. Weiße Pfeile zeigen beispielhaft Typ-II/III-artige GPR120-Zellen, während blaue Pfeile Typ-I-artige Zellen zeigen. **C:** Schematische Darstellung von Typ-II/III-artige Zellen und sie umwickelnde Typ-I-artige Zellen in Längs- (links) und Querschnitt (rechts). Bei einer mikroskopischen Scanebene von $z = 0,5 \mu\text{m}$ können jedoch durch den umwickelnden Charakter Bereiche auftreten, welche falsch-positive Kofärbungen erbringen (gestrichelter Rahmen). Maßstab: $30 \mu\text{m}$.

Kofärbung des GPR120-Proteins mit Rezeptorproteinen anderer Geschmacksqualitäten

Bei der Kofärbung des GPR120-Proteins mit den Proteinen von Geschmacksrezeptoren anderer Geschmacksqualitäten ergab sich in der Mehrzahl der GPR120-exprimierenden Zellen keine Kollokalisierung mit den Geschmacksrezeptoren TAS1R1 (umami), TAS1R2 (süß), TAS1R3 (süß und umami) und TAS2R38 (bitter). Geschmackszellen, die Rezeptoren der anderen Geschmacksqualitäten exprimieren, traten allgemein in einer geringeren Anzahl auf als Zellen, die den fettsäuresensitiven Rezeptor GPR120 exprimieren. Die Expression dieser Geschmacksrezeptoren wurde bisher vorrangig in Typ-II-Geschmackszellen beschrieben (vgl. Kap. 1.3.2). Dennoch zeigten sich in den Kofärbungen dieser Arbeit in einzelnen Geschmacksknospen einige wenige GPR120-positive Zellen, welche auch die spezifischen Untereinheiten des Süß- oder Umamirezeptors exprimierten (Abb. 17B). Interessanterweise zeigte sich mit dem Bitterrezeptor TAS2R38 und der Süß-/Umamirezeptor-Untereinheit TAS1R3 keinerlei Kollokalisierung mit GPR120 (Abb. 17B).

Quantifizierung der GPR120- und Zelltypmarker-exprimierenden Zellen

Um ein genaueres Bild über die quantitative Ausprägung der Kofärbungen zu erhalten, wurden die gefärbten Geschmackszellen aller Geschmacksknospen ausgezählt. Dies erfolgte anhand der Aufnahmen des Konfokalmikroskops, deren Auflösung entlang der z-Achse $0,5 \mu\text{m}$ betrug, um eine bessere Unterscheidung zwischen eigentlicher Koexpression in einer einzelnen Zelle und der Überlagerung der Färbung zweier verschiedener Zellen treffen zu können. Hierbei wurden mit Unterstützung der Adobe-Photoshop-Software die Gesamtanzahl der GPR120-positiven Zellen, die Gesamtanzahl der

Marker-positiven Zellen, sowie die Anzahl an Zellen, die eine Kolokalisation der Färbungen (gelb) aufwiesen je Geschmacksknospenquerschnitt bestimmt. Insgesamt konnten 2198 Zellen von 149 Geschmacksknospen ausgezählt werden. Die Anzahl und Anteile der entsprechenden Zellen sind der Abb. 18A zu entnehmen. Es fanden sich durchschnittlich 9,5 GPR120-positive Zellen je Geschmacksknospenquerschnitt. Im Vergleich zur Verteilung der anderen Geschmacksrezeptoren ist die Expression damit mehr als doppelt so hoch (Abb. 18B). Die Anzahl an positiven Zellen je Knospenquerschnitt lag für die Geschmacksrezeptoren des Umami-, Süß- und Bittergeschmacks zwischen 2,6 und 4,8. Die Phospholipasen PLC β 2 und PLC β 3 fanden sich in ähnlicher Zahl (6,8 bzw. 4,8 Zellen je Knospenquerschnitt). Hingegen bilden den größten Anteil die Typ-I- (GLAST-positiven) und die Typ-III- (SNAP-25) positiven Zellen mit durchschnittlich 14,6 bzw. 12,5 Zellen pro Knospenquerschnitt. Betrachtet man nun die Anteile der Marker-positiven Zellen an den GPR120-positiven Zellen (Abb. 18C) so zeigt sich, dass 59,8 % der GPR120-Zellen dem Typ I (GLAST-positiv) bzw. 75,0 % dem Typ III (SNAP-25-positiv) angehören. Wie erwähnt, wurde keine Kolokalisation mit dem Typ-II-Zellmarker PLC β 2 gefunden. Laut Literatur herrscht die Annahme, dass es keine Überlappung der Typ-I-, Typ-II- und Typ-III Zellen gibt (Ozdener et al. 2011). Somit müssten die berechneten Anteile der Typ-I-, -II und -III-Zellen an den GPR120-positiven Zellen 100 % ergeben. Da dies nicht der Fall war (135 %), scheint ein hoher Fehler an falsch-positiv gezählten, kogefärbten Zellen aufzutreten¹⁹. Dies ist vermutlich auf die Morphologie der Typ-I-artigen GPR120-Zellen zurückzuführen, deren Kolokalisation mit anderen Zellen schwer zu beurteilen ist, da sie andere Zellen umhüllen. Der Anteil an GPR120-positiven Zellen, die auch einen der Umami- oder Süßrezeptoruntereinheiten exprimieren, beläuft sich auf 13,5 % (TAS1R1) bzw. 4,2 % (TAS1R2). Auch hier ist der reale Anteil vermutlich geringer aufgrund des oben erwähnten Fehlers durch falsch positive Zellen. Abb. 18D verdeutlicht die durchschnittliche Anzahl der Zellen je Knospe, sowie die Verhältnisse der gezählten roten (GPR120 allein), grünen (Marker allein) und gelben (GPR120 und Marker gemeinsam) Zellen in Form von Mengendiagrammen.

3.1.6 Expression von GPR120-Spleißvarianten in humanen Geschmackspapillen

Nachdem sowohl die mRNA-Expression von GPR120, als auch dessen Protein-Expression in humanen Geschmackspapillen gezeigt und charakterisiert werden konnte, sollte die Expression von GPR120-Spleißvarianten untersucht werden. Der fettsäuresensitive G-Protein gekoppelte Rezeptor GPR120 wurde 2003 im Rahmen einer Analyse der humanen Genomdatenbank mit weiteren neuen Mitgliedern der G-Protein-Superfamilie entdeckt und 2005 experimentell charakterisiert (Fredriksson et al. 2003, Hirasawa et al. 2005). Das translatierte Protein hat eine Länge von 377 Aminosäuren (NP_859529.2) und wird durch eine vier Exons umfassende mRNA (NM_181745) kodiert. Später wurde zusätzlich eine kürzere Spleißvariante (NM_001195755.1) der GPR120-mRNA aus dem Gastrointestinaltrakt beschrieben, welche spezifisch im Menschen exprimiert zu sein scheint (Moore et al. 2009). Dieser kürzeren Variante fehlt das durch 48 bp kodierte Exon 3, sodass dem hieraus abgeleiteten Protein (NP_001182684.1) 16 Aminosäuren in der 3. intrazellulären Schleife fehlen (Abb. 19A). Da Geschmackssystem-spezifische Varianten zuvor schon für andere Rezeptoren identifiziert worden waren, u.a. eine trunkeerte Form des mGluR4 (Chaudari et al. 2000), einem möglichen zusätzlichen Umami-Geschmacksrezeptor, stellte sich die Frage, welche der beschriebenen GPR120-Varianten in den humanen Geschmackspapillen gefunden wurde. Dazu wurde ein weiteres spezifisch im Exon 3 des Rezeptors bindendes Oligonukleotidpaar entworfen, welches spezifisch die lange GPR120-Variante detektiert.

¹⁹ Die Betrachtung des Fehlers und Neuberechnung der Anteile findet sich in Kap. 4.1.4, S.96.

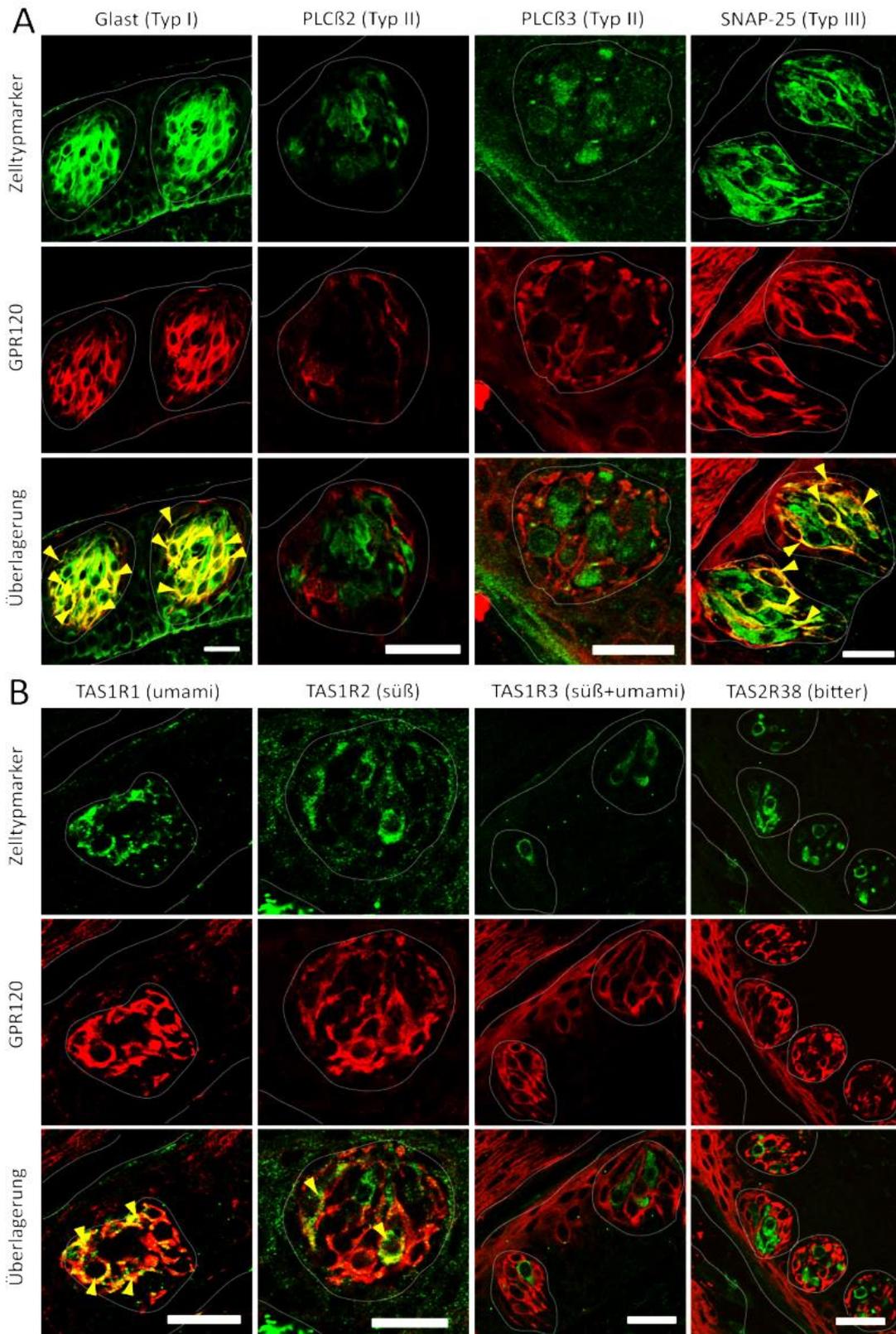


Abb. 17: Immunhistochemische Kofärbung des GPR120-Proteins mit Markerproteinen verschiedener Geschmackszelltypen. Es wurden 16- μ m-Gefrierschnitte von humanen Wallpapillen angefertigt und einer immunhistochemischen Kofärbung unterzogen. Hierbei wurde die GPR120-Immunoreaktivität über eine direkte Markierung des Antikörpers mit AF647-Fab-Fragmenten (rot) nachgewiesen, während der jeweilige Antikörper des Zelltyp-spezifischen Proteins über einen AF488-gekoppelten Sekundäntikörper gefärbt wurde. Die Überlagerung der Farbkanäle ergibt bei Koexpression eine gelbe Färbung. Gelbe Pfeile: Ausgewählte GPR120-positive Zellen, welche mit Zellen des jeweiligen Marker kolokalisieren. Kofärbung mit **(A)** Typ-I-, Typ-II- und Typ-III-Zellmarkern und **(B)** mit Rezeptoren der Geschmacksqualitäten umami (TAS1R1/3), süß (TAS1R2/3) und bitter (TAS2R38). Ein Großteil der GPR120-positiven Zellen zeigte eine Kolokalisation mit dem Typ-I- und Typ-III-Marker. Einige wenige GPR120-Zellen zeigten auch eine TAS1R1- oder TAS1R2-Färbung. Maßstab: 30 μ m. Scanebene = 0,5 μ m.

A

Marker/Geschmacksrezeptor	Anzahl ausgezählter Knospenquerschnitte	Anzahl ausgezählter Zellen	Anzahl Zellen je Knospenquerschnitt			Zellen gesamt je Knospenquerschnitt		Anteil [%] der GPR120-positiven Zellen
			Marker & GPR120 (gelb)	Marker allein (grün)	GPR120 allein (rot)	Marker	GPR120	
GLAST (Typ I)	27	510	6,9 ± 4,0	7,8 ± 4,3	4,3 ± 2,8	14,6 ± 7,1	11,1 ± 4,8	59,8 ± 24,4
PLCβ2 (Typ II)	6	94	0,0 ± 0,0	6,8 ± 2,6	8,8 ± 2,6	6,8 ± 2,6	8,8 ± 2,6	0,0 ± 0,0
PLCβ3 (Typ II)	10	183	0,0 ± 0,0	4,8 ± 2,1	10,5 ± 2,4	4,8 ± 2,1	10,5 ± 2,4	0,0 ± 0,0
SNAP-25 (Typ III)	40	606	7,3 ± 4,2	5,2 ± 3,5	2,4 ± 2,3	12,5 ± 6,0	9,8 ± 5,3	75,0 ± 19,6
Summe								135
TAS1R1 (umami)	18	221	1,3 ± 1,5	2,9 ± 2,1	8,0 ± 4,0	4,3 ± 1,4	9,3 ± 3,6	13,5 ± 15,5
TAS1R2 (süß)	22	215	0,5 ± 0,9	2,2 ± 1,7	7,1 ± 2,6	2,6 ± 2,0	7,6 ± 3,2	4,2 ± 7,3
TAS1R3 (umami + süß)	20	282	0,0 ± 0,0	4,6 ± 2,9	9,6 ± 4,4	4,6 ± 3,0	9,6 ± 4,4	0,0 ± 0,0
TAS2R38 (bitter)	6	87	0,0 ± 0,0	4,8 ± 1,8	9,7 ± 2,1	4,8 ± 1,8	9,7 ± 2,1	0,0 ± 0,0
Summe bzw. MW	149	2198					9,5 ± 1,1	

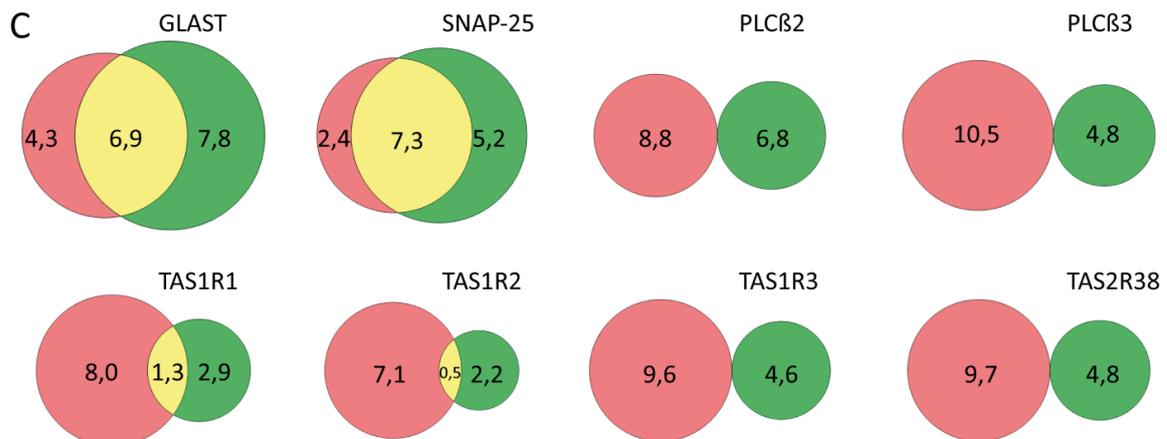
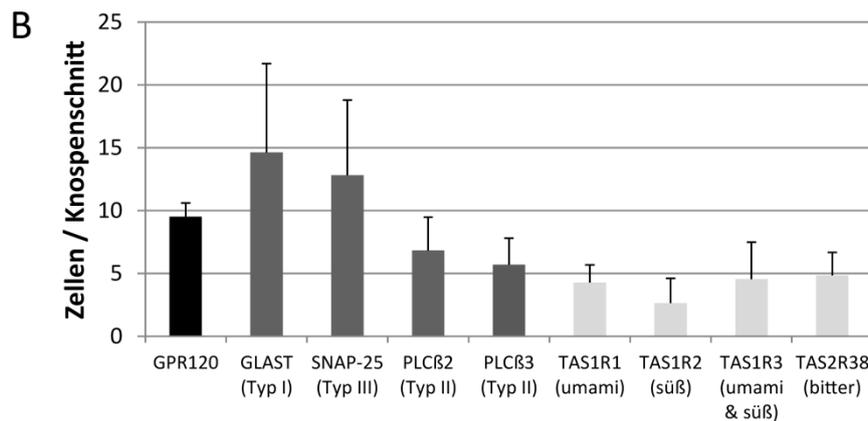


Abb. 18: Quantifizierung von GPR120- und Zelltypmarker-exprimierenden Zellen. Zur Quantifizierung der Kofärbung von GPR120-exprimierenden Zellen und Zelltyp- bzw. Geschmacks-spezifischen Proteinen wurden 16-µm-Gefrierschnitte humaner Wallpapillen nach dem etablierten Kofärbeprotokoll gefärbt und einzelne Ebenen entlang der z-Achse (0,5 µm) der Geschmacksknospen mit einem konfokalen Lasermikroskop (Leica) gescannt. Anhand der Auswertung der roten (AF647) und grünen (AF488) zellulären Signale, sowie der Überlagerung beider Farbkanäle wurde die Anzahl der jeweiligen Marker-positiven und GPR120-positiven Zellen (gelb) bestimmt. **(A)** Anzahl ausgezählter Geschmacksknospen und Zellen, sowie entsprechende durchschnittliche Anzahl Zellen je Knospe und Anteil der entsprechenden Marker an den GPR120-positiven Zellen. Angegeben sind Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung bzw. die Summe aller ausgezählten Knospen und Zellen. **(B)** Verteilung der mittleren Zellzahl der Zelltypen in einer Geschmacksknospe. **(C)** Verteilungsmuster der GPR120- (rot) und Markerzellen (grün). Der Anteil koexprimierender Zellen ist in gelb dargestellt. Angegeben ist die mittlere Anzahl Zellen je Knospenquerschnitt.

Die cDNA humaner Geschmackspapillen und Geschmackszell-freiem Zungengewebe sowie cDNA des humanen Kolons wurden mittels RT-PCR (Kap. 2.1.5) untersucht (Abb. 19C). Parallel wurde in selbigen Proben das ursprüngliche Oligonukleotidpaar verwendet, welches zur Amplifikation beider Varianten genutzt werden kann (Abb. 19B). Außerdem wurden zur genaueren Kontrolle der Produktgrößen und als Positivkontrolle Plasmidvektoren als Matrize genutzt, in die die kurze (S) oder lange (L) Variante des GPR120-Gens eingebracht wurde. Es zeigte sich, dass die lange Variante ausschließlich in humaner Kolon-cDNA detektiert werden konnte. Die kurze Variante ist jedoch in allen Geweben, einschließlich des Geschmacksgewebes, detektierbar. Auffällig, auch schon im vorangegangenen Rezeptorscreening (Abb. 12, Kap. 3.1.2), waren die mit dem GPR120-S/L-Primerpaar erhaltenen zusätzlichen PCR-Produkte mit einer Größe von etwa 300 bp. Diese entsprachen weder der beschriebenen kurzen, noch der langen Variante der GPR120-mRNA. Sie waren in den cDNA-Proben der humanen Wallpapille und des humanen Kolons zu finden und es stellte sich die Frage, ob sie einer weiteren, unbekanntem Variante entsprechen. Daher wurden sowohl diese PCR-Produkte als auch die erhaltenen Produkte der bekannten kurzen und langen Variante aus dem Gel isoliert, in TOPO-Vektoren eingebracht (Kap. 2.1.6) und sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels Vector-NTI-Software analysiert (Kap. 2.1.7). Die erwarteten PCR-Produkte (405 und 453 bp für das GPR120-S/L-Primerpaar, 300 bp für das GPR120-L-spezifische Primerpaar) entsprachen der mRNA Sequenz der kurzen bzw. langen GPR120-Variante. Die Sequenz des über das GPR120-S/L-Primerpaar erhaltenen, zusätzlichen Produkts der Wallpapillen- und Kolon-cDNA (Abb. 19B) entsprach 297 bp der GPR120-mRNA. Ihr fehlten sowohl Exon 3 als auch weitere 108 bp inmitten des 4. Exons. Es stellte sich die Frage, ob dieses Produkt lediglich ein PCR-Artefakt oder eine Variante der GPR120-mRNA darstellt und der 108 bp große Bereich einem alternativen Intron entspricht, welches im Normalfall beibehalten wird (sog. *Intron-Retention*). Hierzu wurde die Sequenz genauer untersucht. Das Fehlen der 108 bp führt nicht zur Verschiebung des offenen Leserahmens bei der Translation, so dass ein GPR120-Protein entstehen würde, welchem 36 AS fehlen. Diese entsprechen dem Großteil der 6. Transmembrandomäne, der 3. extrazellulären Schleife und einem Teil der 7. Transmembrandomäne (Abb. 19A). Es findet sich zwar an den vermeintlichen Exon/Intron-Übergängen an beiden Seiten des Introns eine sich wiederholende Basensequenz (cc ctc ttc, entsprechend der Aminosäuren T/S -L -F), jedoch sind keine spezifischen, aus der Literatur bekannten Spleißmotive zu finden. Somit handelt es sich vermutlich um ein PCR-Artefakt.

3.1.7 Charakterisierung der GPR120-Expression im Gesamtgewebe der Wallpapillen

Die Möglichkeit zur Verwendung von völlig intaktem Biopsiematerial der Wallpapille, welches vollständige Papillengräben und größere Anteile der Von-Ebner-Drüsen enthält, ist selten. Die Verfügbarkeit eines solchen Materials ermöglichte nicht nur die Auszählung einer Vielzahl von Geschmackszellen und -knospen in den Kofärbungen (vgl. Kap. 3.1.5), sondern erlaubte auch die weitere Charakterisierung der GPR120-Proteinexpression im Geschmackszell-freien Gewebeanteil. Hierbei wurde in den immunhistochemischen Experimenten beobachtet, dass sich die GPR120-Immunreaktivität besonders im Epithelbereich des Geschmackgrabens, weniger jedoch in Epithelbereichen außerhalb der Gräben findet (Abb. 20A). Dabei scheint sich die Expression zum Grabengrund hin zu erhöhen und ist an den Übergängen zur Von-Ebner-Drüse am stärksten ausgeprägt (Abb. 20B). Außerdem wurde die GPR120-Immunreaktivität in einem Teil der serösen Von-Ebner-Drüsenzellen, welche die Drüsengänge auskleiden, beobachtet (Abb. 20A und C). Die Immunreaktivität wurde durch das spezifische Blockierpeptid des verwendeten Antikörpers unterdrückt (Abb. 20D).

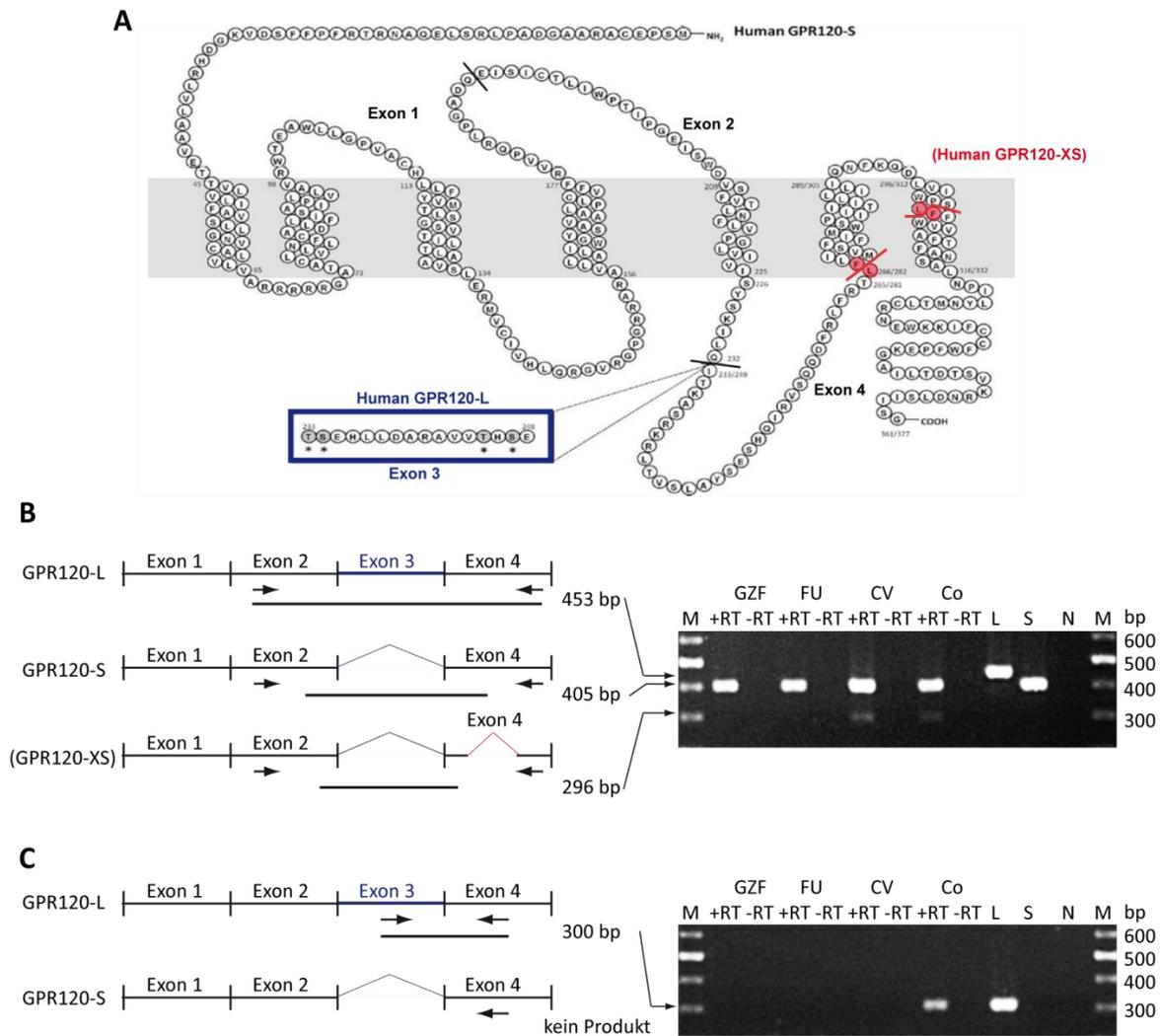


Abb. 19: Expression der GPR120-mRNA-Varianten in humanem Zungengewebe und Kolon. Aus der Literatur waren zwei Varianten der GPR120-mRNA bekannt (Hirasawa et al. 2005, Moore et al. 2009). **(A)** Variante GPR120-L entspricht der vollen 1134 Basen langen mRNA, während der GPR120-S-Variante 48 Basen, entsprechend Exon 3, fehlen. Hieraus resultierend existieren zwei Proteinvarianten mit von der cDNA abgeleiteten Größen von 377 und 361 AS, welche sich in der dritten intrazellulären Schleife unterscheiden. Es wurden ein GPR120-L/S **(B)** und ein spezifisch GPR120-L **(C)** amplifizierendes Primerpaar genutzt, um die Expression der GPR120-Varianten in der cDNA von humanen Geschmackspapillen (CV und FU), Geschmackzell-freiem Zungengewebe (GZF) und Kolon (K) zu untersuchen. Als Positivkontrollen wurden Plasmidvektoren als Matrize genutzt, in die die kurze (S) oder lange (L) Variante der GPR120-Sequenz eingebracht wurde. Die kurze GPR120-S-Variante fand sich in allen untersuchten cDNA-Proben **(B)**, während die lange GPR120-L-Variante allein in der cDNA des Kolons detektiert wurde **(C)**. Zusätzlich fand sich eine weitere Variante der GPR120-mRNA in der Wallpapillen- und Kolon-cDNA **(B)**. Die Sequenzanalyse dieser zusätzlichen PCR-Produkte zeigte, dass dieser Variante zusätzliche 108 bp des 4. Exons fehlten. Dem möglicherweise daraus resultierenden Protein (325 AS) würden die 6. Transmembrandomäne, die 3. extrazelluläre Schleife und ein Teil der 7. Transmembrandomäne fehlen **(A)**, jedoch weist die DNA-Sequenz keine spezifischen Spleißmotive in diesem Bereich des Exon 4 auf. CV: P. circumvallatae - Wallpapille. FU: P. fungiformes - Pilzpapille. N: Negativkontrolle (Wasser). bp: Basenpaare. M: DNA-Größenmarker. +/-RT: Reaktionsansätze mit/ohne reverse Transkriptase. **(A)**: abgewandelt nach (Burns and Moniri 2010).

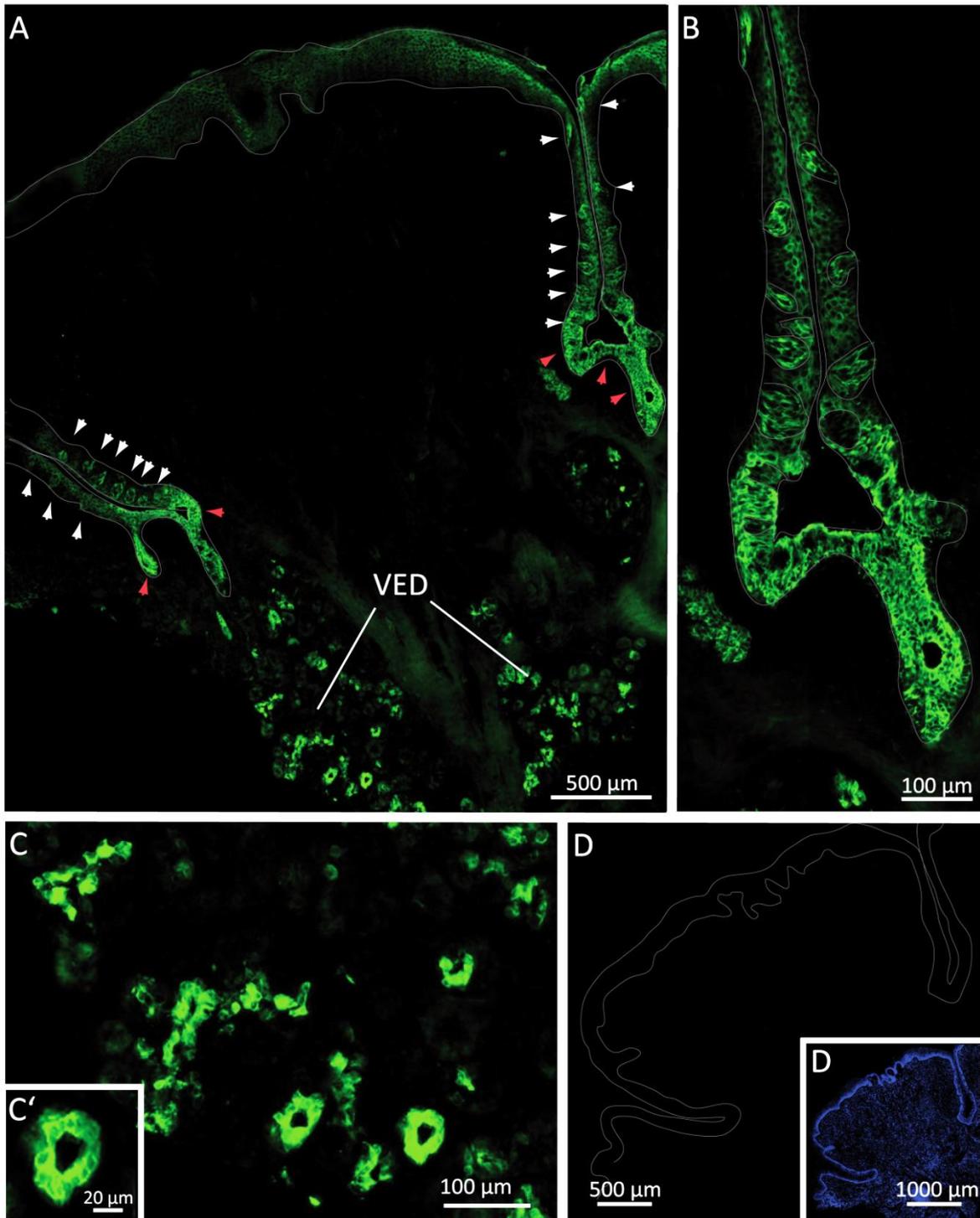


Abb. 20: GPR120-Proteinexpression in der Wallpapille. Es wurden immunhistochemische Färbungen zur GPR120-Proteinexpression an 16-µm-Gefrierschnitten von humanem Biopsiematerial der Wallpapille mit intaktem Graben- und Von-Ebner-Drüsengewebe durchgeführt. Die Gesamtansicht des Gewebes (**A**) zeigt die Immunreaktivität des GPR120-Antikörpers nicht nur in den Geschmacksknospen (weiße Pfeile), sondern auch im Epithel, besonders ausgeprägt im Grabengrund (rote Pfeile) und im Von-Ebner-Drüsengewebe. Die GPR120-Immunreaktivität nimmt zum Grabengrund hin zu und ist an den Mündungen der Von-Ebner-Drüse am stärksten (**B**). Im Von-Ebner-Drüsen-Gewebe (**C**) finden sich einzelne Drüsengänge (**C'**) mit Drüsenzellen, welche ebenfalls eine GPR120-Immunreaktivität aufweisen. (**D**) Zur Kontrolle der Spezifität wurde der verwendete GPR120-Antikörper mit einem für dessen Epitop spezifischen Blockierpeptid vorinkubiert. Dies führte zur Abwesenheit der GPR120-Immunoreaktivität und weist auf die Spezifität der Färbung hin. (**D'**) DAPI-Zellkernfärbung des Gewebes (blau). VED: Von-Ebner-Drüsengewebe.

3.2 Untersuchungen zum Vorkommen von lipolytischen Enzymen im menschlichen Geschmacksgewebe

Die Experimente des ersten Teils dieser Arbeit haben gezeigt, dass fettsäuresensitive Rezeptoren in den Geschmackszellen der Wall- und Pilzpapillen zu finden sind. Diese Rezeptoren wurden innerhalb unserer Projektgruppe durch meine Kollegin Maria Mercedes Galindo pharmakologisch charakterisiert²⁰, wobei sich herausstellte, dass diese Rezeptoren spezifisch durch langkettige Fettsäuren, nicht jedoch durch deren Triglyceride aktiviert werden können.

Interessanterweise zeigten jedoch sensorische Experimente aus der Gruppe unseres Projektpartners Prof. Hofmann der Technischen Universität München, dass humane Probanden sehr wohl in der Lage sind, Triglyceride unabhängig von der Textur und des Geruchs als „fettig“ zu erkennen²¹. Die Erkennungsschwellwerte befanden sich hierbei in ähnlichen Konzentrationsbereichen wie die von langkettigen Fettsäuren. Daher stellte sich die Frage, durch welche Mechanismen der Mensch in der Lage ist, Triglyceride geschmacklich wahrzunehmen. Dazu ergaben sich zwei Hypothesen. Zum einen wäre das Vorhandensein eines Triglycerid-spezifischen Sensorsystems denkbar, welches neben den fettsäurespezifischen Rezeptoren ebenfalls für die Aktivierung von Geschmacksrezeptorzellen verantwortlich sein könnte. Zum anderen bestünde die Möglichkeit des Vorkommens eines lipolytischen Enzyms im Speichel des Von-Ebner-Drüsengewebes, welches in der Lage wäre, Fettsäuren aus Triglyceriden freizusetzen, um diese für die fettsäuresensitiven Rezeptoren bereitzustellen.

Tatsächlich wird das Vorkommen von linguale Lipase beim Menschen diskutiert, jedoch wird im Vergleich zu Nagetieren die orale lipolytische Aktivität als eher gering eingestuft (DeNigris et al. 1988, Spielman et al. 1993). Dies jedoch ist möglicherweise auf methodische Ursachen zurückzuführen, da Messungen u.a. im Gesamtspeichel durchgeführt wurden (Stewart et al. 2010) oder, im Gegensatz zu den frischen Gewebeproben von Nagetieren, kein frisches humanes Gewebematerial verwendet werden konnte (DeNigris et al. 1988).

Daher sollte zunächst im zweiten Teil dieser Arbeit mit Hilfe molekularbiologischer Nachweismethoden das Vorkommen lipolytischer Enzyme im VED-Gewebe des Menschen untersucht werden. Parallel wurden durch die Arbeitsgruppe um Prof. Hofmann funktionelle Studien zur lipolytischen Aktivität²² im Sekret der VED durchgeführt.

3.2.1 Die Expression von Lipase F im Von-Ebner-Drüsengewebe

Ausgehend von den Erkenntnissen aus Nagetierstudien (Kap. 1.3.2) wurde zunächst das Vorkommen der sekretorischen Lipase F²³ in den VED des Menschen untersucht. Auch hierfür konnte Biopsiematerial von menschlichem Wallpapillengewebe genutzt werden. Zunächst sollte mit Hilfe der RT-PCR-Methode (Kap. 2.1.5) die mRNA-Expression in diesem Gewebe bestimmt werden. Dazu wurde aus humanem Biopsiematerial Gesamt-RNA extrahiert, mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und anschließend mit einem für das untersuchte Gen spezifischen Set an vorwärts- und rückwärts-gerichteten Oligonukleotiden durch eine DNA-Polymerase vervielfältigt (Kap. 2.1.5). Die Visualisierung und Auswertung erfolgte durch Auftrennung der Produkte auf einem Agarosegel und der Färbung mit Ethidiumbromid. Die Spezifität der Oligonukleotide war hierbei aus ersten Experimenten meiner Kollegin Maria Mercedes Galindo bekannt. Sie konnte die

²⁰ vgl. Kap. 4.1.3, S. 93 und (Galindo et al. 2012)

²¹ vgl. Kap. 4.1.3, S. 93 und (Voigt et al. 2014)

²² vgl. Kap. 4.1.2, S. 86 und (Voigt et al. 2014)

²³ Auch als linguale Lipase der Maus bzw. beim Menschen aufgrund ihres Vorkommens meist als gastrische Lipase bezeichnet (DeNigris et al. 1988).

korrekte Amplifikation des Lipase-F-Gens an humaner cDNA des Magens zeigen (Voigt et al. 2014). Erste Untersuchungen der cDNA-Probe einer humanen Wallpapille zeigten in ihren Experimenten jedoch die Abwesenheit der Genexpression von Lipase F. Zur Nachweisbarkeit von spezifisch im VED-Gewebe vorkommender cDNA wurde das Gen des VED-Proteins (Spielman et al. 1993), sowie das aus diesem Gewebe bekannte Gen des Enzyms α -Amylase (Field et al. 1989) aus dieser cDNA amplifiziert (Voigt et al. 2014). Um zu überprüfen, ob die Lipase-Genexpression eine zufällige, individuelle Variation einzelner Probanden darstellt, wurden in dieser Arbeit erneut mehrere unabhängige Biopsien von humanem Wallpapillengewebe wie oben beschrieben aufbereitet und untersucht. Hierbei konnte in allen drei Präparationen, und somit in allen drei Spendern, keine Expression des Lipase-F-Gens nachgewiesen werden (Abb. 21). Auch hier wurde die Anwesenheit von cDNA des Speicheldrüsengewebes durch die Amplifikation des α -Amylase-Gens kontrolliert. Als Positivkontrolle der Methode wurden die der Lipase F und α -Amylase orthologen Gene der Maus parallel mit selbigen Oligonukleotiden in cDNA aus murinem Wallpapillen nachgewiesen. Hierbei zeigte sich erwartungsgemäß eine starke Expression des Gens der lingualen Lipase und eine im Vergleich hierzu weniger starke Expression des Gens der α -Amylase. Diese Beobachtungen entsprechen den für diese Gewebe in der Literatur beschriebenen Enzymaktivitäten [u.a. DeNigris; 1988]. Die einheitliche Qualität der eingesetzten cDNA-Proben wurde durch die Amplifikation des Haushaltsgens GAPDH überprüft. Um die Abwesenheit von genomischer DNA in den cDNA-Proben zu kontrollieren, wurde jeweils eine Probe amplifiziert bei der das Enzym Reverse Transkriptase vor der cDNA-Synthese durch deionisiertes Wasser ersetzt wurde (-RT). Für eine allgemeine Negativkontrolle (N) wurde dem PCR-Ansatz anstelle von cDNA deionisiertes Wasser zugefügt.

Das Fehlen der Lipase-F-Genexpression in humanem VED-Gewebe zeigt, dass das entsprechende Enzym nicht für die Freisetzung von Fettsäuren aus Triglyceriden in der Mundhöhle verantwortlich gemacht werden kann. Folglich stellte sich die Frage, ob nicht andere sekretorische Lipasen für eine Fettsäurefreisetzung aus Triglyceriden und die damit in oben erwähnten sensorischen Studien beobachtete Wahrnehmung von Triglyceriden verantwortlich sein könnten.

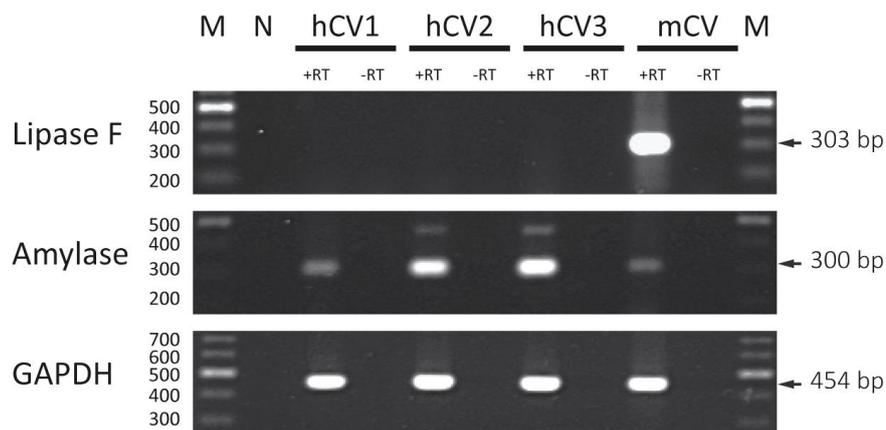


Abb. 21: Genexpression der Lipase F in humanen Wallpapillen verschiedener Probanden. Aus dem Biopsiematerial von drei humanen Wallpapillen (hCV1-3) wurde RNA extrahiert, mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und anhand Gen-spezifischer Oligonukleotide auf die Expression von Lipase F untersucht. In keiner der humanen Proben konnte eine Expression des Gens festgestellt werden. Hingegen ist die Lipase in der cDNA einer Wallpapille der Maus (mCV) mit selbigen Oligonukleotiden nachweisbar. Die Anwesenheit von cDNA des VED-Gewebes wurde durch die Amplifikation des dort exprimierten α -Amylase-Gens überprüft. Die einheitliche Qualität der eingesetzten cDNA-Proben ist durch die einheitliche Amplifikation des Haushaltsgens GAPDH gezeigt. M: DNA-Marker. N: Negativkontrolle ddH₂O. +/- RT: cDNA-Ansätze mit und ohne Reverse Transkriptase. bp: Basenpaare.

3.2.2 Die Expression der sekretorischen Lipasen K, M und N im Von-Ebner-Drüsengewebe

Die Lipase F gehört zu einer Familie eng verwandter und aufgrund ihrer säureresistenten Eigenschaften als „saure“ Lipasen bezeichneter lipolytischer Enzyme (Abb. 22). Sie weisen in ihrer Aminosäuresequenz eine hohe Übereinstimmung auf und teilen daher charakteristische Merkmale (Abb. 22 und Abb. 31). Dieser Familie epidermaler Lipasen gehören ebenfalls die Triglycerid-spaltenden Lipasen J, K, M und N an. Ihre Gene finden sich in einem Cluster zusammen mit den Genen der gut charakterisierten Lipasen F und A (lysosomale Cholesterolester-Hydrolase) auf Chromosom 10 (humanes Chr. 10q23.31). Lipase K, M und N liegen stromabwärts gerichtet unweit des Lipase-F-Gens und werden mit diesem in identischer Richtung transkribiert. Diese Gruppe Enzyme wurde erstmalig in Keratinozyten der Haut nachgewiesen (Toulza et al. 2007) und später auch mit einem Vorkommen in der Mundhöhle von Nagern in Verbindung gebracht (Holmes et al. 2010). Aufgrund dieser Daten wurde das humane VED-Gewebe auf die Genexpression dieser Gruppe lipolytischer Enzyme untersucht.



Abb. 22: Phylogenetischer Stammbaum und schematische Struktur der humanen Lipasen F, K, M und N. Aufgrund ihrer engen Verwandtschaft zeigen diese Lipasen eine hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenz und somit auch charakteristischer Strukturmerkmale. Sie weisen am aminoterminalen Ende ein Leitpeptid auf, welches für die Sekretion der Enzyme ausschlaggebend ist. Weiterhin finden sich die Aminosäuren Serin, Histidin und Asparagin an spezifischen Positionen (grau gekennzeichnet), und bilden eine charakteristische katalytische Triade innerhalb des Enzyms (Roussel et al. 1999) LP: Leitpeptid. aa: Aminosäuren.

Die Untersuchungen zur Genexpression dieser Enzyme wurden mit Hilfe der Methode der RT-PCR durchgeführt. Danach erfolgte die Bestimmung der genauen zellulären Lokalisation der Genexpression auf humanen Gewebeschnitten des Wallpapillen- und anhängendem Drüsengewebes mittels *In-situ*-Hybridisierung.

Zunächst wurden für jedes dieser Gene spezifische Oligonukleotide entworfen. Diese sollten eine einheitliche Länge der Amplifikationsprodukte von 300-450 Basen ergeben, um diese im weiteren Verlauf der Experimente direkt zur Herstellung der Sonden für die ISH nutzen zu können. Es wurden die Anlagerungstemperaturen spezifisch an das jeweilige Oligonukleotid-Set angepasst. Auf diese Weise konnte ein spezifisches Amplifikationsprodukt der entsprechenden Größen erhalten werden. Die Analyse wurde an zwei unabhängigen cDNA-Proben humaner Wallpapillen und angrenzendem Geschmackszell-freiem Gewebe (Kap. 3.2.1) durchgeführt. Wie schon zuvor wurde auch in diesen cDNA-Proben keine Expression der Lipase F detektiert. Die Expression des α -Amylase-Gens wurde in allen Proben beobachtet und deutet auf das Vorhandensein von VED-Gewebe in Geschmackszell-freiem und Wallpapillen-Gewebe hin. Die Genexpression für Lipase K konnte in allen Gewebeproben nachgewiesen werden, wenn auch in scheinbar variierender Menge (Abb. 23). Lipase-M-Genexpression zeigte sich nur sehr schwach in einer der beiden cDNA-Proben der humanen Wallpapillen, nicht jedoch in der cDNA des Geschmackszell-freien Gewebes. Ähnlich wie bei der Lipase K, wurde die Genexpression für Lipase N in allen Proben mit unterschiedlicher Amplifikationseffizienz detektiert, wobei hier zusätzliche kürzere PCR-Produkte auftraten. Um zu überprüfen, ob es sich bei diesen zusätzlichen Produkten um Varianten der Lipase N oder unspenzi-

fische Produkte handelte, wurden die PCR-Produkte aus dem Agarosegel aufgereinigt, in *pTOPO*-Vektoren eingebracht und zur Sequenzierung verschickt. Die Analyse der Sequenzen zeigte, dass es sich um kürzere Varianten des 448 bp großen Lipase-N-PCR-Produktes handelte. Sie besaßen eine Größe von 376 bp (Variante 1) bzw. 303 bp (Variante 2) und entsprachen der Lipase-N-mRNA²⁴, allerdings fehlte ihnen eine dem Exon 7 (72 bp) bzw. Exon 7 und 8 (145 bp) entsprechende Sequenz. Diese Varianten sind höchstwahrscheinlich Spleißvarianten, welche durch das Überspringen eines bzw. zweier Exons entstanden sind. Den aus diesen Varianten abgeleiteten Proteinen würden somit 24 Aminosäuren (AS275-297) bzw. 49 Aminosäuren (AS272-320) fehlen (Abb. 24). Diese Aminosäuren sind am Aufbau eines Teils der Lid/Cap-Region des Proteins beteiligt (vgl. Abb. 31). Diese Region ist für die Zugänglichkeit und Bindung des Substrats verantwortlich, so dass für diese Varianten ein deutlicher Funktionsverlust bzw. eine Änderung in der Substratspezifität zu erwarten wäre. Interessanterweise wurden ähnliche Varianten für die lysosomale Lipase A in der Literatur beschrieben, welche zur Cholesterolester-Speicherkrankheit führen und genetisch vererbt werden (Klima et al. 1993, Ameis et al. 1995, Pagani et al. 1996). Ob die Varianten der Lipase N Gewebespezifisch exprimiert werden, beispielsweise Variante 1 im Geschmacksgewebe der Wallpapille, lässt sich aus diesen Experimenten nicht endgültig schließen, da hier individuelle Unterschiede der Spender, Variationen der Gewebeanteile und unterschiedliche Expressionslevel nicht ausgeschlossen werden können.

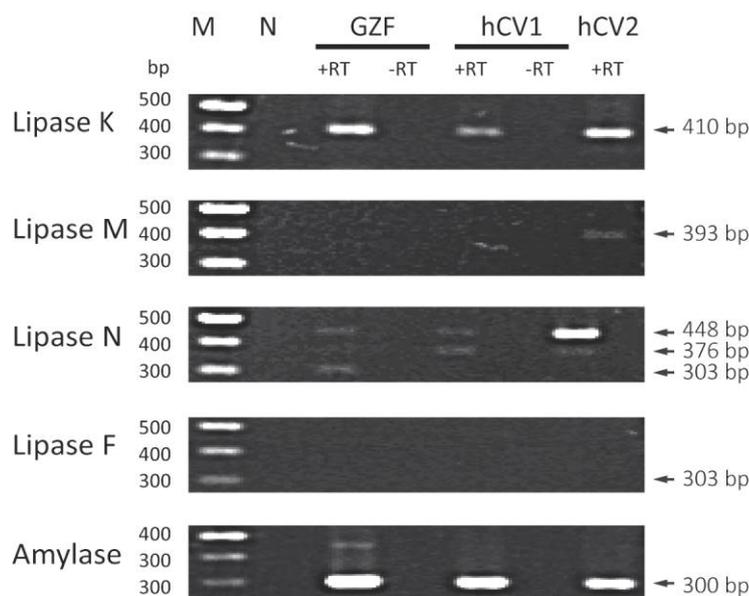


Abb. 23: Genexpression der Lipasen K, M und N in humanen Wallpapillen und Geschmackszell-freiem Gewebe. Aus dem Biopsiematerial humaner Wallpapillen (hCV1-2) und angrenzendem geschmackszellfreiem Gewebe (GZF) wurde RNA extrahiert, mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und anhand Gen-spezifischer Oligonukleotide auf die Expression von Lipase K, M und N untersucht. Im Gegensatz zu Lipase F, welche keinerlei Genexpression in den untersuchten Geweben zeigte, konnten die Lipasen K, M und N in humanem Wallpapillengewebe nachgewiesen werden. Lipase K und N wurden außerdem in GZF-Gewebe detektiert. Sequenzanalysen der zusätzlichen PCR-Produkte der Lipase N ergaben spezifische Varianten dieses Enzyms. Die Anwesenheit von VED-Gewebe wurde durch die Amplifikation des dort exprimierten α -Amylase-Gens überprüft. M: DNA-Marker. N: Negativkontrolle (Wasser). +/- RT: cDNA-Ansätze mit bzw. ohne Reverse Transkriptase. bp: Basenpaare.

²⁴ Die Sequenzierungsergebnisse sind dem Anhang A3.2.6 zu entnehmen.

		1		50			
LIPN	(1)	-MMWLLLT	CLICGTLNAGGF	LDLENEVNPEVWMNTSEIIYNGYPSEE			
LIPN var1	(1)	-MMWLLLT	CLICGTLNAGGF	LDLENEVNPEVWMNTSEIIYNGYPSEE			
LIPN var2	(1)	-MMWLLLT	CLICGTLNAGGF	LDLENEVNPEVWMNTSEIIYNGYPSEE			
LIPA	(1)	MKMRFLGLVV	CLVLTWTHSE	SGGKLTAVDPETNMNVSEIISYWGFPSEE			
		51		100			
LIPN	(50)	YEVTTEDGYILLVNRIPYGR	THARSTGPRPVVYMQHALFADNAYWLENYA				
LIPN var1	(50)	YEVTTEDGYILLVNRIPYGR	THARSTGPRPVVYMQHALFADNAYWLENYA				
LIPN var2	(50)	YEVTTEDGYILLVNRIPYGR	THARSTGPRPVVYMQHALFADNAYWLENYA				
LIPA	(51)	YLVETEDGYILLVNRIPYGR	KNHSDKGP	KPVVFLQHGILLADSSNWTNLA			
		101		150			
LIPN	(100)	NGSLGFLADAGYDVWMGNSRGNTWSRRHKTLS	SETDEKFWAFSFD	DEMAKY			
LIPN var1	(100)	NGSLGFLADAGYDVWMGNSRGNTWSRRHKTLS	SETDEKFWAFSFD	DEMAKY			
LIPN var2	(100)	NGSLGFLADAGYDVWMGNSRGNTWSRRHKTLS	SETDEKFWAFSFD	DEMAKY			
LIPA	(101)	NSSLGFLADAGYDVWMGNSRGNTWSRRHKTLS	VSQDEFWAFSFD	DEMAKY			
		151		200			
LIPN	(150)	DLPGVIDFIVNKTGQEKLYFI	GHSLGTTIGFVAFSTMP	PELAQRIKMNFFAL			
LIPN var1	(150)	DLPGVIDFIVNKTGQEKLYFI	GHSLGTTIGFVAFSTMP	PELAQRIKMNFFAL			
LIPN var2	(150)	DLPGVIDFIVNKTGQEKLYFI	GHSLGTTIGFVAFSTMP	PELAQRIKMNFFAL			
LIPA	(151)	DLPASINFILNKTGQEQVY	YVGHSQGTTIGFIAFSQI	PELAKRIKMNFFAL			
		201		250			
LIPN	(200)	GPTISFKYPTGIFTRFFLLPNSI	IKAVFGTKGFFLEDKKT	KIASTKICNN			
LIPN var1	(200)	GPTISFKYPTGIFTRFFLLPNSI	IKAVFGTKGFFLEDKKT	KIASTKICNN			
LIPN var2	(200)	GPTISFKYPTGIFTRFFLLPNSI	IKAVFGTKGFFLEDKKT	KIASTKICNN			
LIPA	(201)	GPVASVAE	CTSPMAKLGRLPDHLIKDL	FGDKEFLPQSAFLKWLGHVCTH			
		251	>	Lid-Region	<>	Cap-Region	301
LIPN	(250)	KILWLICSEFMSLWAGSNKKNMN	NQSRMDVYMSHAPT	GSSVHNILHIKQLY			
LIPN var1	(250)	KILWLICSEFMSLWAGSNKKNMN	Q-----	-----			LY
LIPN var2	(250)	KILWLICSEFMSLWAGSNKKN	-----	-----			
LIPA	(251)	VILKELCGNLCFL	LLCGFNERNLNMSRVDVYT	THSPAGTSVQNMLHWSQAV			
		301	>	Exon 7	<>	Core-Region	350
LIPN	(300)	HSDEFRAYDWGNDADNMKHY	NQSHPPIDYDLTAMKVPTAI	WAGGHDV	LVT		
LIPN var1	(276)	HSDEFRAYDWGNDADNMKHY	NQSHPPIDYDLTAMKVPTAI	WAGGHDV	LVT		
LIPN var2	(273)	-----	NQSHPPIDYDLTAMKVPTAI	WAGGHDV	LVT		
LIPA	(301)	KFQKFQAF	DWGS	AKNYFHY	NQSY	PPTYNVKDMLVPTAV	WSGGHDWLADV
		351	<	Exon 8	<>		399
LIPN	(350)	QDVARI	LPQIKSLHYFKLL	PDWNHFD	DFVWGLDAPQ	RMYS	EIIALMKAYS
LIPN var1	(326)	QDVARI	LPQIKSLHYFKLL	PDWNHFD	DFVWGLDAPQ	RMYS	EIIALMKAYS
LIPN var2	(301)	QDVARI	LPQIKSLHYFKLL	PDWNHFD	DFVWGLDAPQ	RMYS	EIIALMKAYS
LIPA	(351)	YDVNI	LLTQITNLV	EHESI	PEWEHLDFI	WGLDAPW	RLYNKTIINLMRKYQ

Abb. 24: Aminosäuresequenzvergleich der Lipase-N-Varianten mit Lipase N und lysosomaler Lipase (LIPA). Die Aminosäuresequenz der Lipase-N-Varianten wurde aus den sequenzierten PCR-Produkten mit der VectorNTI-Software abgeleitet und mit der Aminosäuresequenz der Lipase N (NP_001095939.1) und der lysosomalen Lipase A (NP_001121077.1) verglichen. Die fehlenden Sequenzbereiche in den Varianten befinden sich im hinteren Lid-/Cap-Bereich des Enzyms, so dass eine reduzierte Funktionalität oder auch eine andere Substratspezifität im Vergleich zur Lipase N erwartet werden kann. Die Lipase N weist eine relativ hohe Verwandtschaft zur Lipase A auf. Auch für Lipase A wurden ähnliche Spleißvarianten in der Literatur beschrieben. So existieren ebenfalls LIPA-Varianten, denen durch sogenanntes Exonskipping 24 bzw. 49 Aminosäuren (ebenfalls Exon 7 bzw. 7 und 8) fehlen und welche aufgrund ihrer stark eingeschränkten Funktionalität zur Cholesterinester-Speicherkrankheit führen (Klima et al., 1993; Ameis et al., 1995; Pagni et al., 1996). Konservierte Bereiche in allen Lipasen sind gelb dargestellt. Blaue Bereiche kennzeichnen identische Sequenzen in nur einigen Proteinen. Ähnliche Aminosäuren sind Grün hervorgehoben.

3.2.3 Zelluläre Lokalisation der Expression der Lipasen K, M und N

Die Analyse mittels RT-PCR erbrachte einen Nachweis der Genexpression der sekretorischen Lipasen K, M und N. Im nächsten Schritt wurde die genaue zelluläre Lokalisation der Genexpression mit Hilfe der *In-situ*-Hybridisierung (Kap. 2.1.9) untersucht. Hierbei wird die Expression der spezifischen mRNA direkt im Gewebe durch eine Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten RNA-Sonden (Kap. 2.1.8) und anschließender Farbreaktion sichtbar gemacht. Zunächst wurden die für jede Lipase spezifischen RNA-Sonden hergestellt und funktionell überprüft, bevor sie hiernach zum Nachweis der Genexpression auf Gewebeschnitten humaner Wallpapillen mit anhängenden VED genutzt werden konnten.

Herstellung und Funktionalität der RNA-Sonden der Lipasen K, M und N

Die aus den RT-PCR-Experimenten erhaltenen PCR-Produkte wurden zuvor zur Sequenzierung in *pTOPO*-Vektoren eingebracht. Aus diesen Vektoren wurden nun zur Herstellung der RNA-Sonden die spezifischen Bereiche durch *EcoRI*- bzw. *HindIII*- und *XhoI*-Restriktionsendonukleasen ausgeschnitten und jeweils in einen *pBluescript*-Vektor überführt²⁵. Die entstandenen *pBluescript*-Vektorkonstrukte sind schematisch in Abb. 25 dargestellt. Dieses Vektorkonstrukt ermöglicht durch die in ihm für entsprechende RNA-Polymerasen enthaltenen T3- und T7-Promotoren eine *In-vitro*-Transkription der Lipase-Sequenzen. Dabei wurden aus der Transkription mit T3-RNA-Polymerase sogenannte *Antisense*-Sonden (der mRNA-Sequenz des Zielgens komplementäre) und aus der Transkription mit T7-RNA-Polymerase sogenannte (der mRNA-Sequenz des Zielgens gleiche, nicht komplementäre) *Sense*-Sonden erhalten, welche eine Größe zwischen 536 und 684 Basen besaßen. Qualität und Quantität der RNA-Sonden wurden auf einem Agarosegel, durch UV-spektrophotometrische Messung und Sequenzierung überprüft²⁶.



Abb. 25: Aufbau der zur SONDENGENERIERUNG genutzten Plasmide. Die aufgrund ihrer Sequenzierung bereits in *pTOPO*-Vektoren klonierten PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* bzw. *HindIII* und *XhoI* aus ihren Plasmiden herausgeschnitten und über die entsprechenden Restriktionsstellen mit den *pBluescript*-Vektoren ligiert. Die entstandenen Konstrukte wurden von T3- bzw. T7-Promotoren flankiert und konnten somit nach ihrer Linearisierung in *Sense*- bzw. *Antisense*-Richtung mit Hilfe der jeweiligen RNA-Polymerase *in vitro* transkribiert werden. Die auf diese Weise erhaltenen *Sense*-(T7)- bzw. *Antisense*-(T3)-RNA-Sonden besaßen je nach Konstrukt eine Größe von 536–684 Basen. bp: Basenpaare. pBlue: *pBluescript*-Vektor. pTOPO: nach Restriktion verbliebener Rest des *pTOPO*-Vektors.

Die erhaltenen Sonden wurden zunächst auf ihre Funktionalität und ein ausgewogenes Hybridisierungsverhältnis zwischen *Sense*- und *Antisense*-Sonde überprüft. Dazu wurde eine *Dot blot*-Hybridisierung durchgeführt (Kap.2.1.10). Hierbei wurden die Sonden mit den zu ihrer Herstellung verwendeten Plasmid-Konstrukten auf einer Nylon-Membran hybridisiert und durch eine entsprechende enzymatische Farbreaktion nachgewiesen. Das Ergebnis dieser Hybridisierung ist in Abb. 26: Überprüfung der Hybridisierungseffizienz der RNA-Sonden über eine *Dot blot*-Hybridisierung dargestellt. Es zeigte sich für alle Sondenpaare eine ähnliche Hybridisierungseffizienz zwischen *Sense*- und *Anti*-

²⁵ Die spezifischen Restriktions- und Linearisierungspositionen der verschiedenen Konstrukte sind aus den Übersichten der Sequenzen der Multiplen Klonierungsbereiche der Vektoren im Anhang A3.2.1 ersichtlich.

²⁶ Das Agarosegel der Sonden sowie ihre Sequenzen sind dem Anhang A3.2.2 zu entnehmen.

sense-Sonde. Somit konnte für die eigentliche *In-situ*-Hybridisierung ausgeschlossen werden, dass das Ergebnis einer Hybridisierung durch eine ungleiche Bindungseffizienz der *Sense*- und *Antisense*-Sonde verfälscht wird. Weiterhin zeigten die Ergebnisse, dass die Hybridisierungseffizienz zwischen den Sondenpaaren der Lipasen unterschiedlich ist. So resultierte der Einsatz der Sonden der Lipase K und N in einer höheren Sensitivität (bis 10 pg Plasmid-DNA) als die der Lipase M (bis 100 pg Plasmid-DNA).

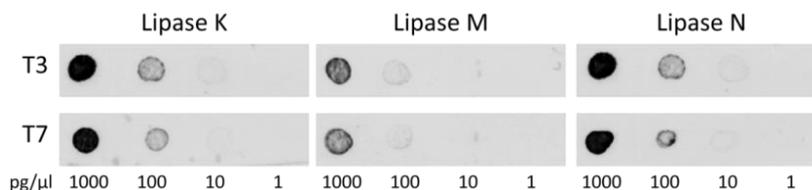


Abb. 26: Überprüfung der Hybridisierungseffizienz der RNA-Sonden über eine *Dotblot*-Hybridisierung.

Die aus den Lipase-RT-PCR-Produkten hergestellten Sonden wurden mit den jeweiligen *pBluscript*-Plasmid-Konstrukten auf einer Nylon-Membran hybridisiert. Hierbei wurden jeweils 1000, 100, 10 und 1 pg der Plasmide als Tropfen auf die Membran aufgebracht und nach Hybridisierung und Färbung ausgewertet. Die *Sense*-(T7)- und *Antisense*-(T3)-Sonden zeigten für alle Lipasen eine gleichwertige Hybridisierungseffizienz. Die Sonden der Lipasen K und N zeigten die höchste Sensitivität mit einer Detektion der Plasmid-DNA bis 10 pg. Eine Hybridisierung der Lipase-M-Sonden war hingegen nur bis 100 pg Plasmid-DNA sichtbar.

Nachweis der Genexpression der Lipasen K, M und N durch *In-situ*-Hybridisierung

Nach Überprüfung der Sonden, wurden diese zur *In-situ*-Hybridisierung auf 10- μ m-Gefrierschnitten humaner Wallpillenbiopsien mit anhängendem Von-Ebner-Drüsengewebe verwendet. Einen beispielhaften Überblick über die erhaltene Färbung und die Struktur des Gewebes gibt Abb. 28. Das humane Zungengewebe enthielt neben der Wallpapille und anhängendem Von-Ebner-Drüsengewebe auch Muskelgewebe und Geschmackszell-freies Zungenepithel. Für alle Lipasen konnte eine Genexpression im Gewebe nachgewiesen werden. Dabei wurden Färbungen sowohl im VED-Gewebe, als auch im Zungen- und Geschmacksepithel erhalten (Abb. 28).

Abbildung 28 zeigt die Genexpression der sekretorischen Lipasen im Zungenepithel. Es ist eine charakteristische Färbung in den unteren, Keratinozyten enthaltenden Schichten des Plattenepithels zu beobachten. Keratinozyten entstehen aus basalen epidermalen Stammzellen und werden durch neu entstehende Keratinozyten im Laufe ihrer Entwicklung nach apikal (außen) geschoben. Dabei verhornen sie und formen sich zu Korneozyten (Hornzellen)²⁷. Diese enthalten keinen Zellkern, sind abgeflacht und lösen sich mit der Zeit vom Epithel ab. Das Vorkommen der Genexpression der Lipasen K, M und N in den Keratinozyten wurde schon zuvor beschrieben (Toulza et al., 2007), bisher jedoch nicht wie hier auf zellulärer Ebene gezeigt.

Besonders die Färbung durch die RNA-Sonden der Lipasen K und N war deutlich in den serösen Drüsenzellen des VED-Gewebe zu finden, wohingegen die Färbung mit den RNA-Sonden der Lipase M schwächer war (Abb. 29), wobei Anzumerken ist, dass sich die Effizienz der Lipase-M-Sonde geringer im vgl. zu den anderen Sonden bereits als geringer erwies (Abb. 26). In den Drüsengängen zeigten sich einzelne gefärbte seröse Zellen, welche sich um ein kleines Lumen reihen, in welches sie ihr Sekret abgeben. Die runden Zellkerne der serösen Zellen liegen typischerweise an der basalen Seite der Zellen.

Das Geschmacksgewebe befindet sich ebenfalls im Zungenepithel. Es war auch in diesem Bereich die Genexpression der Lipasen zu finden und zeigte sich, wie für das Zungenepithel zuvor

²⁷ Im Gegensatz zum Hautepithel ist die Verhornung des Zungenepithels zwar sichtbar, jedoch weit weniger ausgeprägt.

beschrieben, in den unteren, nicht verhornten Schichten (Abb. 30). Auch hier ist besonders die Färbung durch die RNA-Sonden der Lipase K und N im Vergleich zu Lipase M deutlicher ausgeprägt. Vergrößerungen einzelner Geschmacksknospen zeigen in ihnen enthaltene, einzelne gefärbte Zellen. Allerdings waren solche auch außerhalb der Geschmacksknospen zu finden und nicht spezifisch auf die Geschmacksknospen beschränkt.

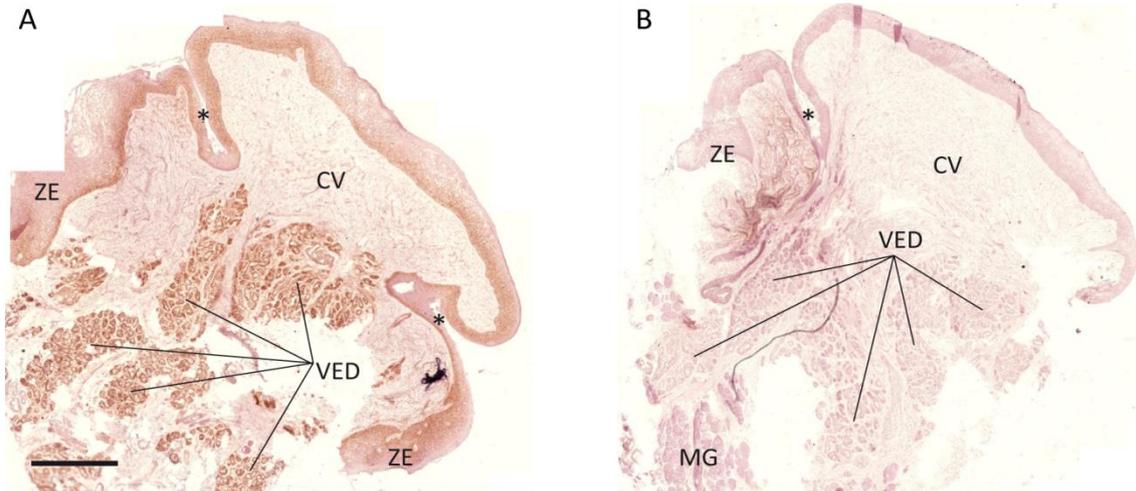


Abb. 28: In-situ-Hybridisierung einer humanen Wallpapille und VED-Gewebe mit Lipase-RNA-Sonden. 10- μ m-Gefrierschnitte humaner Zungen-Biopsien wurden mit spezifischen *Antisense*-RNA-Sonden (A) der Lipasen hybridisiert und über die enzymatische Umsetzung des Substrats NBT/BCIP nachgewiesen. Die braune Färbung ist vorrangig im Gewebe der Von-Ebner-Drüsen (VED) und in den unteren Schichten des Zungenepithels (ZE) zu sehen. (B) Negative Kontrollfärbung mit *Sense*-RNA-Sonde. Die Hybridisierung für Lipase N ist hier beispielhaft für alle Lipasen dargestellt. CV: P. circumvallatae - Wallpapille mit zwei Papillengraben (*), in denen sich das Geschmacksepithel befindet. MG: Muskelgewebe. Maßstab: 500 μ m.

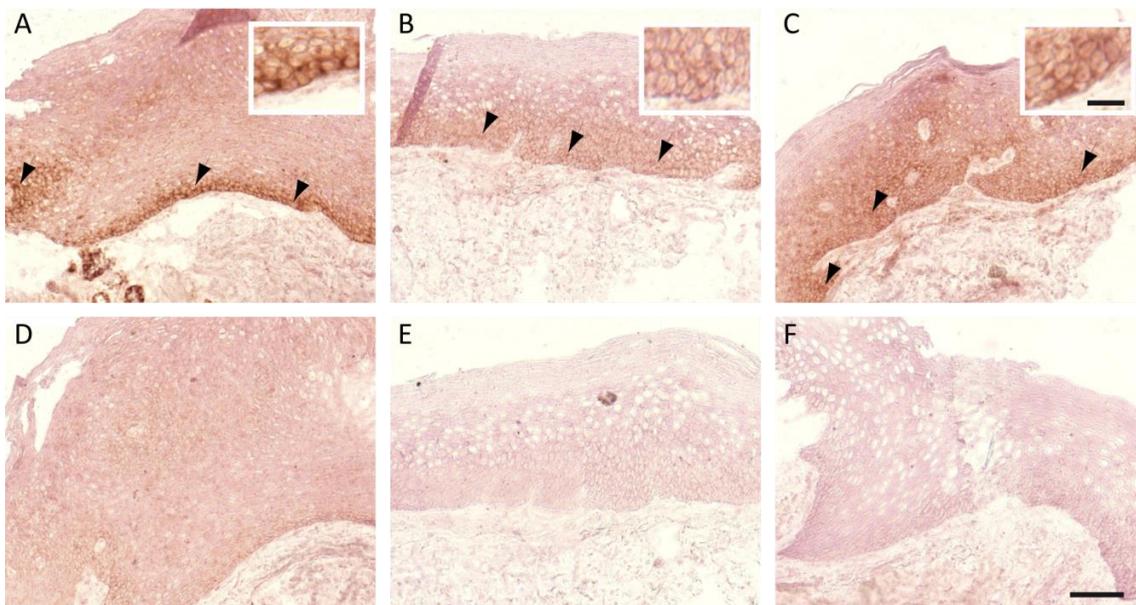


Abb. 27: Genexpression sekretorischer Lipasen in epithelialen Keratinozyten. 10- μ m-Gefrierschnitte humaner Zungen-Biopsien wurden mit spezifischen *Antisense*- (A-C) und *Sense*- (D-F) RNA-Sonden der Lipase K (A+D), M (B+E) und N (C+F) hybridisiert und über die enzymatische Umsetzung des Substrats BCIP/NBT in einen braunen Farbstoff nachgewiesen. Die Genexpression aller drei Lipasen ist in den unteren Schichten des Zungenepithels nachweisbar (Pfeile). In diesen basalen Bereichen des Epithels finden sich Keratinozyten, welche in äußere Schichten wandern und sich währenddessen zu Korneozyten umwandeln. In den entsprechenden Negativkontrollen mit *Sense*-RNA-Sonden trat keine spezifische Färbung auf. Maßstab: 50 μ m, Vergrößerungen 15 μ m.

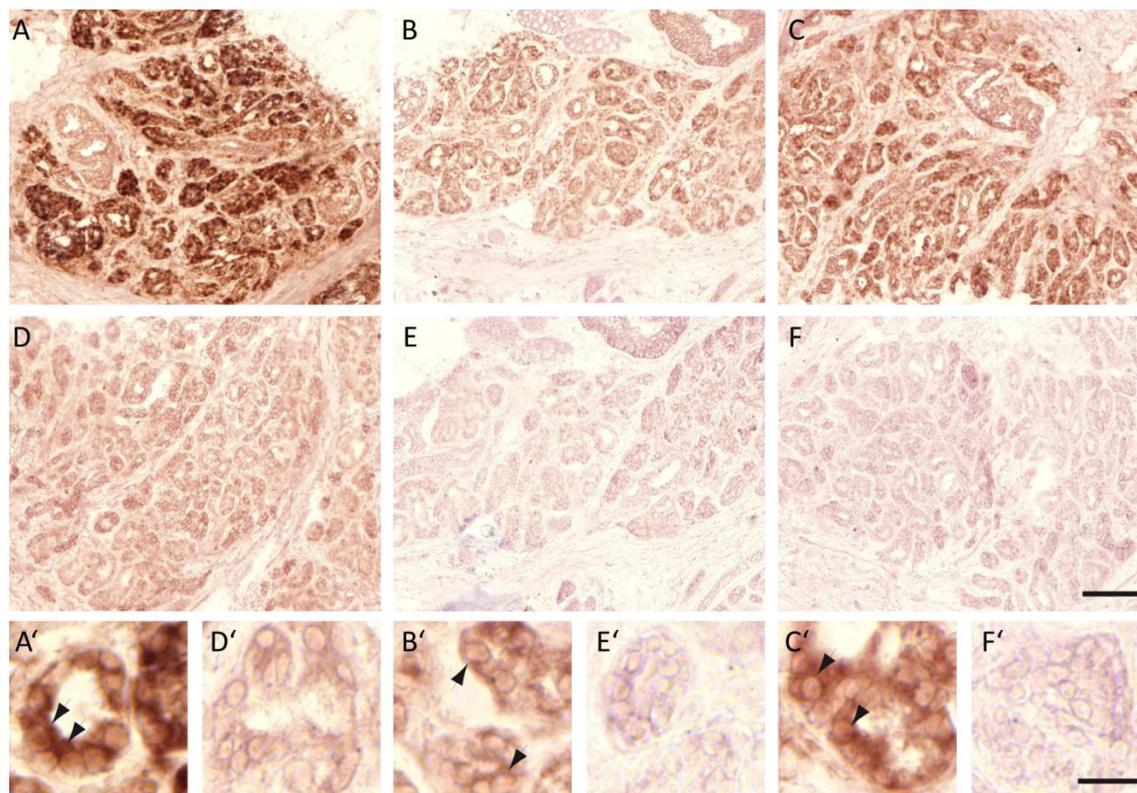


Abb. 29: Genexpression sekretorischer Lipasen im Von-Ebner-Drüsengewebe. 10- μ m-Gefrierschnitte humaner Zungen-Biopsien wurden mit spezifischen *Antisense*- (A-C) und *Sense*- (D-F) RNA-Sonden der Lipase K (A+D), M (B+E) und N (C+F) hybridisiert und über die enzymatische Umsetzung des Substrats BCIP/NBT in einen braunen Farbstoff nachgewiesen. Besonders die Färbung durch die RNA-Sonden der Lipase K und N ist deutlich in den serösen Drüsenzellen des VED-Gewebe zu sehen. Vergrößerungen einzelner Drüsengänge (A'-C') zeigen einzelne gefärbte seröse Zellen (Pfeile). Die für seröse Zellen typischen runden Zellkerne liegen am basalen Grund der Zellen. Es ist zu erkennen, dass sich die Zellen um ein kleines Lumen reihen in welche sie ihr Sekret abgeben. In den Negativkontrollen mit *Sense*-RNA-Sonden (D-F und D'-F') trat keine (E, F) bis sehr schwache (D) Hintergrundfärbung auf. Maßstab: 50 μ m, in den Vergrößerungen 15 μ m.

Nachdem die Genexpression der Lipasen K, M und N auf zellulärer Ebene neben dem Zungenepithel auch im Gewebe der Von-Ebner-Drüsen gezeigt werden konnte, stellte sich zum einen die Frage ob diese Lipasen mit dem Speichel in die Gräben der Geschmackspapillen sekretiert werden und zum anderen ob sie in Struktur und Funktion der gastrischen Lipase F ähnlich sind. Dazu wurden *In-silico*-Analysen der Proteinsequenzen der Lipasen vorgenommen.

3.2.4 *In-silico*-Strukturanalyse der humanen Lipasen K, M und N

Die Lipasen K, M und N gehören zusammen mit der gastrischen Lipase F und der lysosomalen Lipase A zur Familie der sekretorischen Lipasen. Die Aminosäuresequenz der Lipase K ist zu 67 % mit der Sequenz der Lipase F identisch. Hingegen zeigen Lipase M und Lipase N mit Lipase F nur eine Identität von 53 % bzw. 59 % (Holmes et al., 2011). Die Struktur der Lipase F wurde bisher in der Literatur am besten charakterisiert und durch die Arbeitsgruppe um Alain Roussel anhand von Kristallstrukturanalysen beschrieben (Roussel et al., 1999 und 2002). Die Lipase F ist ein globuläres Protein, bestehend aus einem Kernprotein (*Core*) und einer darauf sitzenden Kappe (*Cap*). Teil dieser Kappe ist ein 24 Aminosäuren umfassender Deckel, der die hydrophobe Tasche abdeckt. Die Aminosäuresequenzen der Lipasen K, M und N wurden anhand der Vector-NTI-Software mit der Sequenz der Lipase F verglichen und auf charakteristische Strukturen, die in der Literatur zur Lipase F beschrieben waren, untersucht (Abb. 31). Die gastrische Lipase, wie auch die

Lipasen K, M und N, gehören zur Gruppe der Serinesterasen und besitzen in ihrer katalytischen Tasche die für diese Enzyme charakteristische Triade aus den Aminosäuren Serin, Asparagin und Histidin. Auch das während der Katalyse zur Ausrichtung genutzte Oxyanionenloch (gebildet durch die NH-Gruppen der Aminosäuren Leucin und Glutamin) ist in den untersuchten Lipasen konserviert. Eine Analyse auf posttranslationale Modifikationen zeigte, dass auch die N-Glycosylierungs- und N-Myristoylierungsstellen weitestgehend innerhalb der Familie konserviert sind (vgl. Anhang A3.2.4). Dazu besitzen die Lipasen ein dem eigentlichen Protein vorangestelltes Signalpeptid, was zur Translokation an die Zellmembran führt. Dies ist eine erste Voraussetzung für die Sekretion der Enzyme. Hinweise, ob das Protein hiernach als membranständiges Protein verbleibt oder sekretiert wird, geben zum Teil der Anteil hydrophober Domänen, welche Transmembrandomänen darstellen könnten, und die Möglichkeit zur Abspaltung des Signalpeptids. Daher wurden die Aminosäuresequenzen der Lipasen auf mögliche Transmembrandomänen und Signalpeptidschnittstellen untersucht (vgl. Anhang A3.2.2 und A3.2.1). Hierbei zeigte keine der Lipasen signifikante hydrophobe Bereiche, die als Transmembrandomänen dienen könnten. Jede der Lipasen wies allerdings eine Schnittstelle für das jeweilige Signalpeptid auf (vgl. Abb. 31), so dass davon auszugehen ist, dass auch die Lipasen K, M und N, wie auch die Lipase F, sekretorische Proteine sind, die nicht in der Zellmembran verankert bleiben.

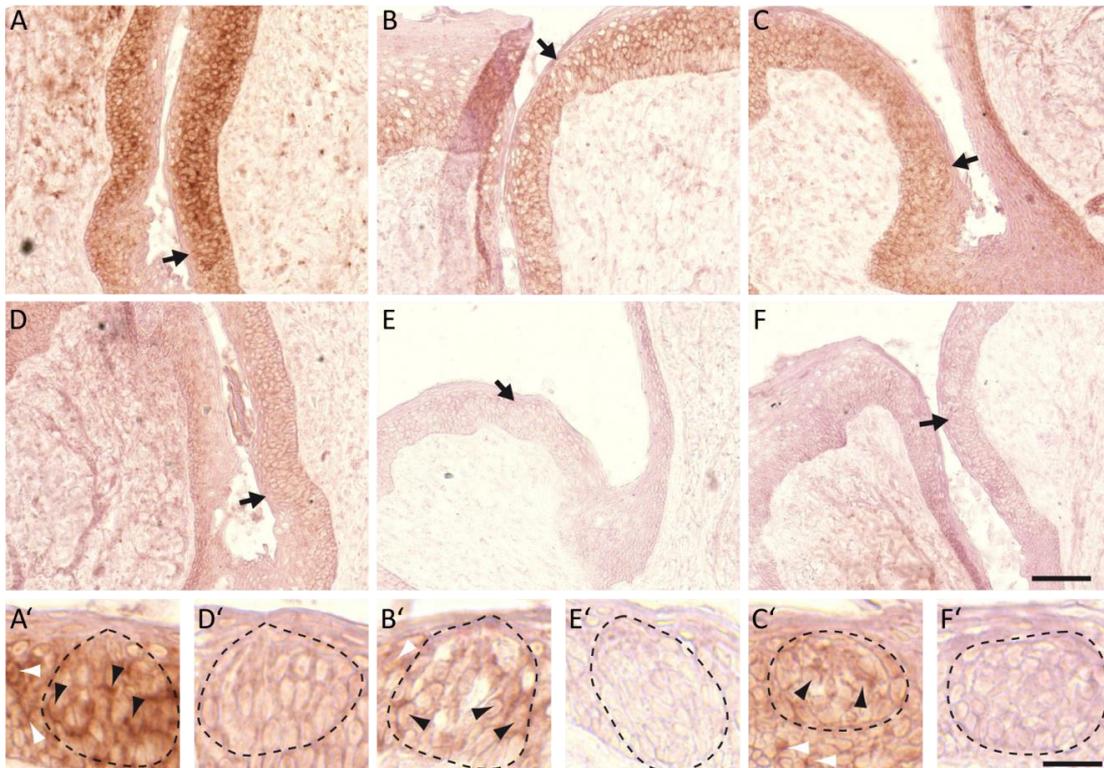


Abb. 30: Färbungen im Geschmacksepithel nach *In-situ*-Hybridisierung mit RNA-Sonden der sekretorischen Lipasen. 10- μ m-Gefrierschnitte humaner Zungen-Biopsien wurden mit spezifischen *Antisense*- (A-C) und *Sense*- (D-F) RNA-Sonden der Lipase K (A+D), M (B+E) und N (C+F) und über die enzymatische Umsetzung des Substrats BCIP/NBT in einen braunen Farbstoff nachgewiesen. Da sich das Geschmacksgewebe im Zungenepithel befindet, war auch in diesem Bereich die Genexpression der Lipasen zu finden und zeigte sich, wie für das Zungenepithel zuvor beschrieben, in den unteren, nicht verhornten Schichten. Auch hier ist besonders die die Färbung durch die RNA-Sonden der Lipase K und N im Vergleich zu Lipase M deutlicher ausgeprägt. Vergrößerungen einzelner Geschmacksknospen (A', B', C') zeigen in ihnen enthaltene einzelne gefärbte Zellen (schwarze Pfeilspitzen), allerdings sind sie auch außerhalb der Geschmacksknospen zu finden (helle Pfeilspitzen). In den Negativkontrollen mit *Sense*-RNA-Sonden (D-F und D'-F') trat keine Färbung auf. Ganze Pfeile: Geschmacksknospen, die in A'-F' vergrößert dargestellt sind. Maßstab: 100 μ m, in den Vergrößerungen: 20 μ m

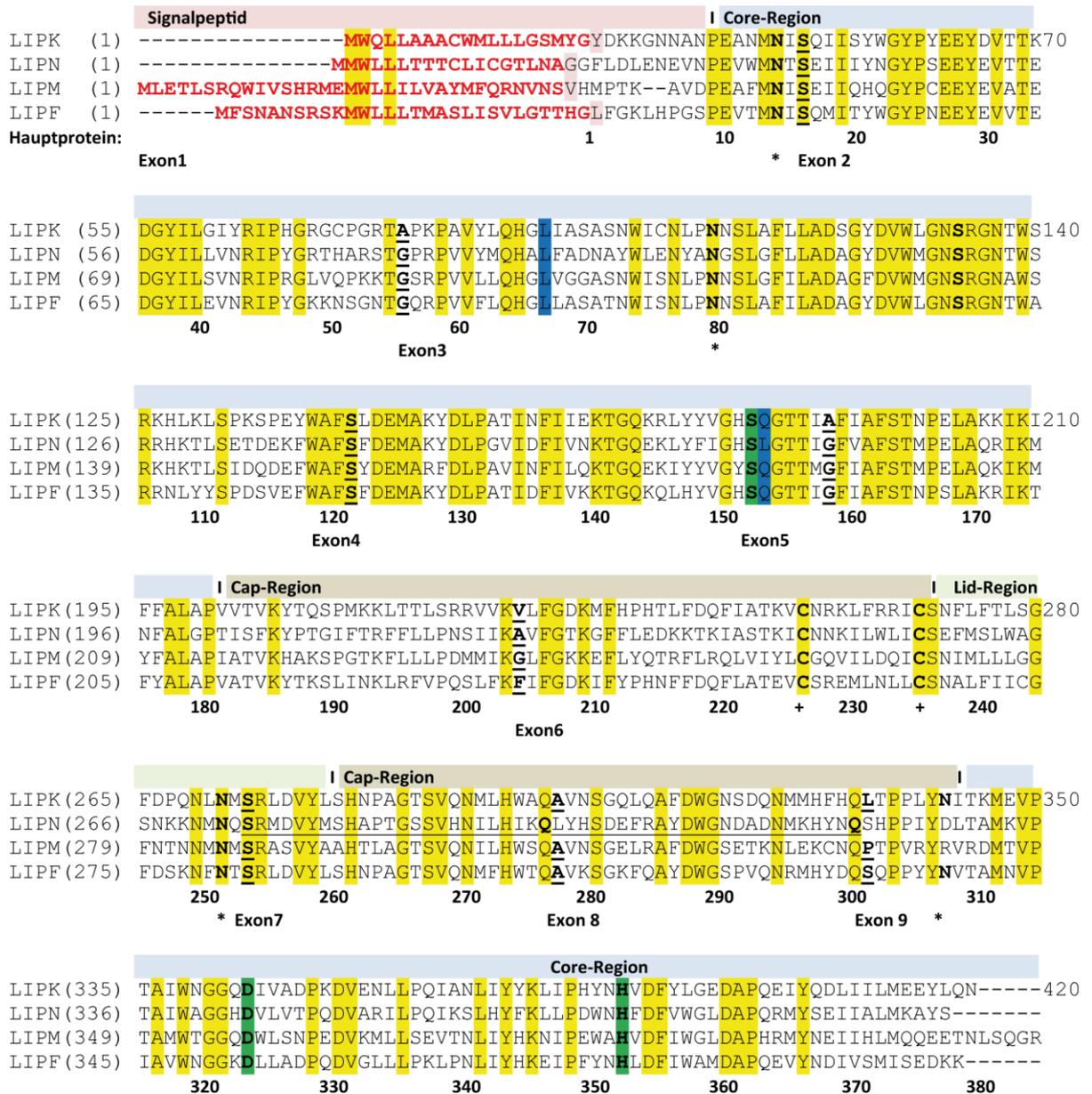


Abb. 31: Aminosäuresequenzvergleich der humanen Lipasen K, M, N und F. Die Sequenzen der humanen sekretorischen Lipasen wurden mit Hilfe der *Vector-NTI-Software AlignX* ausgerichtet und auf konservierte Sequenzbereiche (gelb) untersucht. Die bereits bekannten charakteristischen Strukturen der Lipase F wurden nach Canaan et al. (1999) und Holmes et al. (2011) übertragen: zu Beginn findet sich ein absplaltbares Signalpeptid (rot) das den kotranslationalen Transport in das Endoplasmatische Retikulum und damit nachfolgende Sekretion gewährleistet.

Ebenfalls ist die, für Serinproteasen typische, katalytische Triade (grün) der Aminosäuren Serin, Asparagin und Histidin, sowie das durch die NH-Gruppen der Aminosäuren Leucin und Glutamin (blau) gebildete Oxyanionenloch zu finden. Das Gesamtprotein besteht aus einer *Core-Region* und einer *Cap-Region*, indem sich ein 24AS großer Bereich befindet, welcher als Deckel (*Lid*) definiert wird. Er deckt im geschlossenen, aktiven Zustand das katalytische Zentrum des Enzyms ab. Die Exonverteilung der Lipasen K, M und N ist ebenfalls dargestellt. *: N-Glycosylierung (LIPF). +: Cystein-Disulfidbrücke. **S**: Exonübergänge. rot: Signalpeptid. rosa: Signalpeptid-Schnittstelle. LIPN: unterstrichen ist die variable Exon-7-/ Exon-8- Region.

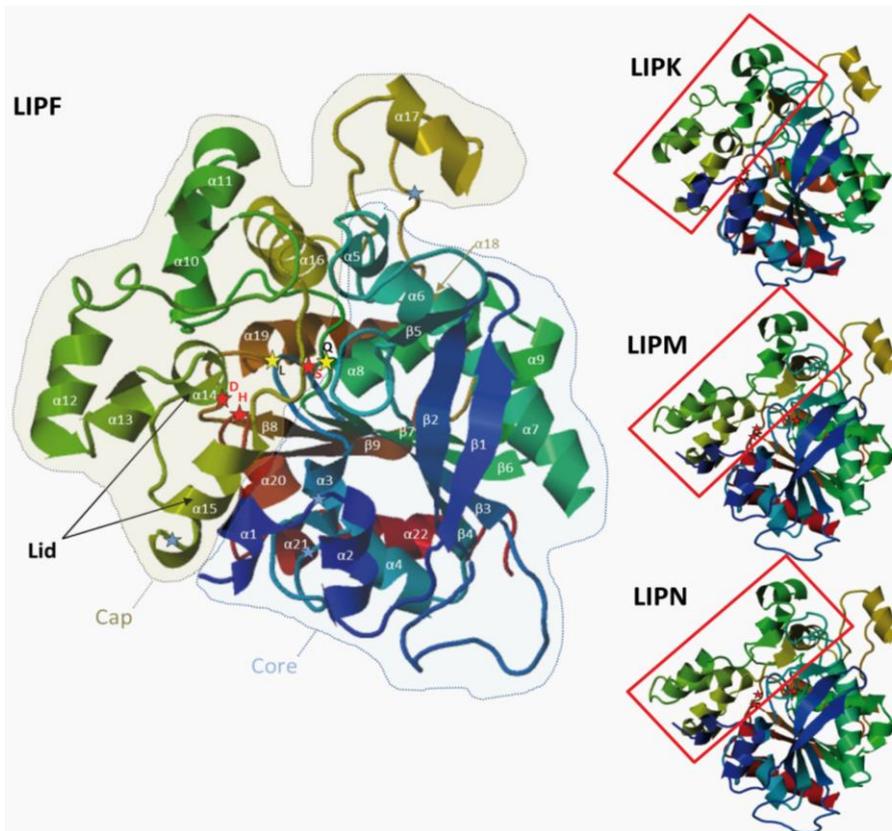


Abb. 32: Tertiärstruktur der Lipasen. Die vorhergesagten Tertiärstrukturmodelle der Lipasen K, M und N basieren auf der bereits publizierten Kristallstruktur der Lipase F (Canaan et al. 1999, Roussel et al. 1999, Roussel et al. 2002) und wurden über die Software des *Protein Model Portal* erstellt²⁴. Der Regenbogenfarbcode beschreibt die 3D-Struktur vom N- (blau) zum C-terminalen (rot) Ende. Das Protein besteht aus einer Core- und einer Substratbindenden Cap-Region. Die Schleifen zwischen der $\alpha 14$ - und $\alpha 15$ -Helix bilden den Deckel (*Lid*) des Enzyms, der die hydrophobe Tasche abdeckt in der sich das katalytische Zentrum befindet.

Das katalytische Zentrum wird durch die Aminosäuren Serin, Histidin und Asparagin (rote Sterne) gebildet. Für die Lipase F beschriebene Disulfidbrücken (gelbe Sterne) und N-Glycosylierungsstellen (blaue Sterne) sind ebenfalls gekennzeichnet. Die vorhergesagten Strukturen der Lipasen K, M und N weisen eine hohe Ähnlichkeit zur Lipase F auf. Dennoch finden sich Unterschiede (bspw. roter Rahmen), besonders in der Substratbindenden Cap-Region und möglicherweise auch in der Lage der an der katalytischen Triade beteiligten Aminosäuren.

Die Tertiärstruktur der Lipasen K, M und N wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben und im Rahmen dieser Arbeit anhand der Struktur der Lipase F *in silico* modelliert (Abb. 32). Hierbei zeigte sich zwar, wie auch in der Aminosäuresequenz, eine hohe Ähnlichkeit, dennoch weisen im speziellen die Lid- und Cap-Region der Enzyme Unterschiede auf. Dies ist auch aus der Aminosäuresequenz zu erkennen, die sich speziell im vorderen Bereich des Caps (etwa AS180–250) unterscheidet. Die Lid-/Cap-Region wird für die Bindung der Lipidsubstrate verantwortlich gemacht (Dugi et al. 1992). Es konnte für die Lipoproteinlipase (LPL), aber auch die gastrische Lipase, durch gezielte Mutagenese gezeigt werden, dass eine trunkierte Lid-/Cap-Region die Aktivität des Enzyms stark einschränkt (Dugi et al. 1992). Außerdem bewirkt eine Strukturänderung in diesem Bereich eine Veränderung der Substratspezifität beispielsweise der LPL hinsichtlich hydrophober langkettiger Triglyceride (Triolein) und wasserlöslicher kurzkettiger Triglyceride (Tributyrin) (Dugi et al., 1992). Die Unterschiede in der Aminosäuresequenz und Tertiärstruktur der Lid-/Cap-Region der Lipasen F, K, M und N könnten sich daher auf die Substratspezifität des jeweiligen Enzyms auswirken. Interessanterweise sind auch Unterschiede in der Hydrophobizität der Aminosäuresequenz im Lid-/Cap-Bereich zu erkennen (vgl. Anhang A.3.2.2). Hierbei zeigen die Lipasen M und N eine stärkere Hydrophobizität als die Lipasen F und K. Im Vergleich zur lipidbindenden Lid-/Cap-Region sind hingegen die für die Esteraseaktivität wichtigen Bereiche (die katalytische Triade und das Oxyanionenloch) unter den Lipasen stark konserviert.

²⁸ Die Modellentwürfe wurden mit den Programmen *MODBASE* und *SWISSMODEL* über die Plattform *The Protein Model Portal* (<http://www.proteinmodelportal.org/>) erstellt. Die zugehörigen Parameter sind dem Anhang A3.2.5 zu entnehmen.

3.3 Weiterleitung der Fettsäurewahrnehmung über P2X-Rezeptoren

Unsere Projektpartner haben gezeigt, dass humane Probanden in der Lage sind, langkettige Fettsäuren oral wahrzunehmen, unabhängig von olfaktorischen und textuellen Eigenschaften (Galindo et al. 2010). In den beiden ersten Teilen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich sowohl Fettsäuresensitive Rezeptoren in humanen Geschmackszellen finden, als auch Enzyme in den Von-Ebner-Speicheldrüsen vorhanden sind, welche zur Bereitstellung entsprechender Fettsäuren aus Triglyceriden der Nahrung dienen können (Kap. 3.1 und 3.2). Unsere Projektpartner wiederum zeigten, dass eine Spaltung von Triglyceriden im Sekret der Von-Ebner-Drüsen stattfindet und die daraus resultierende Freisetzung von Fettsäuren durch einen Lipase-Inhibitor vermindert werden kann (Voigt et al. 2014). Außerdem zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der gemessenen Lipaseaktivität und der individuellen oralen Sensitivität gegenüber Fettsäuren. Somit sind erste Voraussetzungen für eine gustatorische Wahrnehmung von Fettsäuren, hinsichtlich ihrer Detektion über spezifische Rezeptoren und ihrer lipolytischen Freisetzung aus Nahrungsfetten, ähnlich wie bei Nagetieren, auch beim Menschen gegeben. Eine weitere Voraussetzung für die gustatorische Wahrnehmung eines Stimulus ist die Weiterleitung der detektierten Informationen über gustatorische Nervenbahnen in Geschmacks-verarbeitende Bereiche des Gehirns (vgl. Kap. 1.1.4) (Tucker and Mattes 2012). An Nagetieren wurde bereits gezeigt, dass die Übertragung der Geschmacksinformation auf gustatorische Nerven für die Grundgeschmacksqualitäten nach Aktivierung der Geschmackszellen über die Freisetzung von ATP und die Aktivierung von ATP-sensitiven P2X-Rezeptoren erfolgt (vgl. Kap. 1.1.4) (Finger et al. 2005). Hingegen wurden in selbiger Studie trigeminale Nervenfasern, welche nicht-gustatorische Informationen (z.B. über die Textur) weiterleiten, nicht über P2X_{2/3}-Rezeptoren aktiviert. Es stellte sich die Frage, ob auch die Wahrnehmung von Fettsäuren durch eine ATP-abhängige Aktivierung von P2X-Rezeptoren erfolgt. Da diese Untersuchungen im Menschen nicht möglich sind, sollten die Untersuchungen in diesem Fall an der Maus als Modellorganismus erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit war hierzu eine erste Pilotstudie geplant. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass vor allem das Heteromer aus P2X₂ und P2X₃ der multimeren P2X-Rezeptoren für die Übertragung der Geschmacksinformation verantwortlich ist (Finger et al. 2005). In der Pilotstudie sollte daher mit Hilfe eines Kurzzeit-Präferenztests und pharmakologischer Intervention mit einem P2X₃-spezifischen Antagonisten, die Geschmackspräferenz von C57BL/6-Mäusen gegenüber der für Mäuse attraktiven Linolsäure mit und ohne Antagonisten-Gabe untersucht werden. Hierdurch sollten Rückschlüsse über die neuronale Weiterleitung der Sinnesinformation der Linolsäure über die Ausschüttung von ATP und Aktivierung von P2X_{2/3}-exprimierenden Geschmacksnerven gezogen werden. Erfolgt eine Wahrnehmung der Linolsäure mittels gustatorischer Nervenbahnen über P2X₃-/P2X_{2/3}-Rezeptoren, so müsste durch die Applikation eines P2X₃-Antagonisten die Wahrnehmung und somit die Präferenz (Attraktivität) von Linolsäure vermindert werden. Als Kontrollstimulus sollte eine süß schmeckende Saccharoselösung dienen, da für die Wahrnehmung süßer Geschmacksstimuli eine Beteiligung der P2X₂- bzw. P2X₃-Rezeptoren bereits gezeigt wurde (Finger et al. 2005).

3.3.1 Etablierung des Kurzzeit-Präferenztests für attraktive Geschmacksstimuli

Bei Kurzzeit-Präferenztests ist eine Wasser-/Nahrungsrestriktion nötig, um die Tiere zu motivieren, während des kurzen Messzeitraums zu trinken. Gewöhnlich bekommen die Tiere daher in den 22 Stunden vor dem Experiment nur 1 g feste Nahrung und 2 ml Trinkwasser, was etwa 19 bis 30 % ihres normalen Tagesbedarfs entspricht (Glendinning et al. 2002). Es hat sich gezeigt, dass diese Einschränkung der Verfügbarkeit von Nahrung und Trinkwasser bei der Untersuchung von bevorzugten Geschmacksqualitäten, zu denen der Süß- und der Fettgeschmack zählen, für die Motivation der Tiere, die Testlösungen zu trinken, ausreicht (Glendinning et al. 2002, Damak et al. 2006). Diese Publikationen zeigen, dass Mäuse nach 22 h mit beschränktem Nahrungs- und Trinkwasserangebot nicht unkontrolliert durs-

tig sind, sondern sich weiterhin Geschmacksvorlieben auf die konsumierte Trinkwassermenge auswirken. Dennoch sollte zunächst eine kürzere Restriktionsphase von 16 h ausgetestet werden, um die Belastungen der Tiere möglichst gering zu halten. Dies war besonders erstrebenswert im Hinblick darauf, dass durch eine zusätzliche pharmakologische Intervention mit intraperitonealer Applikation ein nicht unerheblicher weiterer Stressfaktor hinzukommt. Daher sollte zunächst das Experiment mit einer 16-h-Restriktionszeit pro Tag durchlaufen werden und nur, wenn diese nicht ausreicht die Tiere ausreichend zum Trinken zu motivieren, auf 22 h ausgedehnt werden. Während der 16-h-Restriktion wurde den Tieren Zugang zu 0,7 g Futter und 1,5 ml Wasser gewährt, was den anteiligen Mengen des 22-h-Restriktionsprotokolls entspricht. Die Etablierung des Experiments erfolgte mit einer Saccharose-Testlösung (300 mM).

Es stellte sich innerhalb der ersten Messtage heraus, dass das 16-h-Protokoll keine ausreichende Motivation und damit kein ausreichendes Trinkverhalten im Lickometer hervorruft. Daher wurde dieses Experiment vorzeitig abgebrochen und nach einer Woche Erholungsphase mit dem 22-h-Protokoll begonnen. Dieses führte, wie in der Literatur beschrieben, zu einer ausreichenden Motivation, allerdings auch zu einem erhöhten Stressniveau der Tiere. Die wichtigsten Parameter der beiden Protokolle sollen im Folgenden kurz verglichen werden und sind in Abb. 33 dargestellt. Betrachtet man zunächst das Leckverhalten der einzelnen Tiere (Abb. 33A), so zeigte sich, dass die Leckwerte im 22-h-Protokoll sowohl für Wasser (Mittelwerte $4,0 \pm 1,6$ vs. $15,2 \pm 1,7$ Leckereignisse/30s), als auch für Saccharose (Mittelwerte $43,2 \pm 7,7$ vs. $137,9 \pm 8,2$ Leckereignisse/30s) bei der Mehrzahl der Tiere gegenüber dem 16-h-Protokoll erhöht sind. Dennoch erreichten sie, wie beabsichtigt, bei weitem nicht die Maximalleckwerte, die bei C57BL/6-Mäusen bei etwa 250 Leckereignissen/30s (8,5 Leckereignisse/s) liegen (Boughter et al. 2006). Speziell die individuellen Unterschiede zwischen den Tieren sind im 16-h-Protokoll sehr ausgeprägt und die Mehrzahl der Tiere (16 von 20) wies keine oder nur sehr geringe Wasserleckwerte auf. Dies führte im 16-h-Protokoll dazu, dass für die meisten Tiere entweder kein Saccharose-Wasser-Verhältnis berechnet werden konnte oder extreme Verhältnisse aufgrund des geringen Wasserwertes entstanden. Auch die Latenzzeit bis zum ersten Lecken ist im 16-h-Protokoll sehr viel höher, was die geringe Motivation der Tiere unterstreicht und zu einer starken Verlängerung der Dauer des Experiments beiträgt. Im 22-h-Protokoll sind nahezu alle Tiere motiviert zu trinken und nur bei einer kleinen Zahl (4/20) waren die Leckwerte zu gering bzw. das Verhältnis zu Wasser unproportional hoch. Dennoch ist mit beiden Protokollen eine ähnliche Saccharose-Präferenz messbar (Abb. 33B). Hierbei zeigten sich für beide Protokolle 9-11-fach erhöhte Leckwerte für Saccharose im Vergleich zu Wasser, welche so auch in der Literatur beschrieben sind (7-10-fach) (Glendinning et al. 2002, Zhang et al. 2003). Dennoch hätten im 16-h-Protokoll mehr als die Hälfte der Tiere ausgeschlossen werden müssen, um ein aussagekräftiges, gemittelttes Leckverhältnis zu Wasser berechnen zu können. Hinzu kommt, dass gerade im Hinblick auf die Intervention mit dem Antagonisten eine Verringerung der Präferenz erwartet wird. Hierbei wären relativ hohe, jedoch nicht maximale Ausgangsleckwerte von Vorteil um eine signifikante Verringerung der Werte überhaupt aufzeichnen zu können. Die Tiere zeigten während der Restriktion im 16-h-Protokoll keinerlei Distress-Symptome wie Apathie, Lethargie, Aggressivität oder andere Auffälligkeiten. Sie wurden unter Restriktion zunehmend aktiver (u.a. Futter- und Wassersuche) als unter normalen Haltungsbedingungen, zeigten dabei jedoch normales Putz-, Fress- und exploratives Verhalten. Keines der Tiere hat über 20 % des Ausgangsgewichts verloren. Alle Tiere konnten an den jeweiligen Erholungstagen ihr Ausgangsgewicht zu 100 % wieder herstellen. Auch im 22-h-Protokoll ist keines der Tiere mehrmals unter 80 % des Ausgangsgewichtes gefallen, wobei die Gewichtsverluste, besonders am zweiten der beiden aufeinanderfolgenden Messtage, dennoch höher als im 16-h-Protokoll waren (vgl. Abb. 33C). Allerdings wiesen einige Tiere im 22-h-Protokoll neben der erhöhten Aktivität auch eine stark erhöhte Aggressivität beim Handling auf, im speziellen während der Fixierung für die Applikation des Antagonisten, was im Extremfall dazu führte, dass solch ein Tier ausgeschlossen werden musste. Eine Zusammenfassung der wichtigsten Parameter der beiden Protokolle

gibt Abb. 33C. Hiernach wurde sich für das 22-h-Protokoll entschieden, da trotz der erhöhten Stressbedingungen die höhere Motivation der Tiere und die geringeren individuellen Unterschiede, zu einer höheren auswertbaren Tierzahl und damit signifikanten Ergebnissen führte.

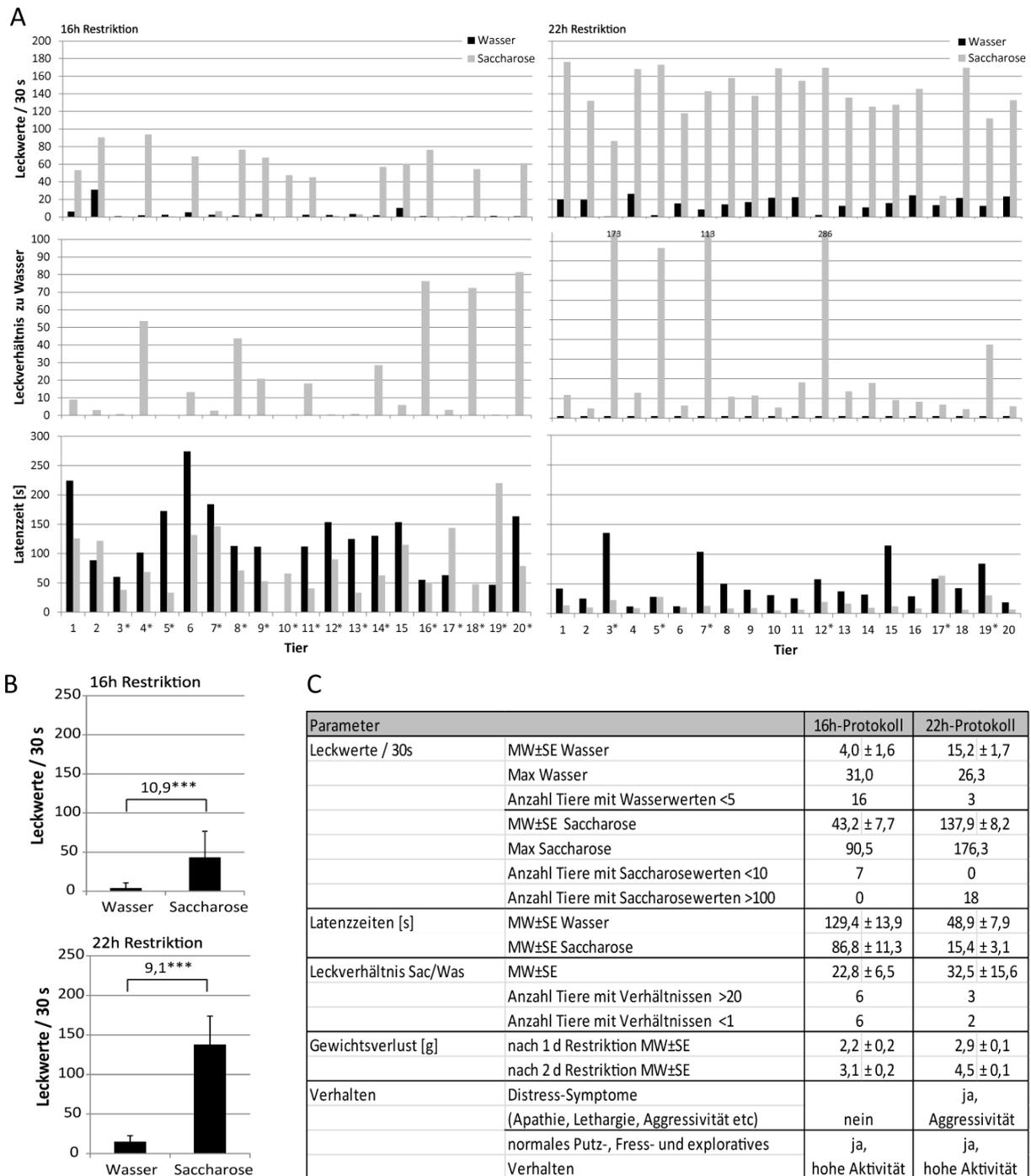


Abb. 33: Vergleich des 16-h- und 22-h-Restriktionsprotokolls im Kurzzeitpräferenztest. Zur Etablierung des Kurzzeit-Präferenztests für attraktive Stimuli wurden C57BL/6-Mäuse einer 16-h- oder 22-h-Futter- und Wasserrestriktion unterworfen, um zu untersuchen, mit welchem Restriktionsprotokoll die Motivation der Tiere zu trinken hoch genug ist, das Stressniveau aber möglichst gering gehalten werden kann. Die Tiere erhielten dabei 16 h bzw. 22 h vor der Messung im Lickometer nur 0,7 bzw. 1,0 g Futter und 1,5 bzw. 2 ml Wasser. Es wurde die Präferenz von 300 mM Saccharose gegenüber Wasser getestet. **(A)** Vergleich der individuellen Leckereignisse/30 s, des Leckverhältnisses gegenüber Wasser und der Latenzzeiten bis zum ersten Lecken. **(B)** Präferenz von Saccharose gegenüber Wasser anhand der MW ± SE der Leckwerte /30 s. Angegeben ist das Leckverhältnis und das Signifikanzniveau *** $p < 0,001$. $n = 20$. **(C)** Zusammenfassung der wichtigsten Parameter der beiden Restriktionsprotokolle.

3.3.2 Wirkung des P2X₃-Antagonisten auf die Präferenz von Linolsäure und Saccharose

Nachdem sich das 22-h-Restriktionsprotokoll als vorteilhaft gegenüber dem 16-h-Restriktionsprotokoll erwies, erfolgten die Messungen der Saccharose- und Linolsäurepräferenz mit und ohne Intervention durch den spezifischen P2X₃-Antagonisten A-317491 (Sigma).

Es wurden an jeweils einem Tag die basalen Leckwerte des Kontrollstimulus, die Leckwerte des Geschmacksstimulus ohne Intervention und die Leckwerte des Geschmacksstimulus mit Intervention bestimmt. Die Messungen wurden in der zweiten Messwoche wiederholt. Die Tiere wurden außerdem am Interventionstag je Stimulus in zwei Gruppen (n=10) aufgeteilt. Der Kontrollgruppe wurde 30 min vor der 1. Messung 200 µl physiologische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) i.p. injiziert²⁹, während der Interventionsgruppe 30 nmol/g KG (~180-200 µl) des P2X₃-Antagonisten i.p. verabreicht wurde. Es wurden die Leckwerte innerhalb 30 Sekunden nach dem ersten Lecken aufgezeichnet. Das ausführliche Protokoll ist Kap. 2.3 zu entnehmen. Als Süßgeschmacksstimulus wurde 300 mM Saccharose gelöst in Wasser und als Fettstimulus 10 mM Linolsäure gelöst in 0,3 % Gummi arabicum verwendet. Als Kontrollstimulus diente entweder Wasser (bei Saccharose) oder 0,3 % Gummi-arabicum-Lösung. Die Gummi-arabicum-Lösung diente der Maskierung der durch die Fettsäure hervorgerufenen öligen Textur.

Zunächst wurde in der Kontroll- und der Interventionsgruppe die Präferenz der Geschmacksstimuli im Vergleich zur Kontrolllösung bestimmt. Drei (Saccharose-Gruppe) bzw. vier (Linolsäure-Gruppe) der Tiere mussten aufgrund zu geringer Motivation aus den Berechnungen ausgeschlossen werden. Es zeigte sich sowohl für die Saccharose- als auch für die Linolsäurelösung eine etwa 7-fache Präferenz der Tiere gegenüber dem jeweiligen Kontrollstimulus. Hierbei unterschieden sich die Interventions- und Kontrollgruppe nicht wesentlich in ihrem Leckverhalten (Abb. 34A und B). Auch wiesen die jeweiligen Interventions- und Kontrollgruppen keine Unterschiede in ihrem Gewichtsverlauf auf (Abb. 34C).

Auffällig waren jedoch die im Vergleich zur Saccharosegruppe generell niedrigeren Leckwerte in der Linolsäuregruppe. Dies betraf sowohl die Gummi-arabicum-Lösung als auch die in Gummi-arabicum gelöste Linolsäure. In der Linolsäuregruppe wurde an den Messtagen auch ein Wasserwert zur Kontrolle aufgenommen. Das Leckverhalten der Linolsäuregruppe gegenüber Gummi arabicum ($3,7 \pm 0,9$ Leckereignisse je 30 s) unterschied sich hierbei nicht zum Leckverhalten gegenüber Wasser ($3,5 \pm 0,9$ Leckereignisse je 30 s)³⁰. Das bedeutet die Motivation zu Trinken erwies sich in der Linolsäuregruppe generell als niedriger im Vergleich zur Saccharosegruppe, bei der das Leckereignis je 30s gegenüber Wasser durchschnittlich $15,2 \pm 1,7$ betrug. Die Gruppen wurden an unterschiedlichen experimentellen Tagen gemessen, wobei die Tiere der Linolsäuregruppe etwas älter waren und die Saccharosegruppe durch den vorherigen Durchlauf durch das 16h-Protokoll auch besser trainiert war. Diese Unterschiede können zu unterschiedlicher allgemeiner Motivation und Leistung beitragen. Aus diesem Grund wurden generell nur Leckverhältnisse (Stimulus/Kontrollstimulus) miteinander verglichen, nicht jedoch absolute Leckwerte.

Im nächsten Schritt wurde die Wirkung des P2X₃-spezifischen Antagonisten auf das Leckverhalten gegenüber den beiden attraktiven Geschmacksstimuli untersucht. Hierzu wurden die Leckwerte mit und ohne Applikation von NaCl in der Kontrollgruppe mit den entsprechenden Leckwerten der Interventionsgruppe (mit und ohne Applikation des Antagonisten) verglichen (Abb. 35).

²⁹ i.p. = intraperitoneal, Applikation in den Bauchraum

³⁰ Daten zum Vergleich des Leckverhaltens gegenüber Wasser und Gummi-arabicum-Lösung finden sich im Anhang A3.3.2.

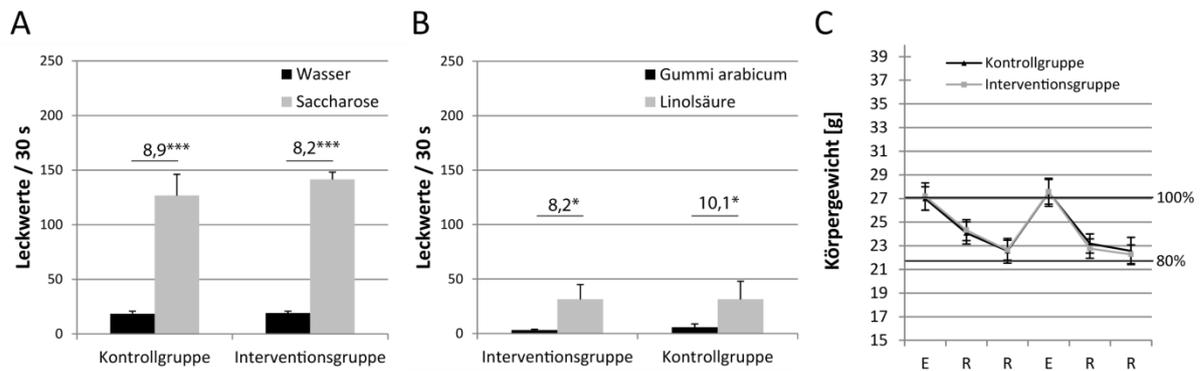


Abb. 34: Präferenz von Saccharose und Linolsäure innerhalb der Kontroll- und Interventionsgruppen. Für die Untersuchung der Wirkung des P2X₃-Antagonisten auf die Präferenz von 300 mM Saccharose (A) und 10 mM Linolsäure (B) wurden C57BL/6-Mäuse in eine Kontrollgruppe und eine Interventionsgruppe geteilt (n = 6-7). Alle Gruppen wiesen eine ähnliche, etwa 8-10-fach signifikant erhöhte Präferenz für den jeweiligen Geschmacksstimulus gegenüber dem Kontrollstimulus auf (das entsprechende Leckverhältnis ist über den Balken angegeben). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Leckverhältnisse zwischen der jeweiligen Kontroll- und Interventionsgruppe. *p = <0,05. ***p = <0,001. (C) Auch im Gewichtsverlauf zeigten die beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede (beispielhaft für die auf Saccharose getesteten Gruppen dargestellt). E: Erholung. R: Restriktion.

Hierbei erwiesen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Leckwerten der Kontrollgruppe und der Interventionsgruppe. Das Leckverhältnis (ohne/mit Intervention) für Saccharose betrug in Kontroll- und Interventionsgruppe jeweils 1,2. Das Leckverhältnis in der Linolsäuregruppe betrug 1,4 für die Kontrolltiere und 1,3 für die Interventionstiere, war jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Es zeigte sich also keine Wirkung des Antagonisten auf die Wahrnehmung der Saccharose oder der Linolsäure. Im Fall des Geschmacksstimulus Saccharose war dies unerwartet, da, wie anfangs erläutert, für süße Geschmacksstimuli bereits in Rezeptor-Knockout-Tieren gezeigt wurde, dass das P2X_{2/3}-Rezeptorheteromer und im Besonderen der P2X₃-Rezeptor als hauptverantwortlich für die Übertragung der Süß- und Bittergeschmacksinformation diskutiert wird (Finger et al. 2005), und daher Saccharose als experimentelle Positivkontrolle diente.

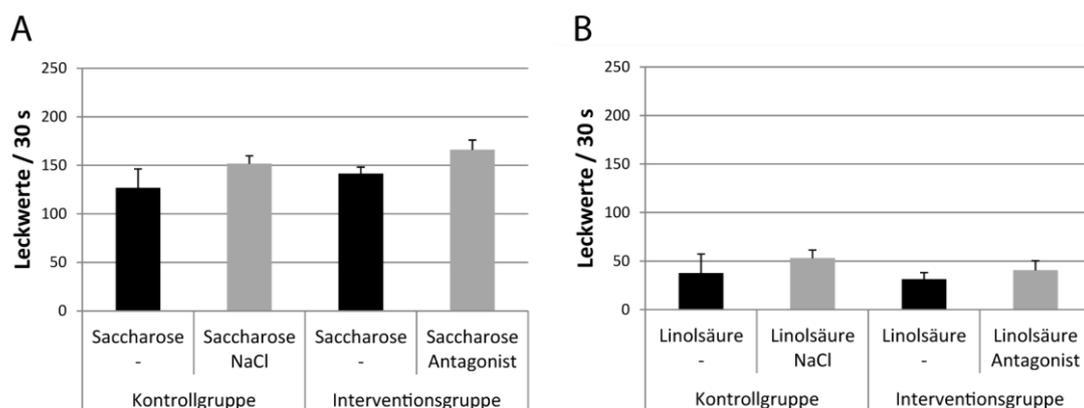


Abb. 35: Wirkung des P2X₃-Antagonisten auf die Präferenz gegenüber Saccharose und Linolsäure. C57BL/6-Mäuse wurden auf ihr Leckverhalten gegenüber (A) 300 mM Saccharose und (B) 10 mM Linolsäure getestet. Die Leckereignisse/30 s wurden zunächst ohne Intervention (-) im Lickometer aufgezeichnet. An einem zweiten Testtag wurde selbigen Tieren 30 min vor der ersten Lickometermessung entweder physiologische Kochsalzlösung (NaCl, Kontrollgruppe) oder 30 nmol/g KG des P2X₃-Antagonisten (Interventionsgruppe) i.p. verabreicht. Weder die Leckereignisse/30 s mit oder ohne Intervention innerhalb einer Gruppe, noch die Leckverhältnisse zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe unterschieden sich signifikant. Somit zeigte der P2X₃-Antagonist keine Wirkung auf die gustatorische Wahrnehmung von Saccharose und Linolsäure. *p = <0,05. ***p = <0,001. n = 6-7.

Es stellte sich nun die Frage warum der spezifische P2X₃-Antagonist keine Wirkung auf die gustatorische Wahrnehmung des süßen Geschmacksstimulus Saccharose zeigt, obwohl hier von Finger et al. eine Beteiligung des P2X-Dimers, im speziellen des P2X₃-Homomers diskutiert wurde. Die Funktionalität des P2X₃-Antagonisten ist aus Experimenten zur Schmerzweiterleitung belegt (McGaraughty et al. 2003, Jarvis et al. 2004), da er auch hier an der Erregungsweiterleitung beteiligt ist. Eine Wirkung auf die Geschmacksweiterleitung liegt zwar Nahe, wurde aber zuvor noch nicht untersucht. Daher existieren bisher keine Belege über die Funktionalität des P2X₃-Antagonisten im Geschmackssystem. Das Ausbleiben eines Effektes auf die Süßwahrnehmung ist ein erster Hinweis auf eine fehlende Funktionalität. Dennoch sollten weitere Tests klären, ob eine höhere Konzentration und/oder eine längere Inkubationszeit des Antagonisten eine Wirkung hervorbringe bzw. sollte ein weiterer, nicht attraktiver Geschmacksstimulus (bitter) getestet werden. Diese Experimente konnten im Rahmen dieser Arbeit zumindest an einer kleinen Anzahl von Tieren (n = 3-4) durchgeführt werden.

3.3.3 Untersuchung der Funktionalität des P2X₃-spezifischen Antagonisten A-31749

Aufgrund der zuvor beschriebenen Daten, sollte im Rahmen der Möglichkeiten dieser Pilotstudie die Funktionalität des P2X₃-Antagonisten getestet werden. Hierzu wurde während der Wiederholung des Kurzzeit-Präferenztests der Linolsäuregruppe in der zweiten Woche die Gruppe nochmals aufgeteilt und mit einer höheren Konzentration des P2X₃-Antagonisten (100 nmol/g KG vs. 30 nmol/g KG), sowie einer längeren Inkubationszeit (90-120 min vs. 30-60 min bis zur Messung³¹) getestet werden. Zusätzlich konnte mit einer kleinen Anzahl an Tieren ein Vortest zur Wirkung des Antagonisten auf die Wahrnehmung des Bitterstoffs Denatoniumbenzoat durchgeführt werden.

Überprüfung des Einflusses von Konzentration und Inkubationszeit

Jeweils 3-4 C57BL/6-Tiere der Linolsäuregruppe wurden entweder mit 30 oder 100 nmol/g KG des P2X₃-Antagonisten 30 oder 90 min vor der ersten Messung behandelt, während die Kontrollgruppe lediglich physiologische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl i.p.) verabreicht bekam. Die Tiere wurden im Lickometer auf das Leckverhalten gegenüber 10 mM Linolsäure getestet. Das Ergebnis der Leckergebnisse/30 s ist in Abb. 36 dargestellt. Vergleicht man die Leckverhältnisse der einzelnen Gruppen miteinander, zeigte sich bei keiner der verschiedenen Interventionen eine signifikante Verringerung der Linolsäureleckwerte der Interventionsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Im allgemeinen waren die Leckwerte bei der verlängerten Inkubationszeit in allen Gruppen höher, was auf die hierdurch verlängerte Restriktionszeit (erhöhter Durst und Hunger) zurück zu führen ist. Auch waren generell die Leckwerte am Tag der 100-nmol-Intervention geringer als am Tag der 30-nmol-Intervention, da die 100-nmol-Intervention nach einem Pausentag (1x Restriktion) durchgeführt wurde, während die 30-nmol-Intervention am Tag nach den Messungen ohne Intervention stattfand (2x Restriktion ohne Pausentag). Diese Beobachtung hat allerdings keinen Zusammenhang mit dem Antagonisten, das sie sich ebenso in der Kontrollgruppe fand. Zusammenfassend hatte weder Erhöhung der Konzentration noch eine Verlängerung der Inkubationszeit einen Einfluss auf die Wirkung des Antagonisten auf die Wahrnehmung von Saccharose oder Linolsäure.

Überprüfung des Einflusses des Antagonisten auf die Wahrnehmung eines Bitterstoffs

Für die Testung von aversiven Stimuli erwies sich in anderen Studien unserer Arbeitsgruppe eine komplette Restriktion von Wasser, ohne eine Restriktion des Futters, für 18 h als ausreichend. Hierbei sollten die Tiere vor allem starken Durst entwickeln, um hohe, aber nicht maximale, basale Leckwerte (für Wasser) zu erhalten, damit eine Verringerung der Leckwerte durch den aversiven

³¹ Es wurden innerhalb von 30 min zwei Messungen á 5 min je Tier im Abstand von 20 mindurchgeführt.

Stimulus gut zu detektieren ist. Daher wurde außerhalb der Saccharose-Linolsäure-Pilotstudie ein Vortest an einer kleinen Anzahl von Tieren (n=3) durchgeführt, um die Wirkung des P2X₃-Antagonisten auf die gustatorische Wahrnehmung der Bittersubstanz Denatoniumbenzoat zu untersuchen. Hierfür wurden die Tiere wie oben beschrieben einer 18-h-Wasserrestriktion und danach einem Kurzzeitpräferenztest im Lickometer unterzogen. Dabei wurden zunächst die Leckwerte gegenüber Wasser und 3 mM Denatoniumbenzoat, mit und ohne vorherige Kontrollintervention (0,9 % NaCl i.p.) bestimmt. Am letzten Tag wurden die Leckwerte der Tiere gegenüber 3 mM Denatoniumbenzoat mit vorheriger Applikation von 100 nmol/g KG des P2X₃-Antagonisten und einer Inkubationszeit von 30 min. bestimmt. Diesmal wurden je Tier und Messtag 3 Messwerte aufgezeichnet. Das Ergebnis des Tests ist in Abb. 37 dargestellt. Es zeigte sich zunächst die erwartete signifikante Aversion gegenüber dem Bitterstimulus, hierbei betrug das Verhältnis der Leckwerte zwischen Wasser und 3 mM Denatoniumbenzoat 0,4. Dies ergab sich sowohl ohne als auch mit Applikation der physiologischen Kochsalzlösung. Interessanterweise führte die Intervention mit dem P2X₃-Antagonisten zur signifikanten Erhöhung der Leckwerte für Denatoniumbenzoat. Hierbei betrug das Leckverhältnis zwischen Kontroll- und Antagonistenintervention 2,7, d.h. die Tiere zeigten nahezu dreifach erhöhte Leckwerte durch Applikation des Antagonisten, so dass sich das Leckverhältnis von Denatonium unter Antagonistenwirkung gegenüber Wasser nicht mehr signifikant unterschied. Demnach ist hier die Aversion gegenüber Denatoniumbenzoat verschwunden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der P2X₃-Antagonist tatsächlich in der Lage ist auch im Geschmackssystem seine Funktion zu erfüllen, d.h. eine P2X₃-vermittelte Weiterleitung von Geschmacksinformation zu unterdrücken.

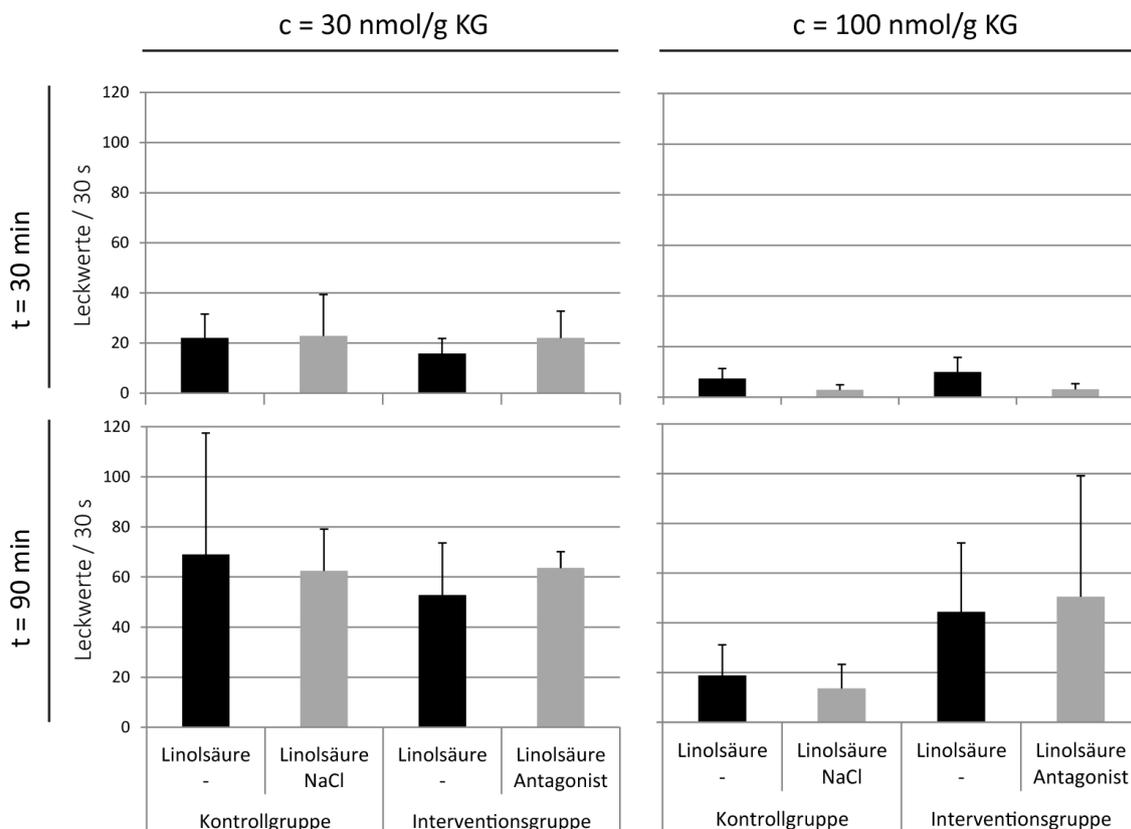


Abb. 36: Überprüfung des Einflusses von Konzentration und Inkubationszeit des P2X₃-Antagonisten. C57BL/6-Mäusen wurde entweder mit 30 nmol/g KG oder 100 nmol/g KG des P2X₃-Antagonisten bzw. in der Kontrollgruppe 0,9 % NaCl verabreicht (i.p.). Die Messungen im Lickometer wurden entweder nach 30 min oder 90 min begonnen. Die Messung im Lickometer erfolgte dabei je Tier 2-fach im Abstand von 25 min. Es zeigte sich keine Verringerung der Linolsäurepräferenz durch die Einwirkung des Antagonisten. n = 3-4.

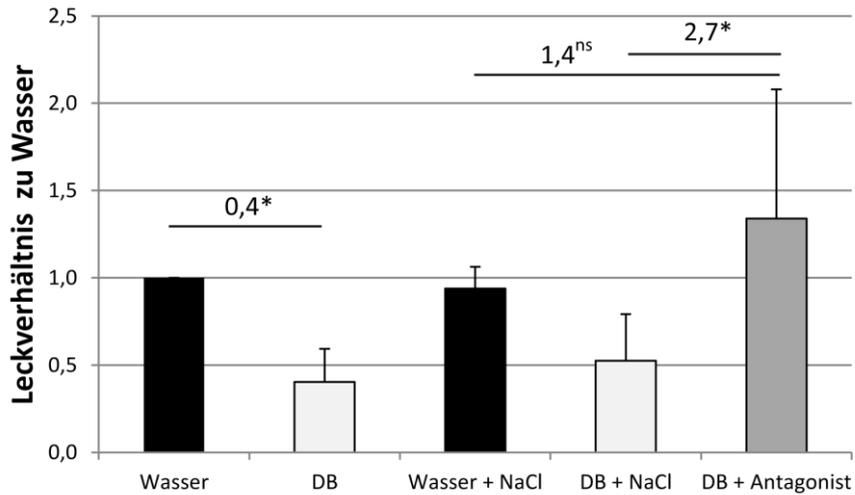


Abb. 37: Wirkung des P2X₃-Antagonisten auf die Wahrnehmung von 3 mM Denatoniumbenzoat. C57BL/6-Mäuse wurden für 18 h einer Wasserrestriktion unterworfen, um das Leckverhalten gegenüber 3 mM Denatoniumbenzoat im Kurzzeit-Präferenztest zu untersuchen. Die Tiere wurden mit und ohne Intervention mit einer NaCl-Kontroll- oder der P2X₃-Antagonistenlösung (100 nmol/g KG) im Lickometer getestet. Die Intervention erfolgte i.p. 30 min vor der ersten Messung. Als Kontrolllösung diente Wasser. Die Tiere zeigten wie erwartet ein aversives Leckverhalten gegenüber Denatoniumbenzoat im Vergleich zu Wasser. Dieses aversive Geschmacksverhalten wurde durch die Applikation des P2X₃-Antagonisten vollständig unterdrückt. Die Leckwerte gegenüber 3 mM Denatoniumbenzoat mit Antagonisten-Intervention lagen signifikant um das 2,7-fach höher als mit Kontrollintervention (NaCl). Oberhalb der Balken ist das Verhältnis zwischen den Balken angegeben.* p<0,05. n = 3.

4 Diskussion

In diesem Abschnitt sollen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit diskutiert und in den Kontext des aktuellen Forschungsstands gestellt werden. Der Fokus der Diskussion liegt in Kapitel 4.1 zunächst auf der Klärung der Frage, ob auch der Mensch in der Lage ist, Fette gustatorisch wahrzunehmen und ob diese Wahrnehmung einer selbständigen Geschmacksqualität „fettig“ zugeschrieben werden kann. In Kapitel 4.2 wiederum werden alternative bzw. zusätzliche Funktionen des im Geschmackssystem gefundenen Fettsäurerezeptors GPR120 diskutiert. Kapitel 4.3 befasst sich mit der Bedeutung der gustatorischen Fettwahrnehmung für die Entstehung und Prävention von Adipositas und assoziierten Krankheiten.

4.1 Gibt es beim Menschen einen gustatorischen Mechanismus der Fettwahrnehmung und kann es als eine Grundgeschmacksqualität definiert werden?

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die molekularen und histologischen Voraussetzungen für eine potentielle gustatorische Wahrnehmung von Fetten bzw. Fettbestandteilen beim Menschen zu untersuchen. Um spezifische Nahrungskomponenten über Geschmacksmechanismen wahrnehmen zu können, müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt werden. Im Besonderen gilt dies, wenn diese Mechanismen in die Definition einer neuen Grundgeschmacksqualität münden sollen. Allerdings existieren momentan keine allgemein gültigen Vorschriften über die Eigenschaften, die eine Geschmacksqualität definieren. Im Zuge der Entdeckung des Umamigeschmacks und der bisherigen Untersuchungen zur Fettgeschmackswahrnehmung wurden dennoch einige grundlegende Anforderungen in der Literatur zusammengestellt. Wie in der Einleitung (Kap. 1.1.2) erwähnt, können auf Basis der Aussagen von Tucker und Mattes bisher folgende Kriterien als ausschlaggebend angesehen werden (Tucker and Mattes 2012):

- (1) Die Nahrungskomponente sollte unter **Ausschluss aller anderen sensorischen Einflüsse** (taktile, olfaktorische, visuelle) anhand einer **Geschmackskomponente** sensorisch erkannt und durch einen **spezifischen Deskriptor** beschrieben werden können. Dieser Geschmackseindruck sollte nicht durch eine Kombination anderer Geschmacksqualitäten erklärbar sein.
- (2) Die Wahrnehmung einer Geschmacksqualität sollte einem **spezifischen Stimulus** (chemische Substanz) bzw. einer Gruppe von Stimuli zugeordnet werden können, welche **direkt in der Nahrung vorkommen oder durch orale Prozessierung aus der Nahrung freigesetzt** werden (z.B. durch Speichelenzyme).
- (3) Diese Gruppe von Stimuli sollte **spezifische Sensoren** aktivieren, welche **im Geschmackssystem** in den Geschmackszellen exprimiert sind.
- (4) Um als Grundgeschmacksqualität unabhängig von anderen Geschmacksqualitäten definiert zu sein, muss eine **spezifische Subpopulation an Geschmackszellen** existieren, die nur durch die spezifischen Stimuli aktiviert werden, da sie nur die für diese Qualität spezifischen Sensoren exprimieren.
- (5) Die Aktivierung dieser Sensoren muss zur **Aktivierung von Geschmackszellen** führen und das Aktivierungssignal sollte über **gustatorische Nervenbahnen in Gehirnregionen** geleitet werden, welche an der **Geschmacksverarbeitung** beteiligt sind.

(6) Der Wahrnehmung einer Geschmacksqualität sollte eine **spezifische Funktion** zugrunde liegen, welche unter anderem evolutionäre Vorteile birgt. So zum Beispiel um einerseits energiereiche oder physiologisch aktive Nährstoffe in der Nahrung zu detektieren und gezielt aufzunehmen, oder andererseits vor der Aufnahme von schädlichen Nahrungsinhaltsstoffen zu schützen.

Für die derzeit gut untersuchten fünf Grundgeschmacksqualitäten (süß, umami, salzig, sauer, bitter) sind die meisten, wenn auch nicht alle dieser Mechanismen aufgeklärt und es wird eine spezifische Funktion antizipiert (vgl. Kap. 1.1.3) (Mattes 2011a, Iwata et al. 2013). Was jedoch die gustatorische Wahrnehmung von Fetten betrifft unterliegen die oben genannten Kriterien erst dem Nachweis durch die aktuelle Forschung. Während sich für Nagetiere die Hinweise auf Fettgeschmacksmechanismen in den letzten Jahrzehnten immer mehr verdichteten, gab es zu Beginn dieser Arbeit bis auf erste psychophysikalische Untersuchungen nur wenige Hinweise auf selbige Mechanismen beim Menschen (vgl. Kap. 1.3.3). Die in Kapitel 3 dieser Arbeit aufgezeigten Ergebnisse stellen neue grundlegende Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen der oralen Fettwahrnehmung des Menschen dar. Die Ergebnisse geben Hinweise, die eine erste Beurteilung der Mehrzahl der oben aufgeführten sechs Kriterien in Bezug auf die Geschmackswahrnehmung von Fetten ermöglichen. In Kombination mit den Ergebnissen der Projektpartner³² und neuen Erkenntnissen aus der wissenschaftlichen Literatur sollen die Ergebnisse dieser Arbeit im Bezug auf die o.g. Kriterien diskutiert werden.

4.1.1 Das Attribut „fettig“ als eine texturabhängige Geschmackskomponente und eine mögliche Verbindung zum oral exprimierten fettsäuresensitiven Rezeptor GPR120.

Um die reine Geschmackskomponente einer Substanz zu bestimmen, müssen andere Sinneseindrücke, welche zur gleichen Zeit von dieser Substanz ausgehen, ausgeschaltet werden. Hierzu zählen die mechanische Reizung über taktile Rezeptoren, die Geruchswahrnehmung und visuelle Eindrücke. Im Besonderen bei der Untersuchung von Fetten erwies sich die Isolation der Geschmackswahrnehmung als eine Herausforderung, da Fette sowohl eine Geruchs- als auch ausgeprägte Textureigenschaften besitzen (Tucker and Mattes 2012). Dass es eine orale Komponente bei der Wahrnehmung von Fetten gibt, wurde in psychophysikalischen Studien zwar schon seit den 1970er Jahren sporadisch publiziert, oft differenzierte man in diesen Studien allerdings nicht hinsichtlich der verschiedenen Wahrnehmungswege (taktil oder gustatorisch) und kontrollierte nicht auf olfaktorische oder visuelle Einflüsse (Baur and Grosch 1977, Tepper and Nurse 1997, Kamphuis et al. 2001, Mattes 2001, Kamphuis et al. 2003). Erst Chale-Rush und Kollegen haben psychophysikalische Untersuchungen zur oralen Wahrnehmung von langkettigen Fettsäuren durchgeführt, bei denen durch den Einsatz von Textur-maskierenden Matrixlösungen, Nasenclips zur Minderung von Gerüchen, Rotlicht zur Kontrolle visueller Einflüsse und Capsaicin-Desensitivierung zur Verminderung von trigeminalen Reizeinflüssen, eine gustatorische Komponente der Fettsäurewahrnehmung isoliert werden konnte (Chale-Rush et al. 2007a, Chale-Rush et al. 2007b). Es folgten ähnlich gut kontrollierte Studien zur rein gustatorischen Wahrnehmung, die auch kurz- und mittelkettige Fettsäuren beinhalteten (Mattes 2009a, Mattes 2009b, Stewart et al. 2010). Die in diesen Studien ermittelten Schwellwerte erwiesen keine großen Unterschiede in der Wahrnehmung von Fettsäuren verschiedener Kettenlänge, waren nicht mit dem Sättigungsgrad der Fettsäuren korreliert und zeigten eine sehr hohe Varianz zwischen den Studien. In diesen

³² Dies bezieht sich speziell auf Ergebnisse der Gruppe um Prof. Thomas Hofmann, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik der TU München, sowie Ergebnisse von Dr. Maria-Mercedes Galindo aus der Arbeitsgruppe um Dr. Maik Behrens, Abteilung Molekulare Genetik des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke.

Untersuchungen wurde allerdings nicht konkret nach dem zugrundeliegenden Attribut der gustatorischen Wahrnehmung befragt. Die Vorgehensweise der Befragung der Probanden (zumeist die Frage „Welche Probe von einer Auswahl an Proben ist anders?“) lässt zwar auf eine gustatorische Detektion zurückschließen, besitzt jedoch den Nachteil, dass nicht erschlossen wird, welcher Eindruck (Attribut) wahrgenommen wurde. So ist ebenfalls publiziert, dass Fettsäuren, neben den eigentlichen mit fettig assoziierten Attributen (cremig, viskös), auch eine Reihe von anderen Geschmacksqualitäten (u.a. bitter oder sauer) sowie Eigenschaften wie adstringierend oder reizend aufweisen (Baur et al. 1977, Chale-Rush et al. 2007b). Daher können den Detektionsschwellwerten aus oben erwähnten Studien durchaus unterschiedliche Attribute zugrunde liegen und somit eine hohe Varianz bedingen. Die im Rahmen unseres Clusterprojektes erhaltenen Ergebnisse aus sensorischen Studien der Arbeitsgruppe um Thomas Hofmann stellten erste Hinweise auf eine als „fettig“ zu beschreibende gustatorische Komponente (Galindo et al. 2012). Nicht nur wurde in diesen Studien auf oben beschriebene nicht-gustatorische Wahrnehmungswege kontrolliert, es erfolgte auch eine Bestimmung der wahrgenommenen Attribute. Hierbei zeigte sich tatsächlich, dass langkettige Fettsäuren durch ein als „fettig“ beschreibbares gustatorisches Attribut wahrgenommen werden können (Detektionsschwellwerte). Die Detektionsschwellwerte für „fettig“ nahmen hierbei mit zunehmender Zahl an Doppelbindungen (C18:1 vs. C18:2 vs. C18:3) und der Kettenlänge (C18 vs. C20) ab. Es zeigte sich aber auch, dass die Fettsäuren, welche in niedrigen Konzentrationen (<0,5 mM) als „fettig“ wahrgenommen wurden, in höheren Konzentrationen (>0,8 mM) ein als „kratzig“ beschriebenes Empfinden im Rachenraum auslösten. Diese Beobachtungen könnten zum einen die in vorangegangenen Studien beobachteten hohen Varianzen von Schwellwerten erklären, da keine Attribute unterschieden wurden, zum anderen weisen sie auf die hohe Bedeutung der Nachfrage des Attributes bei humanen sensorischen Studien hin.

Überraschenderweise zeigte sich in Hofmanns Studien auch, dass die „fettige“ Wahrnehmung texturgebunden ist. Es wurden Fettsäuren, welche in einer die Textur maskierenden viskösen Matrix³³ gelöst waren, als „fettig“ erkannt, während die Kontrollmatrix ohne Fettsäuren nicht „fettig“ schmeckte. Dennoch riefen die gleichen Fettsäuren, gelöst in Wasser, lediglich den für höhere Konzentrationen beschriebenen „kratzigen“ Eindruck hervor. Somit ist zwar eine gustatorische Wahrnehmung vorhanden, allerdings nur in Verbindung mit einem gewissen viskösen Hintergrund. Eine solche Abhängigkeit ist für die klassischen Geschmacksqualitäten bitter, sauer, süß, salzig und umami nicht beschrieben und es stellt sich die Frage, ob „fettig“ trotz einer solchen Abhängigkeit als eine klassische Geschmacksqualität beschrieben werden kann. Dass auch Stimuli, die klassischen Geschmacksrichtungen besitzen, durchaus mehrere dieser Qualitäten ansprechen und auch zusätzliche Attribute, wie adstringierend oder reizend, aufweisen können, ist jedoch bekannt. So wird beispielsweise Saccharin in niedrigen Konzentrationen als süß, in hohen Konzentrationen jedoch als zunehmend bitter empfunden (Roudnitzky et al. 2011). Auch sind diverse Teeinhaltsstoffe (bspw. Epigallocatechingallat) neben ihrem bitteren Geschmack zusätzlich als adstringierend beschrieben worden (Bohin et al. 2013, Yu et al. 2014).

Interessanterweise lässt sich der in dieser Arbeit in den humanen Wallpapillen gefundene fettsäuresensitive Rezeptor GPR120 (vgl. Kap. 3.1) in pharmakologischen Studien der sensorischen Wahrnehmung „fettig“, nicht aber der Wahrnehmung „kratzig“ zuordnen (Galindo et al. 2012). Während die im sensorischen Studienteil als „fettig“ wahrgenommenen langkettigen Fettsäuren *in vitro* eine Aktivierung von GPR120 hervorriefen, waren entsprechende Derivate dieser Fettsäuren (Fettsäurealkohole), welche in sensorischen Studien einzig als „kratzig“ wahrgenommen wurden, nicht in der Lage eine Aktivierung von GPR120 hervorzurufen. Somit lässt sich feststellen, dass GPR120

³³ Hervorgerufen durch geschmacksneutrales Mineralöl und Gummi arabicum.

nicht an der Vermittlung der Wahrnehmung „kratzig“ beteiligt sein kann, wohl aber an der Vermittlung von „fettig“.

Eine weitere Korrelation zwischen dem fettsäuresensitiven Rezeptor GPR120 und der oralen Wahrnehmung von Fettsäuren kann auch über das in dieser Arbeit gefundene GPR120-Expressionsmuster und der in den sensorischen Studien beobachteten Texturabhängigkeit von „fettig“ erfolgen. So wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die GPR120-mRNA auch in geschmackszellfreiem Gewebe zu detektieren ist und sich eine immunreaktive Färbung des GPR120-Proteins sowohl innerhalb der Geschmackszellen als auch in extra-gemmalen Epithelzellen der Wallpapille findet (Kap. 3.1.7). Es stellt sich hier die Frage, ob nicht GPR120 sowohl gustatorische Informationen (über die Aktivierung in Geschmackszellen) als auch gleichzeitig texturgebundene Informationen über sein Vorkommen in Epithelzellen vermittelt. Entsteht ein „fettiger“ Geschmackseindruck in höheren Stationen der Geschmacksverarbeitung, nur über die Kombination dieser beiden peripheren Informationen könnte dies eine texturgebundene gustatorische Wahrnehmung von Fettsäuren erklären. Bekannt ist, dass trigeminale Texturinformationen über taktile Sensoren wahrgenommen werden. Morphologische Strukturen finden sich dazu in verschiedenen Schichten der Epidermis und Dermis. Sie umfassen freie Nervenenden, Merkel-Zellen, sowie Meissner- bzw. Vater-Pacini-Körperchen (Abraira and Ginty 2013). Eine Beteiligung von Membran-assoziierten Strukturen (Integrine, Aktine), Signalmolekülen (PLA₂, PLC) oder auch Ionenkanälen (TRPV-, TRPC- und TRPM-Typ) an der mechanischen (textuellen) Wahrnehmung wird ebenso diskutiert (Kung 2005, Storch et al. 2012). Interessanterweise wurden kürzlich auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (u.a. AT₁R, FPR₁, PTH₁R) mit Potential für die Detektion mechanischer Reize, welche eine Membrandehnung an Zellen verursachen, in Verbindung gebracht (Kung 2005, Storch et al. 2012). Ebenso wurde zum Beispiel für den Säure-sensitiven Ionenkanal ASIC3 ebenfalls eine Funktion bei der multimodalen Sinneswahrnehmung, u.a. chemo- und mechanosensorische Funktionen, diskutiert (Li and Xu 2011). Es ist auch beschrieben, dass fettsäuresensitive Rezeptoren, unter ihnen GPR120, direkt auf trigeminalen Fasern zu finden sind (Yu et al. 2012). Diese Beobachtungen weisen auf die Komplexität sensorischer Wahrnehmungen hin und lassen eine GPR120-vermittelte trigeminale Signalverarbeitung durchaus möglich erscheinen. In welchen epithelialen, nicht-gustatorischen Zelltypen GPR120 exprimiert ist und ob auch hier eine Informationsweiterleitung auf trigeminale Nerven, wie kürzlich für gustatorische Nerven beschrieben (Sclafani and Ackroff 2014), von P2X-Rezeptoren abhängig ist, darauf können die Ergebnisse dieser Arbeit allerdings noch keine Hinweise geben (Kap. 3.3). Zukünftig sind weitere Untersuchungen der epithelialen Funktion von GPR120 nötig, um zu klären ob Signaltransduktionsmechanismen oder strukturelle Verbindungen (u.a. zu Nervenfasernenden) vorhanden sind, welche eine textuelle Informationsweiterleitung erklären ließen bzw. wenn nicht, welche andere Funktion der epithelial exprimierte GPR120 besitzt.

4.1.2 Fettsäuren als gustatorischer Stimulus und die Bedeutung lingualer Lipasen.

Aus Präferenztests war zu Beginn dieser Arbeit bereits bekannt, dass Nagetiere sowohl freie Fettsäuren als auch Triglyceride gustatorisch wahrnehmen können. Ebenso war bekannt, dass Nager eine hohe lipolytische Aktivität im Speichel aufweisen und das Enzym linguale Lipase oral exprimiert und mit dem Speichel sekretiert wird (Plucinski et al. 1979, DeNigris et al. 1988). Durch Experimente, in denen mit Hilfe eines Inhibitors die enzymatische Spaltung von Triglyceriden unterbunden wurde, zeigte sich, dass Nager Triglyceride nicht direkt, sondern über die Abspaltung von Fettsäuren und Aktivierung von fettsäuresensitiven Rezeptoren wahrgenommen werden (Hiraoka et al. 2003, Kawai and Fushiki 2003). Letztendlich sind demnach freie Fettsäuren die eigentlichen bisher nachgewiesenen Stimuli für die gustatorische Fettwahrnehmung bei Nagetieren. Ob bei der

gustatorischen Wahrnehmung von Fetten auch beim Menschen die linguale Lipase eine Rolle spielt, wurde lange Zeit diskutiert. Im Gegensatz zu Nagetieren ist beim Menschen in der Vergangenheit nur eine geringe lipolytische Aktivität nachgewiesen worden (DeNigris et al. 1988). Der Mensch besitzt jedoch eine hohe lipolytische Aktivität im oberen Magen-Darm-Trakt durch die hohe Expression der gastrischen Lipase (DeNigris et al. 1988, Voigt et al. 2014). Dieses Protein ist mit der linguale Lipase identisch. Nagetiere wiederum besitzen nur eine geringe gastrische Lipaseaktivität (DeNigris et al. 1988). Die linguale Lipase der Nagetiere dient daher schon der Vorverdauung von Fetten, während beim Menschen die Fettverdauung und damit Freisetzung von Fettsäuren in größerem Umfang erst im Magen beginnt. Freie Fettsäuren kommen in der menschlichen Nahrung im Vergleich zu Triglyceriden aber nur in stark fetthaltigen Lebensmitteln (Butter, Öl, Nüsse) in ausreichenden Mengen vor (bspw. 0,2-0,3 % in Olivenöl), nur bedingt jedoch in der Mehrzahl anderer Lebensmittel und in komplexeren Lebensmitteln bzw. Gerichten (Lawson 1995, Daley et al. 2010, Tvrzicka et al. 2011, Kulkarni and Mattes 2013). Somit stellten sich mehrere Fragen: besitzt der Mensch neben fettsäuresensitiven Sensoren noch ein anderes Sensorsystem für Triglyceride im Geschmackssystem? Reichen die geringen Mengen an Fettsäuren in der Nahrung für eine gustatorische Detektion über Fettsäurerezeptoren aus? Oder gibt es möglicherweise andere lipolytische Mechanismen?

Pepino und Kollegen zeigten in sensorischen Studien auch für den Menschen, dass sich der gustatorische Detektionsschwellwert für Triolein durch Zugabe eines Lipaseinhibitors (Orlistat) erhöht, während sich der Schwellwert für Ölsäure nicht änderte (Pepino et al. 2012). Dies führte zur Annahme, dass auch für den Menschen ein lipolytischer Mechanismus zur gustatorischen Fettwahrnehmung beiträgt. Auch Hofmann und Kollegen zeigten im Rahmen unseres Clusterprojektes, dass humane Probanden Triolein mit etwa gleicher Sensitivität wie Ölsäure (0,5 bzw. 0,4 mM) gustatorisch als „fettig“ wahrnehmen (Voigt et al. 2014). Der in der vorliegenden Arbeit in humanen Geschmackspapillen gefundene Rezeptor GPR120 ist jedoch nur durch Fettsäuren (u.a. Ölsäure), nicht aber durch Triglyceride (u.a. Triolein) in *In-vitro*-Zellassays aktivierbar (Galindo et al. 2012, Voigt et al. 2014). Außerdem wurde mittels RT-PCR in dieser Arbeit (vgl. Kap. 3, Abb. 21) und anhand von *In-situ*-Hybridisierung in unserer Arbeitsgruppe³⁴ keine Expression der linguale Lipase F in humanem Von-Ebner-Speicheldrüsengewebe nachgewiesen (Voigt et al. 2014). Dennoch zeigten auch Experimente der Gruppe Hofmann, ähnlich wie Pepino und Kollegen, dass bei humanen Probanden, durch die Gabe des Lipaseinhibitors Tetrahydrolipstatin die gustatorische Wahrnehmung von Triolein, aber nicht von Ölsäure, beeinträchtigt wird (Pepino et al. 2012, Voigt et al. 2014).

Weiter wiesen sie die Freisetzung von Fettsäuren aus Triglyceriden im Speichel der Von-Ebner-Drüsen nach (Voigt et al. 2014). Die Von-Ebner-Speicheldrüsen befinden sich direkt unterhalb der Geschmackspapillen in der Zunge. Ihre Ausführungsgänge münden in die Gräben der Wall- und Blätterpapillen. Speichelsekret umfließt daher direkt die Poren von Geschmacksknospen (vgl. Kap. 1.1.5). Die lokale Konzentration an lipolytischen Enzymen ist somit sehr viel höher als im Gesamtspeichel, der hauptsächlich aus dem Speichelsekret der großen Speicheldrüsen besteht. Dies ist möglicherweise ein Grund für unterschiedliche Ergebnisse bezüglich lipolytischer Aktivität in früheren Studien (DeNigris et al. 1988, Spielman et al. 1993). Auch wurde die lipolytische Aktivität zum Teil post mortem in humanem Biopsiematerial der Von-Ebner-Drüsen bestimmt (Hamosh and Burns 1977, DeNigris et al. 1988). Diese Methode bedingt möglicherweise ebenso eine reduzierte Aktivität.

Woher kommt nun aber diese lipolytische Aktivität, wenn, wie in dieser Arbeit gezeigt, die linguale Lipase F nicht in den Von-Ebner-Drüsen des Menschen exprimiert ist (Kap. 3.2.1)? Die Familie der sekretorischen Lipasen, zu der auch die Lipase F gehört, umfasst eine Reihe von strukturell ähnli-

³⁴ Durchgeführt von MM Galindo.

chen Lipasen. Hierzu zählen auch Lipase J (LIPJ), Lipase K (LIPK), Lipase M (LIPM) und Lipase N (LIPN). Diese wurden erstmals in Keratinozyten nachgewiesen, wo sie zunächst mit der Barrierefunktion der Haut assoziiert wurden (Toulza et al. 2007), aber später auch mit einem Vorkommen in der Mundhöhle von Nagern in Verbindung gebracht (Holmes et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte nun eine Expression von LIPK, LIPM und LIPN, nicht jedoch LIPJ, im Von-Ebner-Drüsengewebe des Menschen nachgewiesen werden. Sowohl per RT-PCR (vgl. Kap. 3.2.2, Abb. 23), als auch auf zellulärer Ebene zeigt sich anhand der *In-situ*-Hybridisierung eine Expression der mRNA dieser Enzyme in den Drüsenzellen (vgl. Kap. 3.2.3, Abb. 29). Wie in der Literatur beschrieben, wurde die Expression auch in den Keratinozyten des Zungenepithels gefunden (vgl. Kap. 3.2.3, Abb. 27). Zusammen mit den Daten der Gruppe Hofmann zur lipolytischen Freisetzung von Fettsäuren aus Triglyceriden im Speichelssekret der Von-Ebner-Drüsen, gibt das Vorkommen der Lipasen K, M und N den Nachweis, dass auch beim Menschen in der Mundhöhle Fettsäuren aus Nahrungslipiden freigesetzt werden können. In der Tat gehören diese Lipasen zur Familie der sekretorischen Lipasen und besitzen, wie in Kap. 3.2.4 im Rahmen der *In-silico*-Strukturanalyse gezeigt, ein Signalpeptid, welches den kotranslationalen Transport der Lipaseproteine an die Zellmembran und nachfolgende Sekretion ermöglicht. Die Proteinstruktur der Lipasen, im Besonderen der Lipase K, zeigte nur eine geringe Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen von Transmembrandomänen, was ebenfalls für eine Sekretion spricht (vgl. Anhang Abb. 48). Grundsätzlich ist die Aminosäurestruktur der Lipasen K, M und N der Struktur der Lipase F sehr ähnlich. Der Aminosäuresequenzvergleich zeigt, dass auch Lipase K, M und N neben dem Signalpeptid eine *Core*-Region besitzen, sowie eine *Cap*-Region, welche eine Art Deckel (*Lid*-Region) enthält, der das aktive Zentrum, bestehend aus der katalytischen Triade Serin, Asparagin, Histidin abdeckt (vgl. Kap. 3.2.4). Festzustellen war allerdings, dass gerade die *Cap*- und *Lid*-Region weniger stark konservierte Bereiche enthält. Für die Lipasen K, M und N existieren bisher noch keine Daten zur Kristallstruktur, so dass in der vorliegenden Arbeit anhand der bekannten Kristallstruktur der Lipase F (Canaan et al. 1999, Roussel et al. 1999, Roussel et al. 2002) eine Vorhersage zur Tertiärstruktur der anderen Lipasen vorgenommen wurde. Hierbei zeigte sich ebenfalls, dass sich der Bereich des katalytischen Zentrums und der zugehörige Deckel höchstwahrscheinlich unterscheiden. Dies gibt die Grundlage für eine unterschiedliche Substratspezifität bzw. enzymatische Aktivität. In sensorischen Studien zeigten humane Probanden eine spezifische gustatorische Wahrnehmung als „fettig“ für langkettige Fettsäuren und eine geringeren Erkennungsschwellwert je länger die Fettsäurekette war (Galindo et al. 2012). DeNigris und Kollegen zeigten wiederum, dass die linguale/gastrische Lipase F eine Substratspezifität für Triglyceride aus mittelkettigen Fettsäuren (Tricaprylin) gegenüber Triglyceriden mit langkettigen Fettsäuren (Triolein) zeigt (DeNigris et al. 1988). Dies trifft auch auf die humane Lipase F zu und weist darauf hin, dass die orale bzw. gastrische Lipolyse beim Menschen in der Tat durch unterschiedliche Enzyme bewerkstelligt wird (Gargouri et al. 1986, Gargouri et al. 1989). Zum genauen Substratspektrum der in dieser Arbeit im humanen Von-Ebner-Drüsengewebe gefundenen Lipasen liegen bisher keine Daten vor. Eine genaue biochemische Charakterisierung wäre demnach ein wichtiger Schritt für das Verstehen der oralen Fettwahrnehmung.

In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin gezeigt, dass zum einen im Biopsiematerial verschiedener Probanden vermutlich eine unterschiedliche Zusammensetzung der drei Lipasen zu finden ist. Während Lipase K in allen Geschmacksgewebeproben gefunden wurde, war eine Expression der Lipase M nur bei einem Probanden zu finden (vgl. Kap. 3.2.2 Abb. 23). Zum anderen sind auch unterschiedliche Varianten der Lipase N in den verschiedenen Biopsiematerialien nachweisbar gewesen und durch Sequenzierung bestätigt worden (vgl. Kap. 3.2.3, Abb. 23 und Abb. 24). Nahezu identische Varianten sind in der Literatur für die lysosomale Lipase A beschrieben, welche mit der Lipase N ebenfalls eng verwandt ist (Klima et al. 1993, Ameis et al. 1995, Pagani et al. 1996). Die fehlenden bzw. veränderten Aminosäurebereiche der Lipase N betreffen Regionen im Protein, die mit der

Bindung und Zugänglichkeit zum Substrat in Zusammenhang stehen, sodass eine Änderung der Substratspezifität oder gar ein Funktionsverlust des Enzyms zu erwarten ist. Interessant wäre demnach zu untersuchen, ob diese Unterschiede im Expressionsmuster bezüglich Lipase-N-Varianten bzw. der drei Lipasen an sich, eine unterschiedliche lipolytische Aktivität (hinsichtlich Ausmaß und Substratspezifität) bei einzelnen Probanden auslösen. Dazu wäre eine Korrelation von sensorischen Daten zur Triglyceridwahrnehmung mit Aktivitäts- und Expressionsbestimmungen in verschiedenen Probanden nötig. Interessanterweise haben Hofmann und Kollegen bei der Untersuchung verschiedener Probanden auf ihre orale lipolytische Aktivität tatsächlich große Unterschiede gefunden (Voigt et al. 2014). Hiernach konnte unter den Probanden nach zwei Gruppen unterschieden werden, wobei die Gruppe mit der geringeren lipolytischen Aktivität (geringere Freisetzung von Ölsäure aus Triolein) auch die höheren Detektionsschwellwerte für Triolein zeigte. Demnach gibt es individuelle Unterschiede bezüglich der lipolytischen Fettsäurefreisetzung, welche gleichzeitig eine Auswirkung auf die gustatorische Sensitivität der Probanden bei der Fettgeschmackswahrnehmung hat. Möglicherweise ist dies auf Unterschiede in der Enzymausstattung des Speichels zurückzuführen. Allerdings kann auch allein die Menge an Enzym oder die allgemeine Zusammensetzung des Speichels individuellen Schwankungen unterliegen und allein daher eine Auswirkung auf die Geschmackswahrnehmung haben (Helmerhorst and Oppenheim 2007, Neyraud et al. 2012, Neyraud 2014). Dass die orale Sensitivität gegenüber Fettsäuren in Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme und dem Körpergewicht steht, ist bereits in der Literatur gezeigt worden (vgl. Kap. 4.3)(Stewart et al. 2010, Pepino et al. 2012, Pepino et al. 2014).

Die Bedeutung der oralen Lipolyse für den Menschen liegt aufgrund der geringen Aktivität im Gesamtspeichel vermutlich nicht in der Vorverdauung von Fetten, wie es bei Nagetieren der Fall ist. Allerdings kann die orale Lipolyse einen Einfluss auf die Fettgeschmackswahrnehmung haben. In fettreichen Nahrungsmitteln wie Ölen, Butter oder Nüssen sind ausreichend freie Fettsäuren vorhanden, um eine direkte Aktivierung von Fettsäurerezeptoren zu bewerkstelligen (Lawson 1995, Kulkarni and Mattes 2013). Jedoch führt im Fall von fettärmeren Nahrungsmitteln, wie Milch oder Fleisch mit geringerer Konzentration an freien Fettsäuren, möglicherweise erst eine orale Freisetzung von Fettsäuren aus Triglyceriden zum Überschreiten der Schwellwertkonzentration. Außerdem muss diese Schwellwertkonzentration zur Aktivierung von Fettgeschmacksrezeptoren möglichst am Rezeptor, also im Umfeld der Geschmacksknospen erreicht werden. Dies ist durch eine lokale Freisetzung von Lipasen aus den Von-Ebner-Drüsen in die Gräben der Geschmackspapillen gegeben.

4.1.3 Fettsäuresensitive Rezeptoren in humanen Geschmackszellen und die Übereinstimmung ihrer pharmakologischen Eigenschaften mit sensorischen Daten.

Damit Fettsäuren vom Menschen über eine Geschmackskomponente als „fettig“ wahrgenommen werden können, müssen fettsäuresensitive Sensoren in den Geschmackszellen des humanen Geschmacksgewebes vorhanden sein. Daher wurde in dieser Arbeit eine Auswahl an Fettgeschmacksrezeptor-Kandidaten auf ihre Expression in humanen Pilz- und Wallpapillen untersucht. Die Auswahl der Kandidaten basierte auf verschiedenen Kriterien. Aus Nagetierstudien waren bereits Fettgeschmacksrezeptor-Kandidaten bekannt oder standen zumindest zur Diskussion. Zu ihnen zählten die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren GPR120, GPR40, GPR43, GPR41 und GPR84, sowie der Fettsäuretransporter CD36 und der fettsäuresensitive Kaliumkanal KCNA5 (Khan and Besnard 2009, Xu et al. 2009, Gilbertson et al. 2010). Fettsäuren bilden, sowohl frei als auch in Triglyceriden gebunden, wie bei Nagetieren auch den Hauptbestandteil der Fette der menschlichen Nahrung (vgl. Kap. 1.2). In ersten sensorischen Studien wurde eine orale Wahrnehmung sowohl von langkettigen (Chale-Rush et al. 2007a, Chale-Rush et al. 2007b), als auch von mittel- und kurzkettigen Fett-

säuren beim Menschen gezeigt (Mattes 2009a, Mattes 2009b, Stewart et al. 2010). Daher ist diese Gruppe an Rezeptoren auch für den Menschen in Betracht gezogen worden.

Die erwähnten Fettgeschmacksrezeptor-Kandidaten sind aufgrund ihrer Expression und Funktion in anderen Geweben und Organen bekannt (vgl. Tab. 4). Jeder der Rezeptorkandidaten ist in unterschiedlicher Weise an der Regulation des Energiestoffwechsels, des Fettmetabolismus oder der Hunger- und Sättigungsregulation beteiligt (Ichimura et al. 2009, Wellendorph et al. 2010, Kremmyda et al. 2011, Hara et al. 2014). Interessanterweise ist eine Expression und Funktion der Mehrzahl der Kandidaten (GPR120, GPR40, GPR43, GPR41, CD36) im Gastrointestinaltrakt beschrieben (Breer et al. 2012, Reimann et al. 2012). Dort sind sie an der Detektion und dem Transport von Fettsäuren beteiligt, welche mit der Nahrung aufgenommen, lipolytisch aus Nahrungstriglyceriden freigesetzt oder auch durch Darmbakterien, vornehmlich im Dickdarm, produziert werden (Kremmyda et al. 2011). Hierbei wird über die Aktivierung der fettsäuresensitiven Rezeptoren und Transporter eine Reihe physiologischer Prozesse in Gang gesetzt und reguliert (Kremmyda et al. 2011, Tvrzicka et al. 2011). Dazu zählen die Verdauungs-, Stoffwechsel- und Appetitregulation. Die hieran beteiligten Zellen und Signalwege im Gastrointestinaltrakt sind denen der Geschmackspapillen sehr ähnlich. Sowohl Geschmackszellen als auch enteroendokrine Zellen sind polar und besitzen apikal gelegene Mikrovilli, die nährstoffsensitive Rezeptoren (u.a. Glukosetransporter, TAS1Rs und Aminosäurerezeptoren) exprimieren (Abb. 38).

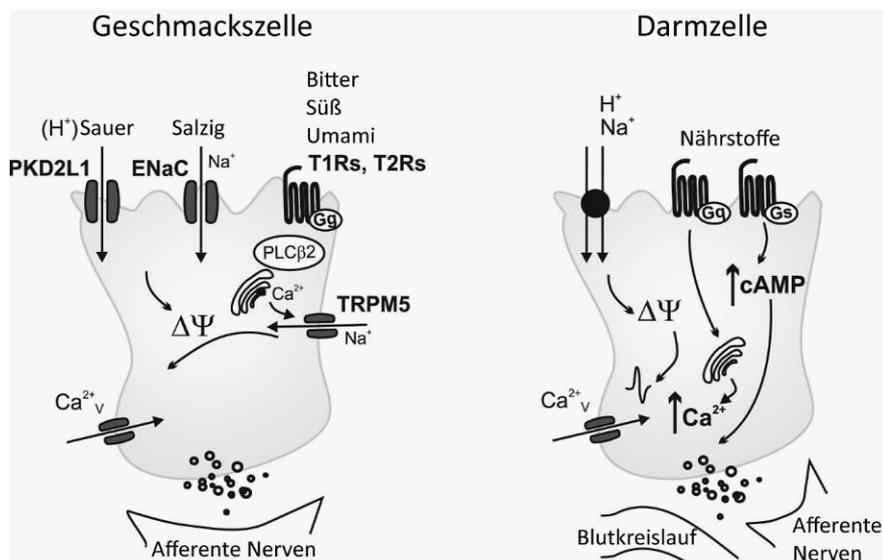


Abb. 38: Chemische Detektion von Nahrungsbestandteilen in Geschmackszellen und in enteroendokrinen Darmzellen (vereinfachtes Schema). Geschmackszellen und Zellen des Gastrointestinaltrakts teilen sich ähnliche Signaltransduktionselemente und morphologische Eigenschaften, die zur Detektion von Nahrungsbestandteilen dienen. Beide Systeme werden als ein Kontinuum diskutiert, in dem zum Teil gleiche Rezeptoren exprimiert werden, um die Anwesenheit von Kohlenhydraten, Aminosäuren oder auch Bitterstoffen und Fettsäuren zu erkennen. Abbildung abgewandelt nach (Reimann et al. 2012).

Eine Aktivierung dieser Sensoren führt an der basalen Seite der Zellen zur Ausschüttung von Signalmolekülen, welche benachbarte Nervenenden aktivieren. Beide Zelltypen beherbergen auch ähnliche intrazelluläre Signaltransduktionselemente (u.a. Phospholipase Cβ2, Inositoltrisphosphat, TRPM5, vgl. Kap.1.1.4) (Roper 2007, Breer et al. 2012, Roper 2013). Die orale und gastrointestinale Nährstoffdetektion wird aufgrund dessen als ein Kontinuum diskutiert (Cummins and Overduin 2007, Reimann et al. 2012). Folglich ist anzunehmen, dass auch für die Detektion von Fettsäuren im Geschmackssystem ähnliche Mechanismen zu finden sind, wie schon für den Gastrointestinaltrakt beschrieben.

Ebenso häuften sich in den letzten Jahren Hinweise auf eine Expression von Süß-, Umami- und Bitterrezeptoren im Gastrointestinaltrakt, die bisher nur als Geschmacksrezeptoren aus dem oralen Geschmacksgewebe bekannt waren (Behrens and Meyerhof 2010, Behrens and Meyerhof 2011). Die Funktion des gastrointestinalen Süßrezeptors ist mittlerweile relativ gut belegt und wird mit der Glukose-vermittelten Freisetzung von Sättigungshormonen, der Expression von Glukosetransportern und somit der Glukosehomöostase in Verbindung gebracht (Iwatsuki et al. 2012, Nakamura et al. 2013, Kokrashvili et al. 2014, Laffitte et al. 2014, Meyer-Gerspach et al. 2014). Weniger gut belegt ist bisher die Funktion der Bitterrezeptoren im Darm. Vermutet wird eine Rolle für die Abwehr toxischer Stoffe, da u.a. Bitterrezeptoren in den schleimproduzierenden Becherzellen des Dickdarms gefunden wurden und möglicherweise für eine erhöhte Schleimproduktion und Ausschleusung von potentiell toxischen Bitterstoffen bzw. Bitterstoff-produzierenden Bakterien verantwortlich sind (Behrens and Meyerhof 2010, Prandi et al. 2013, Depoortere 2014). Aber auch eine metabolische Funktion, u.a. durch ihren Einfluss auf die Glukose-Homöostase, wird für im Darm exprimierte Bitterrezeptoren in Betracht gezogen (Dotson et al. 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte humanes Biopsiematerial von Geschmackspapillen (Wall- und Pilzpapillen) zur Untersuchung der Expression der mRNA der Fettgeschmacksrezeptor-Kandidaten mittels RT-PCR genutzt werden (Kap. 3.1.2). Während die Expression der mRNA der Rezeptoren GPR40 und -41 nicht in den Geschmackspapillen zu finden war, konnte hingegen die Expression der mRNA der Sensoren für langkettige Fettsäuren CD36, KCNA5 und GPR120, sowie der Sensoren für mittel- bzw. kurzkettige Fettsäuren GPR84 und GPR43 in diesen Geweben detektiert werden (Kap.3.1, Abb. 12). Allerdings fand sich die mRNA dieser Rezeptoren auch in Geschmackszell-freiem Zungengewebe. Diese Beobachtung kann aus der Anwesenheit von Muskel- oder Blutzellen in den untersuchten Biopsieproben resultieren, die ebenfalls eine Expression der oben genannten Rezeptoren aufweisen können (vgl. Kap. 3.1.1, Tab. 4). Um herauszufinden, in welchen Zellen eine Expression stattfindet und um Hinweise auf die Proteinexpression der Rezeptoren zu erhalten, wurden immunhistochemische Färbungen mit rezeptorspezifischen Antikörpern auf Gewebeschnitten humaner Wallpapillen durchgeführt (vgl. Kap. 3.1.3, Abb. 13 und Abb. 14).

Hierbei konnte die Expression des G-Protein-gekoppelten Rezeptors GPR120 spezifisch und replizierbar in einem Teil der Zellen der Geschmacksknospen nachgewiesen werden. Die Anwesenheit dieses Rezeptors, sowie die Abwesenheit des Rezeptors GPR40 wurde ebenso durch *In-situ*-Hybridisierungs-Experimente in unserer Abteilung bestätigt (Galindo et al. 2012 und unveröffentlichte Daten). Auch weitere kürzlich veröffentlichte Studien zeigen die Expression des CD36 und GPR120 auf mRNA- bzw. Proteinebene in kultivierten humanen Geschmackszellen (Hochheimer et al. 2014, Ozdener et al. 2014). Ozdener et al. waren gar in Lage in kultivierten humanen Geschmackszellen den Fettsäure-vermittelten intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg zu inhibieren, indem sie die CD36- bzw. GPR120-mRNA-Expression mit Hilfe von RNA-Interferenz (siRNA) unterdrückten (Ozdener et al. 2014). Auch in Nagetieren ist die Expression der mRNA und des Proteins von GPR120 in Geschmackszellen der Wallpapille nachgewiesen (Matsumura et al. 2007, Cartoni et al. 2010, Martin et al. 2012, Ancel et al. 2015). Eine Immunreaktivität des Antikörpers gegen den Fettsäuretransporter CD36 wurde zwar in dieser Arbeit in der Porusregion der Geschmacksknospen beobachtet (vgl. Kap. 3.1.3, Abb. 13F), konnte jedoch nicht durch die Vorinkubation mit dem spezifischen Blockierpeptid des verwendeten Antikörpers in immunocytochemischen Experimenten unterdrückt werden. Somit geben die Ergebnisse keinen zweifelsfreien Hinweis auf die spezifische Expression des CD36-Proteins. Auch ist beschrieben, dass eine Färbung im Porusbereich von Geschmacksknospen oftmals durch unspezifische Ansammlung des Antikörpers hervorgerufen wird (Behrens et al. 2012). Jedoch wurde eine Publikation über die CD36-Proteinexpression in humanen und porcinen Geschmacksknospen von Wallpapillen durch Simons und Kollegen veröffentlicht, bei denen selbiger Antikörper verwendet wurde (Simons et al. 2011). Auch hier zeigte sich lediglich

eine punktuelle Färbung im Porusbereich der Geschmacksknospen. In Nagetierstudien wurde die mRNA und das Protein des CD36 in Geschmackszellen der Maus und Ratte nachgewiesen (Fukuwatari et al. 1997, Gaillard et al. 2008, Martin et al. 2012). Tiere, bei denen die Expression des CD36-Proteins genetisch unterdrückt wird, zeigen auch eine verminderte gustatorische Präferenz für Fettsäurelösungen. Die durch orale Applikation von Linolsäure hervorgerufene Aktivierung des *c-fos*-Gens in Neuronen des NTS ist ebenfalls vermindert (Laugerette et al. 2005, Gaillard et al. 2008). So ist CD36 für Nagetiere, neben GPR120, der bedeutendste Rezeptor für die gustatorische Wahrnehmung von Fettsäuren und ist trotz bislang unzureichender immunhistochemischer Nachweise auch für den Menschen noch immer ein bedeutender Kandidat, dessen Rolle für die humane Fettgeschmackswahrnehmung weiterhin untersucht werden sollte.

Für die anderen Rezeptorkandidaten (GPR43 und GPR84) konnte in dieser Arbeit keine spezifische, replizierbare Färbung unter Verwendung verschiedener Antikörper und Färbeprotokolle erhalten werden (vgl. Kap. 3.1.3, Abb. 13). Dies könnte jedoch auch auf eine zu geringe Sensitivität der getesteten Antikörper zurückgeführt werden, trotz der Anwendung von Amplifikationsmethoden. Somit lässt sich eine Proteinexpression dieser Rezeptoren im Geschmacksgewebe nicht final ausschließen. Es lässt sich weiterhin nicht ausschließen, dass die untersuchten Rezeptorkandidaten in den Blätterpapillen der menschlichen Zunge exprimiert sind, da hierzu aufgrund fehlenden Biopsiematerials keine Untersuchungen durchgeführt werden konnten. Es ist allerdings auch möglich, dass die gefundene mRNA-Expression von GPR43 und GPR84 im Biopsiematerial der Wall- und Pilzpapillen allein auf die Anwesenheit von Blut- und Immunzellen in diesem Gewebe zurückzuführen ist. Trotz der anfänglichen Diskussion dieser Rezeptoren als Fettgeschmacksrezeptorkandidaten, wurden bis heute keine Expressionsdaten dieser Rezeptoren im Geschmacksgewebe von Nagetieren oder des Menschen publiziert³⁵.

GPR40 und GPR41 waren in dieser Arbeit weder auf mRNA- noch auf Proteinebene im Geschmacksgewebe der Pilz- und Wallpapillen des Menschen nachweisbar. Cartoni und Kollegen zeigten eine Expression von GPR40 in Blätter- und Wallpapillen, sowie eine durch genetischen Knock-out hervorgerufene, verminderte Präferenz für Fettsäurelösungen und Aktivierung des Nervus glossopharyngeus in C57BL/6-Mäusen (Cartoni et al. 2010). Allerdings stehen diese Beobachtungen im Widerspruch zu Daten von Besnard und Kollegen, die mehrmals erwähnten und später auch publizierten, dass keine Expression des GPR40 in Wallpapillen in dieser Mausstammlinie zu finden ist (Ancel et al. 2015). Matsumura und Kollegen fanden auch in Wallpapillen der Ratte keine GPR40-Expression (Matsumura et al. 2007). Wie auch schon für GPR43 und GPR84 zuvor erwähnt, wurde eine GPR41-Expression im Geschmacksgewebe nur in Buchveröffentlichungen erwähnt, bis heute jedoch nicht in Originalartikeln gezeigt (Hansen et al. 2006). Auch GPR40 und GPR41 sind in Blut- bzw. Immunzellen exprimiert und können aufgrunddessen im Biopsiematerial vorkommen (vgl. Kap. 3.1.1, Tab. 4).

Generell ist der Nachweis der Expression von Rezeptorproteinen, besonders beim Menschen, mit Schwierigkeiten verbunden. Wie zuvor beschrieben, ist dies durch das Defizit an spezifischen, sensitiven Antikörpern und der schlechten Verfügbarkeit von menschlichem Biopsiematerial des Geschmacksgewebes bedingt. Die aus dieser Arbeit hervorgegangenen Expressionsdaten und die Daten von Simons et al. sind bisher die einzigen Nachweise von fettsäuresensitiven Rezeptoren (GPR120 und CD36) in menschlichem Geschmacksgewebe. Die zusätzlich publizierten Daten von kultivierten Geschmackszellen tragen ebenfalls zur Datenlage bei, sind jedoch mit Vorsicht zu betrachten, da sich über längere Zeit kultivierte Zellen in ihrem Expressionsspektrum ändern können, speziell unter konfluenten Bedingungen (Ozdener et al. 2011).

³⁵ Es wurde zwar eine Expression in einem Posterabstract (Xu et al. 2009) und einer Buchveröffentlichung (Gilbertson et al. 2010) erwähnt, jedoch keine Originaldaten in Peer-Review-Journalen publiziert.

Mit dem Nachweis von fettsäuresensitiven Rezeptoren in humanen Geschmackszellen stellt sich sogleich die Frage, ob die pharmakologischen Eigenschaften der gefundenen Rezeptoren mit Daten aus sensorischen Experimenten aus humanen Probanden zusammenpassen. Tab. 6 gibt eine Übersicht über das Aktivierungsmuster der in dieser Arbeit untersuchten Fettgeschmacksrezeptorkandidaten und dem in sensorischen Studien beschriebenen Wahrnehmungsmuster unter Berücksichtigung der wahrgenommenen Attribute. Nicht nur, dass eine Expression von GPR40 im humanen Geschmackssystem unwahrscheinlich ist, sein pharmakologisches Aktivierungsspektrum für Fettsäuren zwischen C6 und C12 passt auch nicht mit den Ergebnissen der sensorischen Untersuchungen zusammen.

Tab. 6 : Agonistenspektrum und EC₅₀ bzw. IC₅₀-Werte* der untersuchten Fettsäuresensoren im Vergleich zur sensorischen Wahrnehmung von Fettsäuren[#].

Fettsäure		Rezeptor						
		GPR120 ^{1,5}	CD36 ^{6,7,8}	KCNA5 ^{9,10}	GPR40 ^{1,2}	GPR84 ⁴	GPR43 ³	GPR41 ³
LCFA	C16:0 PA	4,28		-	5,30	-	-	-
	C18:0 SA	4,74	Fettsäurebindung im nM-Bereich	-	4,78	-	-	-
	C18:1 OA	4,51	mindestens	-	4,39	-	-	-
	C18:2 LA	>4,3	von C18:1 bis C20:4, aber	1,00-1,15	1,37/5,02	-	-	-
	C18:3 ALA	5,03/6,37	auch Transport	1,17-1,24	>17,5/4,90	-	-	-
	C20:4 AA	kS	von C14:0 und C16:0	1,05-0,98	4,92	-	-	-
	C20:5 EPA	5,55		Inh	5,17	-	-	-
	C22:6 DHA	5,41		Inh	5,37	-	-	-
MCFA & SCFA	<C6	-	-	-	-	1,99-4,10	2,97 µM- >10 mM	
	C6 CaproicA	-	-	-	4,33	>5 mM	3,87	
	C8 CaprylicA	kS	-	-	25,23/4,42	>5 mM	-	
	C10 CapricA	11,93/-	-	-	3,56/4,85	5,34-5,35	-	
	C12 LauricA	-	-	-	4,92	4,98-5,06	-	

[#]Daten aus sensorischen Untersuchungen: grün: „fettig“ <0,5 mM (Ebba et al. 2012, Galindo et al. 2012). gelb: gustatorisch wahrnehmbar, keine Angabe des Attributs (Mattes 2009a, Stewart et al. 2010, Running and Mattes 2014). rot: „kratzig“ bzw. irritierend/bitter ab 0,8 mM (Galindo et al. 2012, Running and Mattes 2014). *Daten aus pharmakologischen Untersuchungen: sofern nicht anders angegeben EC₅₀-Werte in µM. Alle EC₅₀-Werte basieren auf Messungen des intrazellulären Ca²⁺-Anstiegs, nicht jedoch für GPR84, wofür cAMP- und [³⁵S]GTPγS-Bindungsassays genutzt wurden. Für CD36 standen keine EC₅₀-Werte zur Verfügung, Daten basieren auf Fettsäure-Bindungsassays und Fettsäure-Transportassays. Daten für KCNA5 sind IC₅₀-Werte [µM] aus Geschmackszellen der Ratte. ¹(Galindo et al. 2012) ²(Briscoe et al. 2003) ³(Le Poul et al. 2003, Marzo et al. 2004) ⁴(Wang et al. 2006) ⁵(Hirasawa et al. 2005) ⁶(Baillie et al. 1996) ⁷(Guthmann et al. 1999) ⁸(Isenberg et al. 2008) ⁹(Gilbertson et al. 2005) ¹⁰(Wu et al. 2014). kS: keine Sättigung. Akt/Inh: Aktivierung/Inhibierung keine EC₅₀- bzw. IC₅₀-Werte vorhanden. - : inaktiv. LCFA: langkettige Fettsäuren. MCFA: mittelkettige Fettsäuren. SCFA: kurzkettige Fettsäuren.

Mittelkettige Fettsäuren wurden in sensorischen Studien nicht als „fettig“ wahrgenommen bzw. riefen einen „kratzigen“, reizenden oder bitteren Eindruck hervor. Eine Expression in den hier nicht untersuchten Blätterpapillen ist nicht auszuschließen, jedoch aufgrund der sensorischen Daten unwahrscheinlich. Auch der Rezeptorkandidat GPR84, dessen pharmakologisches Spektrum ebenfalls die Fettsäuren C10 und C12 einschließt, ist demnach ebenfalls als Fettgeschmacksrezeptor unwahrscheinlich. Die in Wall- und Pilzpapillen gefundene mRNA resultiert demnach höchstwahrscheinlich wie schon diskutiert aus Blut- oder Immunzellen.

Die Rezeptorkandidaten für kurzkettige Fettsäuren, GPR43 und GPR41, konnten in den Expressionsstudien dieser Arbeit nicht bzw. nur auf mRNA-Ebene gezeigt werden. In psychophysikalischen Studien von Mattes und Kollegen ist zwar eine gustatorische Wahrnehmung kurzkettiger Fettsäuren beschrieben worden, jedoch ist in diesen Studien weder klar, welches Attribut wahrgenommen

wurde, noch sind die Experimente ausreichend auf andere sensorische Eigenschaften kontrolliert gewesen. Die Möglichkeit, dass die Wahrnehmung in diesen Studien auf ein „kratziges“ oder gar bitteres Empfinden und nicht auf einen „fettigen“ Geschmack zurückzuführen ist, ist daher groß. Die gefundene mRNA des Rezeptors GPR43 im Biopsiematerial der humanen Geschmackspapillen lässt wie schon für GPR84 höchstwahrscheinlich auf Blut- oder Immunzellen bzw. Muskelgewebe schließen (vgl. Kap. 3.1.1, Tab. 4).

Somit kommen aufgrund der sensorischen Daten nur die Rezeptoren für langkettige Fettsäuren GPR120, CD36 und KCNA5 als Fettgeschmacksrezeptoren in Frage. Die pharmakologischen Ergebnisse passen bei diesen Rezeptorkandidaten zu den humanen psychophysikalischen Daten. Interessant wären hier allerdings noch sensorische Daten für die Fettsäuren EPA und DHA bzw. Palmitin-(PA) und Stearinsäure (SA). Auch diese müssten bei Vorhandensein der genannten Rezeptoren im Geschmacksgewebe von Probanden als „fettig“ wahrgenommen werden, da u.a. GPR120 ähnliche EC_{50} -Werte für diese Fettsäuren aufweist. Aufgrund der physiologischen Bedeutung der essentiellen Fettsäuren bzw. hohen Aufnahme mit der Nahrung (PA und SA) wäre eine pharmakologische und sensorische Charakterisierung erstrebenswert. Allerdings muss erwähnt werden, dass eine einfache Zell-basierte Charakterisierung aufgrund der physikalischen Eigenschaften dieser Fettsäuren erschwert ist. Palmitinsäure und Stearinsäure weisen eine relativ hohe Schmelztemperatur auf (62,9 °C bzw. 69,0 °C), wodurch die Löslichkeit in Zell-Assays, welche bei maximal 37°C stattfinden können, nicht gegeben wäre. Auch müsste beachtet werden, dass die Temperatur selbst einen Einfluss auf die Geschmackszellaktivierung und das Geschmacksempfinden besitzen kann (Parker 2013, Green and Nachtigal 2015).

Nicht zuletzt wäre aufgrund der Vielfältigkeit der Lipide eine breiter angelegte, nicht nur auf Triglyceride und Fettsäuren beschränkte Untersuchung weiterer Substanzen und ihrer Rezeptoren angebracht. Beispielsweise wäre es interessant, ob auch physiologisch relevante fettlösliche Vitamine, Cholesterolester inklusive Phytosterolen oder auch Phospholipide geschmacklich wahrgenommen werden können und welche Rezeptoren für diese Substanzen in Frage kommen. Die oben beschriebenen Hauptkandidaten der Fettgeschmackswahrnehmung (GPR120, CD36 und KCNA5) müssen nicht zwingend die alleinigen Geschmacksrezeptoren für Lipide sein. Auch für den Bittergeschmack sind etwa 25 menschliche Rezeptoren beschrieben, die eine Vielzahl chemisch diverser Bitterstoffgruppen detektieren, und ebenso werden auch für den Umamigeschmack weitere Rezeptoren als das bisher identifizierte TAS1R1/TAS1R3-Heteromer diskutiert (Chaudhari et al. 2009, Yoshida et al. 2009, Behrens and Meyerhof 2009b, Kusuhara et al. 2013).

4.1.4 GPR120-exprimierende Zellpopulationen ermöglichen sowohl eine fettspezifische Geschmackswahrnehmung als auch eine Modulation anderer Geschmacksqualitäten.

Um eine eigenständige Geschmacksqualität zu bilden, müssen im Rahmen der Geschmackswahrnehmung Fettsäurerezeptoren in einer spezifischen Geschmackszellpopulation zu finden sein, die keine weiteren Geschmacksrezeptoren anderer Qualitäten enthalten. Es sind die sensorischen Zellen an sich, welche die Geschmacksqualität kodieren, während die Rezeptoren das Anregungsspektrum festlegen (Kettenmann et al. 2005, Chandrashekar et al. 2006). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit Koexpressionsuntersuchungen durchgeführt, um zum einen die GPR120 exprimierenden Zellen einem der drei³⁶ bisher beschriebenen Geschmackszelltypen zuordnen zu können

³⁶ Hierbei wurden die Typ-IV oder Basalzellen nicht mitgezählt, da sie vorrangig der Erneuerung von Geschmackszellen und nicht der eigentlichen Geschmackswahrnehmung dienen (vgl. Kap. 1.1.1).

(Typ I - III, vgl. Kap. 1.1.1) und zum anderen, um die Koexpression mit Rezeptoren anderer Geschmacksqualitäten zu untersuchen.

Zunächst war anhand der Ergebnisse festzustellen, dass GPR120-exprimierende Zellen nicht nur einem Zelltyp zugeordnet werden können, da sie entweder den Typ-I-Zellmarker GLAST oder den Typ-III-Zellmarker SNAP-25 exprimieren (vgl. Kap. 3.1.5, Abb. 17A). Mit den Typ-II-Zellmarkern PLC β 2 und PLC β 3 hingegen wurde keine Koexpression beobachtet (vgl. Kap. 3.1.5, Abb. 17A).

Bitter-, Süß- und Umamirezeptoren gehören, wie auch der fettsäuresensitive Rezeptor GPR120, zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und sind in den Typ-II-Rezeptorzellen zu finden (Zhao et al. 2003, Chandrashekar et al. 2006). Aus diesem Grund hätte man auch eine Expression des GPR120 in diesem Zelltyp erwartet, zumal auch sämtliche Moleküle der nach G-Protein-Aktivierung stattfindenden Signaltransduktionskaskade in Typ-II-Zellen exprimiert werden (vgl. Kap. 1.1.4). Im Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnissen für den Menschen zeigten Matsumura und Kollegen in Nagetieren, dass deren GPR120-Protein der Wall- und Pilzpapillen sowohl in PLC β 2-, als auch Gustducin-exprimierenden Typ-II-Zellen lokalisiert ist (Matsumura et al. 2009). Auch Cartoni und Kollegen zeigten eine Kolo-kalisation von GPR120 mit TRPM5 in Mäusen. Auch in unserer Abteilung wurden immunhistochemische Untersuchungen in genmanipulierten Mäusen³⁷ durchgeführt, deren GPR120-exprimierende Zellen den Fluoreszenzfarbstoff tauGFP exprimieren (A. Voigt et al., unveröffentlichte Daten). Immunhistochemische Färbungen zeigten hierbei, dass in den meisten Tieren etwa 4-9 % der Zellen den Typ-II-Marker PLC β 2 exprimieren, wobei einzelne Tiere keine Koexpression aufwiesen. Der Hauptteil der GPR120-tauGFP-Zellen (53-81%) exprimierte den Typ-III-Zellmarker AADC. Eine Koexpression mit NTPDase II, einem Typ-I-Zellmarker erwies sich auch hier als schwierig zu beurteilen, lässt eine Koexpression jedoch nicht ausschließen.

Andere Geschmacksqualitäten wiederum werden tatsächlich von Typ-I- bzw. Typ-III-Zellen vermittelt. So wird bei Nagetieren die Sauergeschmackswahrnehmung mit Typ-III-Zellen und die Salzgeschmackswahrnehmung mit Typ-I-Zellen in Verbindung gebracht (Huang et al. 2006, Huang et al. 2008a, Chandrashekar et al. 2010, Chaudhari and Roper 2010). Matsumura et al. fanden, dass in Mäusen nur 2,6 % der GPR120-exprimierenden Zellen den Typ-III-Zellmarker NCAM exprimieren. Hingegen verweisen Gilbertson und Kollegen auf unveröffentlichte Daten von Mäusen, die zeigen sollen, dass Lipid-responsive Geschmackszellen sowohl PLC, als auch den Typ-III-Zellmarker SNAP-25 exprimieren (Gilbertson and Khan 2014), welcher auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde und eine Koexpression mit GPR120 im Menschen zeigt. Auch Hochheimer und Kollegen charakterisierten humane kultivierte Geschmackszellen (HCT-8) *in vitro* hinsichtlich ihres Genexpressionsmusters. Hierbei fanden sie ebenfalls Zellen, die sowohl GPR120 als auch SNAP-25 exprimieren. Allerdings exprimierte diese Zelllinie nahezu alle Geschmacksrezeptoren (TAS2Rs, TAS1Rs) sowie den Sauerzellmarker PKD2L1/PKD1L3 und weitere Typ-II-Zellmarker. Es ist daher stark anzunehmen, dass diese Zelllinie nicht dem *in vivo* vorkommenden Expressionsmuster bzw. einer Mischzelllinie entspricht. Interessanterweise wurde zwar in der Maus keine Expression von GPR120 in Typ-I-Zellen gezeigt, jedoch beobachteten Cartoni et al. die Expression des fettsäuresensitiven Rezeptors GPR40 in Typ-I-Zellen der Maus (Cartoni et al. 2010). Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist GPR40 nicht in humanen Geschmacksknospen zu finden. Es ergibt sich somit die Frage, ob beim Menschen zwar kein GPR40 in Typ-I-Zellen, aber an Stelle dessen nun GPR120 in den Typ-I-Zellen vorkommt. Aufgrund der hier vorgestellten Daten für den Menschen und die Maus ergeben sich vermutlich Speziesunterschiede bezüglich des GPR120-exprimierenden Zelltyps.

³⁷ GPR120-IRES-Cre-Mäuse; Dr. Anja Voigt (Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Potsdam) in Kooperation mit Dr. Ulrich Boehm (Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Hamburg, aktuell Universität des Saarlandes, Homburg)

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Zellen mit angefärbtem GPR120-Protein lassen sich morphologisch in zwei Typen teilen. Zum einen fanden sich eher spindelförmige Zellen mit relativ großem Zellkern, die einem Typ III oder Typ II der Geschmackszellen zugeordnet werden können. Sie exprimierten hauptsächlich SNAP-25, gehören demnach dem Typ III an. Zum anderen zeigten GPR120-positive Zellen eine der Typ-I-Zelle entsprechende Morphologie, die weniger gut von anderen Zellen abzugrenzen ist, da sie sich lamellenartig um diese herumwinden. Eben diese Zellen exprimierten auch hauptsächlich den Typ-I-Zellmarker GLAST. Untersuchungen zur Koexpression von Geschmacksrezeptoren mit Typ-I-Zellmarkern finden sich in der Literatur äußerst selten, da sich, wie beschrieben, die Abgrenzung dieser Zellen schwierig gestaltet. Besonders die Bestimmung von Zellzahlen ist bei Zellen mit Typ-I-artiger Morphologie schwierig. Trotzdem wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die Anzahl der verschiedenen Zelltypmarker-exprimierenden Zellen und der GPR120-Zellen zu bestimmen. Dabei ergab sich, dass etwa 60% der GPR120-Zellen den Typ-I-Marker GLAST exprimieren und 75% der GPR120-Zellen den Typ-III-Marker SNAP-25. Hingegen wurden keine PLC β -positiven Typ-II-Zellen unter den GPR120-Zellen gefunden. Geht man davon aus, dass sich alle Zellen einer Geschmacksknospe jeweils nur einem einzigen Typ zuordnen lassen, müssten sich alle GPR120-Zelltypen zusammen auf 100% aufteilen. Nun ergeben 60% Typ-I-Zellen und 75% Typ-III-Zellen zusammen allerdings 135%, so dass von einem gewissen Fehler bei der Auszählung der Zellen aufgrund ihrer Typ-I-Morphologie ausgegangen werden muss. Korrigiert man sämtliche Zellzahlen um diesen Fehler³⁸, erhält man etwa 45% GPR120-Typ-I-Zellen und 55% GPR120-Typ-III-Zellen (vgl. Tab. 7).

Tab. 7: Korrigierte Auszählung der Kofärbungen von GPR120 und Zelltypmarkern.

Die falsch-positive Fehlerquote aufgrund der Typ-I-ähnlichen Morphologie der GPR120-Zellen würde 26% betragen³⁹, wenn davon ausgegangen wird, dass alle GPR120-Zellen der Typen I, II und III in Summe 100% ergeben.

Marker/Geschmacksrezeptor	Anzahl Zellen je Knospenquerschnitt			Anteil [%] der GPR120-positiven Zellen
	Marker & GPR120 (gelb)	Marker allein (grün)	GPR120 allein (rot)	
GLAST (Typ I)	5,0	9,6	6,1	45,0
PLC β 2 (Typ II)	0,0	6,8	8,8	0,0
PLC β 3	0,0	4,8	10,5	0,0
SNAP-25 (Typ III)	5,4	7,1	4,4	55,0
Summe				100
TAS1R1 (umami)	0,9	0,3	8,4	10,0
TAS1R2 (süß)	0,2	3,1	7,4	3,0
TAS1R3 (umami + süß)	0,0	4,6	9,6	0,0
TAS2R38 (bitter)	0,0	4,8	9,7	0,0

Aufgrund fehlender funktioneller Antikörper bzw. der noch unbekanntenen Rezeptoren konnten keine Untersuchungen zur Koexpression mit „Sauer“- bzw. „Salz“-Zellmarkern durchgeführt werden, daher ist unklar, ob GPR120 mit Rezeptoren für diese Geschmackqualitäten koexprimiert ist. Es ist jedoch auch keine bzw. nur geringere (bis zu 10%) Koexpression mit Geschmacksrezeptoren der Qualitäten süß, umami oder bitter gefunden worden. Allerdings ist zu beachten, dass für diese Ar-

³⁸ Der Fehler wurde unter der Annahme berechnet: Typ-I-GPR120-Zellen + Typ-II-GPR120-Zellen + Typ-III-GPR120-Zellen = 100% und es gäbe keine Überlappung von Typ I, II und III Zellen. Es wurden keine Typ-II-GPR120-Zellen gefunden. Das Verhältnis von Typ-I-GPR120-Zellen zu Typ-III-GPR120-Zellen wurde beibehalten: 60% : 75% = 4:5 = 0,8. Demnach errechnet sich für eine Summe von 100%: 0,8 ~ 45% : 55%. So dass nach Abzug des Fehlers (des Anteils falsch positiver Zellen) noch 45% Typ-I-GPR120-Zellen und 55% Typ-III-GPR120-Zellen verbleiben. Entsprechend wurden die Zellzahlen extrapoliert. Die Fehlerquote beträgt 26% (135%*0,26=35% bzw. 135%*0,74=100%)

³⁹ Nach den obigen Annahmen und Berechnungen beträgt die Fehlerquote 26% (135%*0,26 = 35% bzw. 135%*0,74 = 100%).

beit nur für einen (TAS2R38) der 25 Bitterrezeptoren ein funktioneller Antikörper zur Verfügung stand und nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine Koexpression mit den übrigen TAS2Rs möglich ist. Diese ist dennoch sehr unwahrscheinlich, da Bitterrezeptoren in PLC β 2-positiven Zellen zu finden sind, in denen jedoch hier kein GPR120 exprimiert wurde. Ein kleinerer Teil der GPR120-positiven Zellen (etwa 0,2-0,9 von durchschnittlich 9 Zellen) exprimieren hingegen auch TAS1R1 oder TAS1R2 und sind damit nicht spezifisch auf eine Geschmacksqualität festgelegt. Welchem Zelltyp jene Zellen angehören, lässt sich anhand der in dieser Arbeit erhobenen Daten nur spekulieren. In der Literatur finden sich bisher keine Zellfärbungen, die Hinweise auf eine Zellpopulation von Typ-II-Zellen geben, die weder PLC β 2 noch PLC β 3 exprimieren. Es gibt jedoch Hinweise aus Einzelzell-Calciumimaging-Experimenten von Tomchik und Kollegen, die zeigen, dass es in der Maus durchaus Typ-II-Zellen gibt, die auf Stimuli verschiedener Geschmacksqualitäten reagieren (Tomchik et al. 2007). In einer späteren Genexpressionsanalyse von Einzelzellen zeigten Dando und Kollegen eine Subpopulation von Typ-II-Zellen, welche mRNA von Rezeptoren verschiedener Geschmacksqualitäten in einer Zelle exprimieren (u.a. Tas1r1, Tas1r2, Tas1r3 und Tas2r105) (Dando and Roper 2012). Auch die Mehrzahl der präsynaptischen Typ-III-Zellen zeigte in diesen Experimenten eine Aktivierung durch mehrere Stimuli. Präsynaptische Typ-III-Zellen reagierten dabei auf ein bis sieben Stimuli (durchschnittlich auf 2,8), aber auch rund 20% der Typ-II-Zellen wurden durch zwei oder drei verschiedene Stimuli aktiviert. Auch Kusuhara und Kollegen zeigten Expressionsdaten, die auf eine Koexpression von Tas1r1 und Tas1r2 in einzelnen Zellen hinweisen (Kusuhara et al. 2013). Sie fanden auch einzelne Zellen die die süß- und umami-spezifische Rezeptoruntereinheit exprimieren, nicht jedoch die Tas1r3-Untereinheit.

Ob diese Subpopulationen von Zellen, die mehr als eine Geschmacksrezeptorart exprimieren, als Zellen mit einer geschmacksmodulierenden Funktion einzustufen sind, ist bisher nur Spekulation und kann anhand der bisherigen Informationen aus der Literatur nicht abschließend beurteilt werden. Es könnte sich ebenso um Zellen handeln, welche zum beobachteten Zeitpunkt noch nicht ausdifferenziert sind. Hierzu könnte auch das Expressionsmuster der proliferierenden, sich nicht im ausdifferenzierten Zustand befindlichen HCT-8-Zellen von Hochheimer und Kollegen zählen, welche ebenso nahezu die gesamte Palette an Geschmacksrezeptoren, Signalmolekülen und Zelltypmarkern exprimieren (Hochheimer et al. 2014).

Zusammenfassend lässt sich für den Menschen festhalten, dass GPR120-Zellen sowohl Typ-I- als auch Typ-III-Zellen darstellen. Über eine spezifische Subpopulation, welche keine anderen Geschmacksrezeptoren exprimiert, lassen sich jedoch noch keine abschließenden Aussagen treffen. Zwar weisen die Mehrzahl der GPR120-Zellen keinen Süß-, Umami- oder TAS2R38-Bitterrezeptor auf, doch wäre eine Koexpression mit Salz- und Sauerrezeptoren weiterhin möglich. Es ist festzustellen, dass sowohl humane Daten zum GPR120-Zelltyp Unterschiede zu den Daten in Nagetieren aufweisen, als auch Diskrepanzen in den verschiedenen Studien in Mäusen bestehen. Ursache können Speziesunterschiede, unterschiedliche Mauslinien oder auch die Verwendung unterschiedlicher Zellmarker sein. Die Verwendung von nicht differenzierten Zelllinien trägt vermutlich ebenfalls zur Heterogenität der Daten bei. Weiterführende Untersuchungen sind hierbei hinsichtlich der GPR120-Koexpression im Speziellen, aber im Allgemeinen auch einer komplexeren Untersuchung von Geschmackszell-Subpopulationen angebracht.

4.1.5 Die Untersuchung der neuronalen Weiterleitung von Fettgeschmacksinformationen mit dem Antagonisten A-31749 schließt vermutlich eine P2X₃-vermittelte, nicht jedoch eine P2X₂-vermittelte Weiterleitung von Geschmacksinformationen aus.

Lösen Nahrungsstoffe eine Geschmackswahrnehmung aus, so müssen Geschmacksinformationen von den Geschmackszellen auf afferente gustatorische Nervenfasern übertragen werden. Finger und Kollegen zeigten, dass bei Mäusen eine ATP-vermittelte Weiterleitung zugrunde liegt, bei der durch ATP aktivierte P2X-Rezeptoren eine Rolle spielen (Finger et al. 2005). Diese Rezeptoren werden aus Mono- und Heteromeren von P2X₂- und P2X₃-Proteinen gebildet. Finger und Kollegen zeigten mittels Präferenztests mit Tieren, denen durch gentechnische Manipulation eines (P2X₂- oder P2X₃-Einzelknockout) oder beide Proteine (Doppelknockout) fehlten, dass bei Doppelknockout-Tieren die Geschmackweiterleitung der Geschmacksqualitäten süß, bitter, sauer und salzig beeinträchtigt ist (Finger et al. 2005, Eddy et al. 2009, Kinnamon and Finger 2013). Finger und Kollegen diskutierten ebenfalls, dass das P₂X₃-Protein hierbei eine Hauptrolle spielt.

In der vorliegenden Arbeit sollte aufgrund dieser Daten auch für die Fettwahrnehmung untersucht werden, ob diese gustatorisch ebenfalls über P2X-Rezeptoren vermittelt wird. Diese Experimente können derzeit nicht am Menschen durchgeführt werden, so dass hier auf die Maus als Modellorganismus zurückgegriffen wurde (Kap. 3.3). Da P2X-Knockout-Tiere aufgrund einer hohen Sterblichkeit der neugeborenen Jungtiere nur schwer zu züchten sind, sollte auf die Verwendung eines P2X₃-Antagonisten zur Inhibierung der Weiterleitung von Geschmacksinformationen zurückgegriffen werden. Jarvis und Kollegen publizierten eine spezifische Inhibition von P2X₃-Rezeptor-vermittelten Schmerzempfindungen durch die Substanz A-31749 (McGaraughty et al. 2003, Jarvis et al. 2004). Dieser P2X₃- bzw. P2X_{2/3}-spezifische Antagonist wurde in der vorliegenden Arbeit im Rahmen von Kurzzeit-Präferenztests verwendet. Es wurde der Einfluss auf die Präferenz von Saccharose als Kontrollstimulus und Linolsäure untersucht (vgl. Kap. 3.3). Hierbei zeigte sich jedoch überraschenderweise, dass der Antagonist weder in der Lage war, die Präferenz für Saccharose, noch für Linolsäure zu vermindern (vgl. Kap. 3.3.2, Abb. 35). Da die pharmakologische Intervention mit A-31749 zuvor noch nicht für eine Untersuchung von Geschmackswahrnehmungen verwendet wurde, stellte sich die Frage, ob dieser im Geschmackssystem ebenso wirksam wie im Bereich des Schmerzempfindens ist, oder ob die pharmakologischen Parameter (Inkubationszeit und Konzentration) angepasst werden müssen. Allerdings hatte weder die Erhöhung der Inkubationszeit von 30 auf 90 min, noch die erhöhte Konzentration (von 30 auf 100 nmol/g KG) einen Einfluss auf die Präferenz von Linolsäure (Kap. 3.3.3, Abb. 36). Im nächsten Schritt wurde eine zusätzliche Geschmacks-substanz an einer kleinen Gruppe von Tieren getestet, um zu sehen, ob der Antagonist eine Wirkung auf die Bitterwahrnehmung von Denatoniumbenzoat besitzt. In der Tat zeigte sich hier eine verminderte Aversion der Tiere gegenüber der Bittersubstanz durch die Intervention mit dem P2X₃-spezifischen Antagonisten (Kap. 3.3.3, Abb. 37).

Es ergibt sich nun die Frage, warum der P2X₃-spezifische Antagonist einen Einfluss auf die Bitterwahrnehmung, nicht jedoch auf die Wahrnehmung der attraktiven Substanzen Saccharose und Linolsäure zeigt. Hierbei ergaben sich zwei Vermutungen. Zum einen könnte die Wirksamkeit des Antagonisten im Geschmackssystem nicht ausreichend für die Unterdrückung aller Geschmacksinformationen sein. So ist kürzlich in der Veröffentlichung über einen neuen P2X₃-Antagonisten erwähnt, dass zuvor genutzte Moleküle eine geringe Wirksamkeit, Selektivität oder auch Permeabilität aufweisen (Gever et al. 2010). Zum anderen ergab sich nach Betrachtung der im Supplement von Finger et al. vorhandenen Daten der P2X-Einzelknockout-Tiere die Hypothese, dass Geschmacksinformationen verschiedener Substanzen in diverser Art über die P2X₂- oder P2X₃-Rezeptoren ver-

mittelt werden könnten. Hierzu lässt sich in Abb. 39 erkennen, dass die Tiere, bei denen nur der P2X₃-Rezeptor fehlte, dennoch in der Lage waren, süße Substanzen (Saccharin und Saccharose) genauso wahrzunehmen wie Wildtyptiere. Somit scheint eine Vermittlung der Geschmacksinformation einzig über den P2X₂-Rezeptor möglich. Hingegen ist für die Vermittlung von Geschmacksinformationen für Denatonium und den Süßstoff SC45647 besonders der P2X₃-Rezeptor verantwortlich, da P2X₃-Knockout-Tiere ein verändertes Verhalten im Vergleich zu Wildtyptieren zeigen. Der Knockout des P2X₂-Rezeptors hat beispielsweise für die Wahrnehmung des Süßstoffs SC45647 keine Bedeutung (Abb. 39).

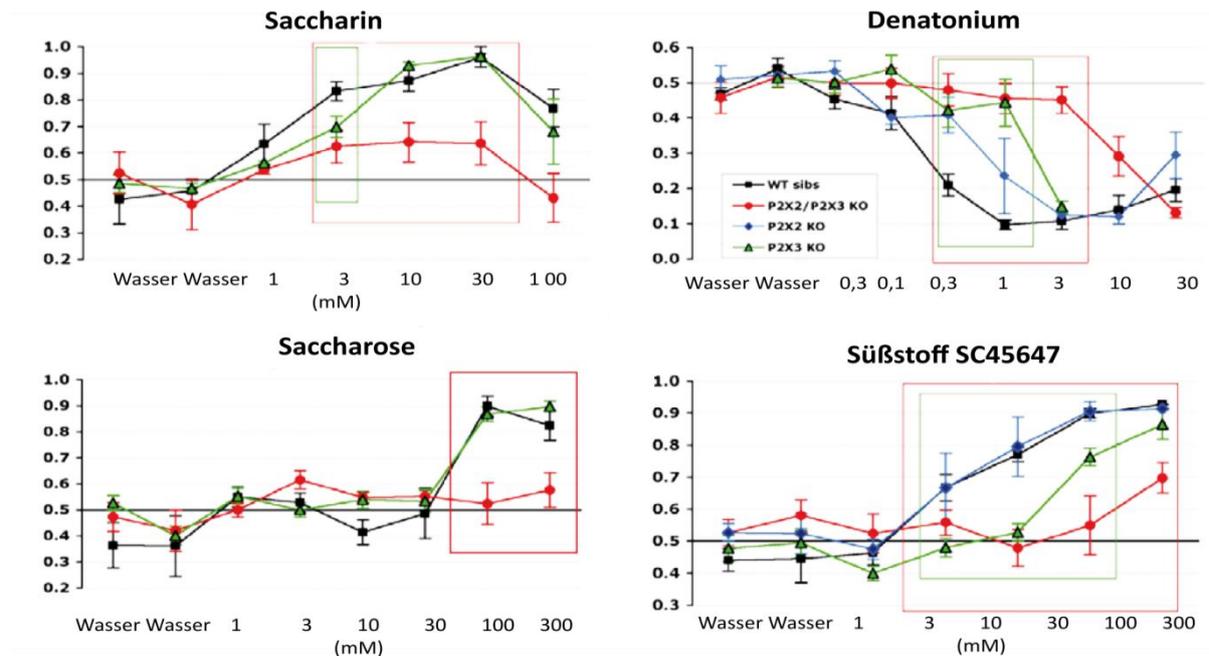


Abb. 39 Geschmackspräferenz von P2X₂/P2X₃-Einzel- und Doppelknockout-Tieren gegenüber Saccharose und Denatonium (entnommen aus dem Supplement von (Finger et al. 2005)). Daten aus einem Zwei-Flaschen-Präferenztest mit den Süßsubstanzen Saccharin, Saccharose und SC45647, sowie dem Bitterstoff Denatonium. Die Attraktivität der Süßstoffe bzw. Aversivität gegenüber Denatonium zeigt sich bei den Wildtyptieren (schwarz), und ist bei den Doppelknockout-Tieren stark vermindert (rot). P2X₃-Einzelknockout-Tiere (grün) zeigen zwar eine verminderte Aversion gegenüber Denatonium ab 3 mM und SC45647 bis 100 mM, weisen jedoch keine verminderte Attraktivität von Saccharose und Saccharin auf (grüne Linie entspricht der schwarzen wt-Linie). P2X₂-Einzelknockout-Tiere (blau) zeigen eine leicht verminderte Aversivität gegenüber Denatonium, Daten zu Saccharose sind für die P2X₂-Einzelknockout-Tiere nicht gezeigt. Somit sind Mäuse in der Lage, Saccharin und Saccharose einzig über den P2X₂-Rezeptor wahrzunehmen.

Somit ist festzuhalten, dass eine differenzierte Betrachtung bei der Weiterleitung von Geschmacksinformationen verschiedener Substanzen über P2X-Rezeptoren nötig ist und spezifischer untersucht werden sollte. Für die Ergebnisse dieser Arbeit bedeutet dies, dass eine spezifische Inhibierung der Geschmackweiterleitung über den P2X₃-Rezeptor unter Umständen keine Wirkung auf die Wahrnehmung von Saccharose hat. Somit kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass, wenn für Saccharose zutreffend, auch für Linolsäure eine Weiterleitung von Geschmacksinformationen einzig über den P2X₂-Rezeptor möglich wäre. In kürzlich veröffentlichten Studien ist dem P2X₂-Rezeptor ebenfalls eine stärkere Bedeutung bei der Geschmacksinformationsweiterleitung zugesprochen worden als zuvor (Huang et al. 2011). Allerdings wurde kürzlich ebenfalls gezeigt, dass ein neuer P2X₃-Antagonist (AF-353) (Gever et al. 2010) in der Lage ist, die Weiterleitung von Geschmacksinformation für alle Geschmacksrichtungen zu inhibieren (Vandenbeuch et al. 2014). Hierbei zeigte sich für sämtliche Geschmacksstimuli (bitter, süß, sauer und salzig) eine Inhibierung

der Chorda-tympani-Aktivierung. Hinsichtlich der Wirkung des Antagonisten AF-353 im Kurzzeit-Präferenztest nach pharmakologischer Intervention wurden jedoch auch in dieser Veröffentlichung nur Daten zum Einfluss auf die Wahrnehmung des Süßstoffs SC4567 gezeigt, nicht jedoch für Saccharose oder Saccharin. Huang und Kollegen zeigten weiterhin, dass P2X-Rezeptoren nicht nur postsynaptisch vorkommen, sondern auch in den Geschmacksknospen selbst (Huang et al. 2011). Sie zeigten auch das Vorkommen weiterer P2X-Rezeptoren (P2X₄ und P2X₇), welche die Zusammenhänge der P2X-vermittelten Weiterleitung von Geschmacksinformationen noch komplexer gestalten (Huang et al. 2011). Außerdem wiesen sie einen durch den P2X₂-Rezeptor-vermittelten autokrinen, positiven Rückkopplungsmechanismus nach, der die ATP-Sekretion der Geschmackszellen verstärkt (Huang et al. 2011).

Sclafani und Kollegen konnten mittlerweile eine Beteiligung der P2X-Rezeptor-vermittelten Wahrnehmung von Fettemulsionen zeigen. So erwies sich für P2X₂/P2X₃-Doppelknockout-Tiere, dass diese eine verminderte Präferenz gegenüber Intralipid-Lösungen zeigen (Sclafani and Ackroff 2014). Somit ist bei der Fettwahrnehmung bei Nagetieren, wie auch bei der Wahrnehmung anderer Geschmackssubstanzen eine Weiterleitung über gustatorische Nervenfasern anzunehmen.

4.1.6 Die gustatorische Wahrnehmung von Fettsäuren kann mit einem evolutiven und gesundheitlichen Vorteil assoziiert werden.

Signalmechanismen, die keinerlei Funktion besitzen, würden während der Evolution nicht erhalten bleiben (Tucker and Mattes 2012). Für den Menschen, wie auch für Nagetiere, würde eine gustatorische Wahrnehmung von Fett oder seiner Bausteine, der Fettsäuren, aufgrund ihrer physiologischen Bedeutung, in Form der Energiebereitstellung und Funktion essentieller Fettsäuren, einen Sinn ergeben. Außerdem existieren für die beiden Hauptnährstoffe Kohlenhydrate und Proteine, in Form des Süß- und Umamigeschmacks, ebenfalls ein gustatorischer Detektionsmechanismus (vgl. Kap 1.1.3). Daher ist anzunehmen, dass auch für den dritten wichtigen Hauptnährstoff Fett ein solcher Mechanismus existent ist. Die Detektion von Lipiden, und mehr noch, die spezifische geschmackliche Detektion von essentiellen Fettsäuren, würde Mensch und Tier nicht nur einen evolutiven Vorteil durch einen besseren Gesundheitsstatus und damit einer besseren Überlebenschance verschaffen. Es wird ebenfalls diskutiert, dass die menschliche Ernährung, welche im Vergleich zu anderen Primaten eine höhere Energiedichte und einen höheren Fettanteil besitzt, eine Voraussetzung für die Entstehung unseres hochentwickelten, aber enorm energieverbrauchenden Gehirns bildete (Leonard et al. 2010). Im Vergleich zu anderen Säugetieren nehmen wir größere Mengen an wichtigen langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren auf, die für die Hirnentwicklung entscheidend sind (Crawford et al. 1999, Cordain et al. 2001). Es wird vermutet, dass dieser Umstand unsere Fähigkeit gefördert hat, fettreiche Nahrungsmittel zu erkennen und gegenüber anderen Nahrungsmitteln zu bevorzugen (Leonard et al. 2010). Zudem hat die Fettaufnahme nicht nur eine Bedeutung für die evolutive Hirnentwicklung, sondern stellt auch einen wichtigen Faktor für die Hirnentwicklung des Fetus, des Neugeborenen und des Kleinkinds dar. Auf der einen Seite besitzen Babys und Kleinkinder die höchsten Körperfettanteile, was sich mit der Phase des höchsten Energiebedarfs des Gehirns deckt (Leonard et al. 2010). Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass zum Beispiel Docosahexaensäure (DHA) äußerst wichtig für die visuelle und kognitive Entwicklung ist, sowohl vor als auch nach der Geburt (Kremmyda et al. 2011).

Neben dieser spezifischen Rolle besitzen Fettsäuren weitere Funktionen, hauptsächlich als Strukturkomponenten, aber auch als pro- und anti-inflammatorische Vorstufen von Eicosanoiden und Faktoren, die angiologische, onkologische oder neurologische Krankheiten beeinflussen können (kürzlich ausführlich beschrieben durch Pelliccia et al. (2013) und Kremmyda et al. (2011)). Diese Bedeutung äußert sich auch durch das Auftreten einer Reihe von Störungen, welche als Syndrom

eines Defizits an essentiellen Fettsäuren (engl.: *Essential Fatty Acid Deficiency Syndrome*) zusammengefasst werden. Hierzu gehören unter anderem Wachstums-, Herz- und neurologische Störungen, Unfruchtbarkeit, Hautdysfunktionen und Defizite im Immunsystem (Kremmyda et al. 2011, Pelliccia et al. 2013).

Andererseits ist neben der Detektion von Fetten aufgrund ihrer positiven Wirkungen und damit einer Attraktivität, auch eine Funktion der oralen Wahrnehmung von Fetten und Fettsäuren denkbar, welche zur Vermeidung der Aufnahme aufgrund von negativen Wirkungen dient. Die für Fettsäuren beschriebene Bitterkeit bzw. Kratzigkeit bei höheren (zytotoxischen) Konzentrationen oder durch ranzige Fette führt zu einer Aversion und somit Vermeidung der Aufnahme aufgrund von protektiven Mechanismen (Tucker and Mattes 2012). Nichtsdestoweniger werden fettreiche Nahrungsmittel weitestgehend mit einer Attraktivität assoziiert, aber es gibt ebenso die Beobachtung, dass Menschen aversive Stimuli überwinden oder gar eine Attraktivität hierfür entwickeln können, wie es zum Beispiel für Bitterstoffe in Bier, Kaffee oder Schokolade beschrieben ist (Galindo et al. 2012). Schlussendlich wäre mit der funktionellen Grundlage, im Sinne einer Detektion von energiereicher, essentielle Fettsäuren enthaltender Nahrung, das letzte Kriterium, die Funktion, für die Existenz eines Fettgeschmacks beim Menschen erfüllt⁴⁰.

4.1.7 „Fettgeschmack“ und „fettig“ als eigenständige Geschmacksqualität?

Anhand der zu Beginn aufgeführten Kriterien und nachfolgenden Diskussion, lässt sich feststellen, dass für die Mehrheit der Kriterien, die zur Definition einer Geschmacksqualität erfüllt werden müssen, Hinweise für das Vorkommen einer Fettgeschmackskomponente aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und publizierten Daten für den Menschen bestehen. Eine kurze Zusammenfassung gibt Abb. 40. Die Datenlage für die humane Fettgeschmackswahrnehmung verbesserte sich in den letzten Jahren enorm, wenn auch für Nagetiere noch immer weitaus mehr Ergebnisse vorliegen. Während für Nagetiere Hinweise auf eine Transmission von Fettgeschmacksinformation über gustatorische Nerven und eine Verarbeitung in gustatorischen Hirnregionen besteht, ist dies für den Menschen jedoch noch nicht belegt. Für alle anderen Kriterien existieren nunmehr durch oben beschriebene Daten dieser und anderer Arbeiten gute Belege. Daher ist auch für den Menschen eine Wahrnehmung von Fetten, speziell Fettsäuren, über eine Geschmackskomponente sehr wahrscheinlich.

Allerdings bleibt noch offen, ob diese Fettgeschmackskomponente zu den Grundgeschmacksqualitäten gezählt werden kann, da sie sich von diesen doch vielfältig unterscheidet. Unterschiede zeigen sich hier beispielsweise in der vermutlichen Textur-Abhängigkeit, dem komplexeren Expressionsmuster des Fettsäuresensors GPR120 in den Geschmackszellen und außerhalb der Geschmacksknospen, sowie der Problematik, das Attribut „fettig“ bei sensorisch untrainierten Probanden im Sprachgebrauch, getrennt von einer Texturbeschreibung, wie cremig oder viskös, zu etablieren.

Möglicherweise hat jedoch die orale Detektion von Fettsäuren und damit einhergehende Aktivierung von GPR120 nicht nur eine Bedeutung im Rahmen gustatorischer Mechanismen. Es ließen sich auch andere oder zusätzliche Funktionen vermuten. Diese sollen im folgenden Kapitel kurz aufgezeigt werden.

⁴⁰Nach Tucker und Mattes gibt es generell keine Möglichkeit die vermuteten Funktionen von Geschmacksqualitäten klar experimentell aufzuzeigen. Es könne lediglich eine (spekulative) Zuordnung für jede einzelne der Geschmacksqualitäten gemacht werden (Tucker and Mattes 2011). So trifft dies auch auf die hier beschriebenen Funktionen für die potentielle Geschmacksqualität „fettig“ zu.

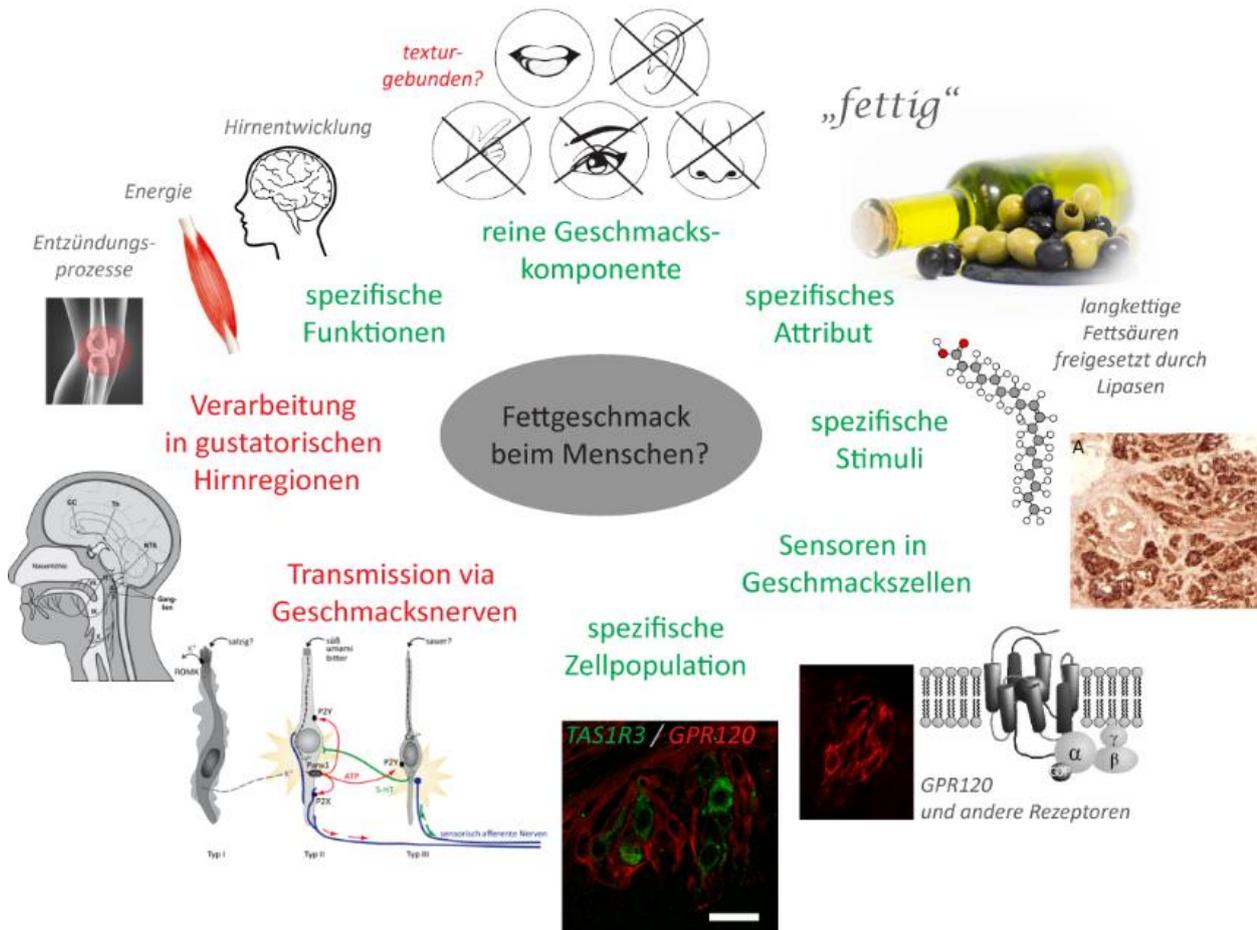


Abb. 40: Kriterien für die Geschmackswahrnehmung und Zusammenfassung der Datenlage für die humane Fettgeschmackswahrnehmung. Damit eine Geschmacksqualität im Allgemeinen und die Wahrnehmung eines Fettgeschmacks im Speziellen vorliegt, müssen eine Reihe von Kriterien erfüllt sein (Mattes 2011a, Tucker and Mattes 2012). Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse und Daten aus der Literatur geben Hinweise, die für die Erfüllung einer Reihe dieser Kriterien sprechen (grün). Dennoch gibt es für einige der Kriterien zwar Hinweise aus Nagetierstudien, aber noch keine (rot) oder keine finalen (bezüglich der spezifischen Zellpopulation) Daten für den Menschen.

4.2 Potenzielle alternative Funktionen des fettsäuresensitiven Rezeptors GPR120 im Geschmackssystem

Der erst 2003 von Frederiksson und Kollegen als Sensor für langkettige Fettsäuren beschriebene G-Protein gekoppelte Rezeptor GPR120 ist mittlerweile außer im Gastrointestinaltrakt in einer Vielzahl weiterer Gewebe nachgewiesen worden (u.a. Fettgewebe, Pankreas, Leber, Makrophagen und Hypothalamus) (Fredriksson et al. 2003, Ulven and Christiansen 2015). Dort erfüllt er vielfältige Funktionen, die ihn vor allem in Verbindung mit inflammatorischen Prozessen und metabolischen Regulationsmechanismen bringen (Ulven and Christiansen 2015). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich der Fettsäuresensor GPR120 nicht nur in Typ-I- und Typ-III-Geschmackszellen, sondern auch in nicht-gustatorischen Epithelzellen der Wallpapille und in den Drüsenzellen der Von-Ebner-Speicheldrüsen findet (Kap. 3.1.7). Ebenso ist eine Expression des Rezeptors an trigeminalen Nervenfasern in der Literatur beschrieben (Gilbertson et al. 2010, Yu et al. 2012). Die genauen Funktionen in diesen Geweben lassen sich derzeit nur vermuten, sind jedoch möglicherweise ebenso vielfältig. So diskutieren Besnard und Kollegen, dass CD36 der eigentliche Fettsäure-Geschmacksrezeptor ist, wohingegen der Rezeptor GPR120 bei Nagetieren weniger der Detektion von Geschmacksinformationen dient, als vielmehr der Regulation der Geschmackssensitivität und

der Expressionslevel des fettsäuresensitiven Transporters CD36 (Ancel et al. 2015). Als zugrunde liegenden Mechanismus vermutet man eine Ausschüttung des Peptidhormons GLP-1 und die Aktivierung von GLP-1-Rezeptoren in den Geschmacksknospen. GLP-1 und GLP-1-Rezeptoren wurden in Geschmacksknospen von Mäusen nachgewiesen und auch eine Kolo-kalisation von GLP-1 und GPR120 wurde gezeigt (Shin et al. 2008). Bei Tieren, deren GLP-1 kodierende Gensequenz unterbrochen ist und somit kein GLP-1 exprimiert werden kann, ist der Detektionsschwellwert für Lipide beeinträchtigt (Martin et al. 2012). Tatsächlich erwies sich, dass GPR120 an der Lipid-vermittelten Freisetzung von GLP-1 beteiligt ist, und auch, dass die Regulation von CD36 durch GLP-1 moduliert werden kann (Martin et al. 2012). Ebenso wurde gezeigt, dass langkettige Fettsäuren in der Lage sind, die GLP-1-vermittelte Erhöhung der Süßgeschmackssensitivität zu beeinflussen (Shin et al. 2008, Martin et al. 2012). Desweiteren ist GLP-1 in der Lage die Sauergeschmackssensitivität zu senken (Shin et al. 2008).

Neben dieser relativ gut belegten Hypothese, ließe sich auch eine Verbindung zwischen der oralen Detektion von Fettsäuren, dem fettsäuresensitiven Rezeptor GPR120 und dem Belohnungssystem sowie dem Opioid-, Endocannabinoid- und dopaminergen/serotonergen Systemen spekulieren. Nahrungsfette bzw. fettreiche Nahrungsmittel besitzen eine hohe Attraktivität für Säugetiere und den Menschen (Gaillard et al. 2008). Es wird gar angenommen, dass Nahrungsfette eine Art Begierde oder Sucht auslösen (Nogueiras et al. 2012). So ist belegt, dass das Opioidsystem über die Aktivierung von μ -Opioid-Rezeptoren die Nahrungsauswahl, -aufnahme und Verstärkungsprozesse reguliert und dass die Aufnahme von Nahrungsfett β -Endorphin-Neurone im Hypothalamus aktiviert (Matsumura et al. 2012). Ebenso wurde beispielsweise gezeigt, dass die orale Applikation von Maiskeimöl oder Linolsäure die Dopaminkonzentration im *Nucleus accumbens* erhöht, einer Hirnregion, welche an der Prozessierung von Belohnungssignalen beteiligt ist (Liang et al. 2006). Auch eine Ausschüttung von endogenen Endocannabinoiden nach oralem Kontakt mit Fettemulsionen wird diskutiert (Dipatrizio 2014). Es ergibt sich daher die Frage, ob diese Effekte von Fettsäuren durch die Aktivierung von GPR120 in Geschmacksknospen oder auf trigeminalen Nervenfasern vermittelt werden. Nachweise über diesen Zusammenhang existieren bislang nicht, jedoch könnten zukünftige Untersuchungen wichtige Informationen über die Mechanismen geben, die der hohen Attraktivität von Fetten und der übermäßigen Aufnahme von Fetten zugrunde liegen.

4.3 Bedeutung der gustatorischen Fettwahrnehmung für die Entwicklung von Übergewicht und damit assoziierten Krankheiten.

Welche Bedeutung hat nun eine gustatorische Fettwahrnehmung beim Menschen für die Entstehung von Adipositas und damit assoziierten Krankheiten? Es zeigte sich sowohl in den Daten der vorliegenden Arbeit, als auch in den Ergebnissen der Projektpartner des Clusterprojektes, sowie in der Literatur, dass individuelle Unterschiede in der geschmacklichen Wahrnehmung von Fettsäuren, der oralen Bereitstellung von Fettsäuren (lipolytische Aktivität), sowie der Enzym- und Rezeptorausstattung bestehen (Galindo et al. 2012, Running et al. 2013, Voigt et al. 2014).

Individuelle Unterschiede in der Wahrnehmung sind auch für andere Geschmacksqualitäten beschrieben und haben einen Einfluss auf die Wahl und die Aufnahme von Nahrungsmitteln (Garcia-Bailo et al. 2009, Bachmanov et al. 2014, Roura et al. 2015). So ist zu vermuten und teilweise in der Literatur belegt, dass auch die individuelle Wahrnehmung von Fetten die Aufnahme von fettreicher bzw. fettarmer Nahrung beeinflusst. Untersuchungen von über- und normalgewichtigen Probanden ergab, dass sie einen Unterschied in der Sensitivität der Fettwahrnehmung zeigen (Pepino et al. 2012) (Stewart et al. 2011, Stewart et al. 2011, Stewart and Keast 2012). Außerdem war eine unterschiedliche gustatorische Sensitivität gegenüber Fettsäuren mit einem veränderten BMI assoziiert (Stewart et al. 2010, Stewart et al. 2011). Umgekehrt kann auch eine Veränderung des Körper-

gewichts (der Fettmasse) einen Einfluss auf die gustatorische Fettsensitivität haben (Passilly-Degrace et al. 2014).

Eine zu hohe Fett- und damit Energieaufnahme ist mit der Entstehung von Adipositas und verwandten Krankheiten assoziiert (vgl. Kap. 1). Die Fettaufnahme wird durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst, so auch die gustatorische Fettsäuresensitivität (Newman et al. 2013). Somit trägt die Fettgeschmackswahrnehmung maßgeblich zur Entstehung der Adipositas bei. Das Verständnis der Mechanismen der gustatorischen Fettwahrnehmung kann demnach zur Bekämpfung und Prävention von Übergewicht beitragen. Das Wissen um die molekularen Mechanismen und die zugrunde liegenden Fettgeschmacksstimuli gibt dabei beispielsweise die Möglichkeit, fettreduzierte und gleichzeitig energiereduzierte, Lebensmittel zu entwickeln, die an Schmackhaftigkeit, und damit Akzeptanz beim Verbraucher den fettreicheren Lebensmitteln nicht nachstehen. Hierzu wäre eine Entwicklung bzw. Isolation von natürlichen Fettgeschmacksrezeptor-Agonisten denkbar, welche kalorienarm bzw. -frei sind und bei der Herstellung von fettarmen Produkten zur Verbesserung der geschmacklichen Qualität Einsatz finden können.

5 Zusammenfassung

Die hohe Energieaufnahme durch Fette ist ein Hauptfaktor für die Entstehung von Adipositas, was zu weltweiten Bestrebungen führte, die Fettaufnahme zu verringern. Fettreduzierte Lebensmittel erreichen jedoch, trotz ihrer Weiterentwicklung, nicht die Schmackhaftigkeit ihrer Originale. Die traditionelle Sichtweise, dass die Attraktivität von Fetten allein durch Textur, Geruch, Aussehen und postingestive Effekte bestimmt wird, wird nun durch das Konzept einer gustatorischen Wahrnehmung ergänzt. Bei Nagetieren zeigte sich, dass Lipide unabhängig von den vorgenannten Eigenschaften erkannt werden, sowie, dass Fettsäuren, freigesetzt durch linguale Lipasen, als gustatorische Stimuli fungieren und Fettsäuresensoren in Geschmackszellen exprimiert sind. Die Datenlage für den Menschen erwies sich jedoch als sehr begrenzt, daher war es Ziel der vorliegenden Arbeit molekulare und histologische Voraussetzungen für eine gustatorische Fettwahrnehmung beim Menschen zu untersuchen.

Zunächst wurde humanes Geschmacksgewebe mittels RT-PCR und immunhistochemischen Methoden auf die Expression von Fettsäuresensoren untersucht, sowie exprimierende Zellen in Kofärbexperimenten charakterisiert und quantifiziert. Es wurde die Expression fettsäuresensitiver Rezeptoren nachgewiesen, deren Agonisten das gesamte Spektrum an kurz- bis langkettigen Fettsäuren abdecken (GPR43, GPR84, GPR120, CD36, KCNA5). Ein zweifelsfreier Nachweis des Proteins konnte für den auf langkettige Fettsäuren spezialisierten Rezeptor GPR120 in Typ-I- und Typ-III-Geschmackszellen der Wallpapillen erbracht werden. Etwa 85 % dieser GPR120-exprimierenden Zellen enthielten keine der ausgewählten Rezeptoren der Geschmacksqualitäten süß (TAS1R2/3), umami (TAS1R1/3) oder bitter (TAS2R38). Somit findet sich in humanen Geschmackspapillen nicht nur mindestens ein Sensor, sondern möglicherweise auch eine spezifische, fettsäuresensitive Zellpopulation. Weitere RT-PCR-Experimente und Untersuchungen mittels *In-situ*-Hybridisierung wurden zur Klärung der Frage durchgeführt, ob Lipasen in den Von-Ebner-Speicheldrüsen (VED) existieren, die freie Fettsäuren aus Triglyceriden als gustatorischen Stimulus freisetzen können. Es zeigte sich zwar keine Expression der bei Nagetieren gefundenen Lipase F (LIPF), jedoch der eng verwandten Lipasen K, M und N in den serösen Zellen der VED. *In-silico*-Untersuchungen der Sekundär- und Tertiärstrukturen zeigten die hohe Ähnlichkeit zu LIPF, erwiesen aber auch Unterschiede in den Bindungstaschen der Enzyme, welche auf ein differenziertes Substratspektrum hinweisen. Die Anwesenheit eines spezifischen Signalpeptids macht eine Sekretion der Lipasen in den die Geschmacksporen umspülenden Speichel wahrscheinlich und damit auch eine Bereitstellung von Fettsäuren als Stimuli für Fettsäuresensoren. Die Übertragung des durch diese Stimuli hervorgerufenen Signals von Geschmackszellen auf gustatorische Nervenfasern über P2X-Rezeptormultimere wurde mit Hilfe einer vorherigen Intervention mit einem P2X₃-/P2X_{2/3}-spezifischen Antagonisten an der Maus als Modellorganismus im Kurzzeit-Präferenztest untersucht. Es zeigte sich weder eine Beeinträchtigung der Wahrnehmung einer Fettsäurelösung, noch einer zuckerhaltigen Kontrolllösung, wohingegen die Wahrnehmung einer Bitterstofflösung reduziert wurde. Somit ist anhand der Ergebnisse dieser Arbeit eine Beteiligung des P2X₃-Homomers bzw. des P2X_{2/3}-Heteromers unwahrscheinlich, jedoch die des P2X₂-Homomers und damit der gustatorischen Nervenfasern nicht ausgeschlossen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf die Erfüllung grundlegender Voraussetzungen für die gustatorische Fett(säure)wahrnehmung hin und tragen zum Verständnis der sensorischen Fettwahrnehmung und der Regulation der Fettaufnahme bei. Das Wissen um die Regulation dieser Mechanismen stellt eine Grundlage zur Aufklärung der Ursachen und damit der Bekämpfung von Adipositas und assoziierten Krankheiten dar.

6 Summary

High consumption of energy from fat is considered one of the main factors that evoke obesity which led to a worldwide effort to reduce dietary fat intake. However, despite their continuous improvement, fat-reduced foods do not yet reach the palatability of their originals. The traditional view that the attraction to fats is only determined by texture, odor, appearance as well as postingestive effects is now challenged by the concept of gustatory sensation of fats. After excluding or masking the aforementioned features, rodents showed continuous attraction towards lipid solutions. Also long-chain fatty acids liberated from triglycerides by lingual lipases as the main stimulus and the expression of fatty acid-sensitive receptors in taste buds was shown. In contrast, only little data exists for humans. Therefore, this thesis aimed at elucidating the molecular and cellular prerequisites for a gustatory detection of fat.

First, human taste tissue was examined by RT-PCR and immunohistochemical methods for the expression of fatty acid sensors and the expressing cells were characterized and quantified by co-staining procedures. The expression of fatty acid-sensitive receptors was shown whose agonists cover the whole range of short- to long-chain fatty acids (GPR43, GPR84, GPR120, CD36, and KCNA5). Protein expression of the long-chain fatty acid receptor GPR120 in type I and type III taste cells was unambiguously demonstrated. About 85 % of the GPR120-expressing cells did not co-express receptors for sweet (TAS1R2/3), umami (TAS1R1/3) or bitter (TAS2R38) taste. Hence, not only does at least one fatty acid sensor exist in human taste papillae, but possibly also a special fatty acid-sensitive cell population. Additional RT-PCR experiments and *in situ* hybridization analyses were used to address the question, if lipases in the Von-Ebner-salivary glands (VEG) produce free fatty acids from triglycerides as gustatory stimuli. Unlike mice which express lipase F, lipases K, M and N, which are highly related to lipase F, were found to be expressed in the serous cells of the VEG. *In silico* approaches confirmed high similarities of the secondary and tertiary structures of these lipases to lipase F. Also a marked difference in the binding pocket of the enzymes was observed, which suggests differential substrate specificity. The presence of a signal peptide sequence proposes that the lipases K, M, and N are secreted into the trenches of gustatory papillae. This would result in lipolysis of dietary triglycerides and generation of stimuli for the fatty acid sensor GPR120. Next the hypothesis was tested whether GPR120-generated signals are conveyed to gustatory nerves via P2X-receptor-multimers. To this end short term preference tests were performed in mice after intervention with a P2X₃-/P2X_{2/3}-specific antagonist. However, this treatment did not affect the preference of mice for the fatty acid or for a sweet control solution, whereas recognition of a bitter solution was impaired. Thus, an involvement of the P2X₃-homomer or the P2X₃-/P2X_{2/3}-heteromer seems unlikely. However, these results do not exclude a contribution of P2X₂-receptor-heteromers and in turn gustatory nerves for the preference of fatty acid solutions.

In summary, the results of this thesis give new insights into the molecular and cellular prerequisites for a gustatory component for fat detection in humans. They also help understanding fat sensation and the regulation of fat intake which in turn may eventually promote novel concepts for the treatment of obesity and related diseases.

Literatur

- (1) Abraira, V. E. and D. D. Ginty (2013). "The sensory neurons of touch." *Neuron* 79(4): 618-639.
- (2) Ameis, D., G. Brockmann, R. Knoblich, M. Merkel, R. E. Ostlund, Jr., J. W. Yang, P. M. Coates, J. A. Cortner, S. V. Feinman and H. Greten (1995). "A 5' splice-region mutation and a dinucleotide deletion in the lysosomal acid lipase gene in two patients with cholesteryl ester storage disease." *J Lipid Res* 36(2): 241-250.
- (3) Ancel, D., A. Bernard, S. Subramaniam, A. Hirasawa, G. Tsujimoto, T. Hashimoto, P. Passilly-Degrace, N. A. Khan and P. Besnard (2015). "The oral lipid sensor GPR120 is not indispensable for the orosensory detection of dietary lipids in mice." *J Lipid Res* 56(2): 369-378.
- (4) Armand, M., P. Borel, L. Cara, M. Senft, M. Chautan, H. Lafont and D. Lairon (1990). "Adaptation of lingual lipase to dietary fat in rats." *J Nutr* 120(10): 1148-1156.
- (5) Armstrong, C. L. (2007). 6-n-Propylthiouracil: orosensory influence on taste, diet and chronic disease risk. West Lafayette, Purdue University.
- (6) Astrup, A. (1998). "The American paradox: the role of energy-dense fat-reduced food in the increasing prevalence of obesity." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1(6): 573-577.
- (7) Avenet, P., F. Hofmann and B. Lindemann (1988). "Transduction in taste receptor cells requires cAMP-dependent protein kinase." *Nature* 331(6154): 351-354.
- (8) Bachmanov, A. A., N. P. Bosak, C. Lin, I. Matsumoto, M. Ohmoto, D. R. Reed and T. M. Nelson (2014). "Genetics of taste receptors." *Curr Pharm Des* 20(16): 2669-2683.
- (9) Baillie, A. G. S., C. T. Coburn and N. A. Abumrad (1996). "Reversible Binding of Long-chain Fatty Acids to Purified FAT, the Adipose CD36 Homolog." *The Journal of Membrane Biology* 153(1): 75-81.
- (10) Bartel, D. L., S. L. Sullivan, E. G. Lavoie, J. Seigny and T. E. Finger (2006). "Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is the ecto-ATPase of type I cells in taste buds." *J Comp Neurol* 497(1): 1-12.
- (11) Baur, C. and W. Grosch (1977). "[Investigation about the taste of di, tri- and tetrahydroxy fatty acid]." *Z Lebensm Unters Forsch* 165(2): 82-84.
- (12) Baur, C., W. Grosch, H. Wieser and H. Jugel (1977). "Enzymatic oxydation of linoleic acid: formation of bitter tasting fatty acids." *Z Lebensm Unters Forsch* 164(3): 171-176.
- (13) Behrens, M., S. Born, U. Redel, N. Voigt, V. Schuh, J. D. Raguse and W. Meyerhof (2012). "Immunohistochemical detection of TAS2R38 protein in human taste cells." *PLoS One* 7(7): e40304.
- (14) Behrens, M., S. Foerster, F. Staehler, J. D. Raguse and W. Meyerhof (2007). "Gustatory expression pattern of the human TAS2R bitter receptor gene family reveals a heterogenous population of bitter responsive taste receptor cells." *J Neurosci* 27(46): 12630-12640.
- (15) Behrens, M. and W. Meyerhof (2009b). "Mammalian bitter taste perception." *Results Probl Cell Differ* 47: 203-220.
- (16) Behrens, M. and W. Meyerhof (2010). "Oral and extraoral bitter taste receptors." *Results Probl Cell Differ* 52: 87-99.
- (17) Behrens, M. and W. Meyerhof (2011). "Gustatory and extragustatory functions of mammalian taste receptors." *Physiol Behav* 105(1): 4-13.
- (18) Behrens, M. and W. Meyerhof (2011b). "Gustatory and extragustatory functions of mammalian taste receptors." *Physiol Behav* 105(1): 4-13.
- (19) Behrens, M., W. Meyerhof, C. Hellfritsch and T. Hofmann (2011a). "Sweet and umami taste: natural products, their chemosensory targets, and beyond." *Angew Chem Int Ed Engl* 50(10): 2220-2242.
- (20) Behrens, M., C. Reichling, C. Batram, A. Brockhoff and W. Meyerhof (2009a). "Bitter taste receptors and their cells." *Ann N Y Acad Sci* 1170: 111-115.
- (21) Behrens, M., A. Voigt and W. Meyerhof (2013). "Taste and nutrition: 1. Physiological basis of taste perception." *Ernährungsumschau international* 60(7): 124-131.
- (22) Beidler, L. M. and R. L. Smallman (1965). "Renewal of cells within taste buds." *J Cell Biol* 27(2): 263-272.
- (23) Belecky, T. L. and D. V. Smith (1990). "Postnatal development of palatal and laryngeal taste buds in the hamster." *J Comp Neurol* 293(4): 646-654.
- (24) Blossfeld, I., A. Collins, S. Boland, R. Baixauli, M. Kiely and C. Delahunty (2007). "Relationships between acceptance of sour taste and fruit intakes in 18-month-old infants." *Br J Nutr* 98(5): 1084-1091.
- (25) Bohin, M. C., W. S. Roland, H. Gruppen, R. J. Gouka, H. T. van der Hijden, P. Dekker, G. Smit and J. P. Vincken (2013). "Evaluation of the bitter-masking potential of food proteins for EGCG by a cell-based human bitter taste receptor assay and binding studies." *J Agric Food Chem* 61(42): 10010-10017.
- (26) Born, S., A. Levit, M. Y. Niv, W. Meyerhof and M. Behrens (2013). "The human bitter taste receptor TAS2R10 is tailored to accommodate numerous diverse ligands." *J Neurosci* 33(1): 201-213.

- (27)** Boughter, J. D., Jr., D. W. Pumpllin, C. Yu, R. C. Christy and D. V. Smith (1997). "Differential expression of alpha-gustducin in taste bud populations of the rat and hamster." *J Neurosci* 17(8): 2852-2858.
- (28)** Bray, G. A. (2000). "Afferent signals regulating food intake." *Proc Nutr Soc* 59(3): 373-384.
- (29)** Bray, G. A., S. Paeratakul and B. M. Popkin (2004). "Dietary fat and obesity: a review of animal, clinical and epidemiological studies." *Physiol Behav* 83(4): 549-555.
- (30)** Bray, G. A. and B. M. Popkin (1998). "Dietary fat intake does affect obesity!" *Am J Clin Nutr* 68(6): 1157-1173.
- (31)** Breer, H., J. Eberle, C. Frick, D. Haid and P. Widmayer (2012). "Gastrointestinal chemosensation: chemosensory cells in the alimentary tract." *Histochem Cell Biol* 138(1): 13-24.
- (32)** Briscoe, C. P., M. Tadayyon, J. L. Andrews, W. G. Benson, J. K. Chambers, M. M. Eilert, C. Ellis, N. A. Elshourbagy, A. S. Goetz, D. T. Minnick, P. R. Murdock, H. R. Sauls, U. Shabon, L. D. Spinage, J. C. Strum, P. G. Szekeres, K. B. Tan, J. M. Way, D. M. Ignar, S. Wilson and A. I. Muir (2003). "The Orphan G Protein-coupled Receptor GPR40 Is Activated by Medium and Long Chain Fatty Acids." *Journal of Biological Chemistry* 278(13): 11303-11311.
- (33)** Brockhoff, A., M. Behrens, A. Massarotti, G. Appendino and W. Meyerhof (2007). "Broad tuning of the human bitter taste receptor hTAS2R46 to various sesquiterpene lactones, clerodane and labdane diterpenoids, strychnine, and denatonium." *J Agric Food Chem* 55(15): 6236-6243.
- (34)** Brockhoff, A., M. Behrens, M. Y. Niv and W. Meyerhof (2010). "Structural requirements of bitter taste receptor activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(24): 11110-11115.
- (35)** Brockhoff, A., M. Behrens, N. Roudnitzky, G. Appendino, C. Avonto and W. Meyerhof (2011). "Receptor agonism and antagonism of dietary bitter compounds." *J Neurosci* 31(41): 14775-14782.
- (36)** Bufe, B., P. A. Breslin, C. Kuhn, D. R. Reed, C. D. Tharp, J. P. Slack, U. K. Kim, D. Drayna and W. Meyerhof (2005). "The molecular basis of individual differences in phenylthiocarbamide and propylthiouracil bitterness perception." *Curr Biol* 15(4): 322-327.
- (37)** Burns, R. N. and N. H. Moniri (2010). "Agonism with the omega-3 fatty acids alpha-linolenic acid and docosahexaenoic acid mediates phosphorylation of both the short and long isoforms of the human GPR120 receptor." *Biochem Biophys Res Commun* 396(4): 1030-1035.
- (38)** Canaan, S., A. Roussel, R. Verger and C. Cambillau (1999). "Gastric lipase: crystal structure and activity." *Biochim Biophys Acta* 1441(2-3): 197-204.
- (39)** Cartoni, C., K. Yasumatsu, T. Ohkuri, N. Shigemura, R. Yoshida, N. Godinot, J. le Coutre, Y. Ninomiya and S. Damak (2010). "Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120." *J Neurosci* 30(25): 8376-8382.
- (40)** Chale-Rush, A., J. R. Burgess and R. D. Mattes (2007a). "Multiple routes of chemosensitivity to free fatty acids in humans." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292(5): G1206-1212.
- (41)** Chale-Rush, A., J. R. Burgess and R. D. Mattes (2007b). "Evidence for human orosensory (taste?) sensitivity to free fatty acids." *Chem Senses* 32(5): 423-431.
- (42)** Chandrashekar, J., M. A. Hoon, N. J. Ryba and C. S. Zuker (2006). "The receptors and cells for mammalian taste." *Nature* 444(7117): 288-294.
- (43)** Chandrashekar, J., C. Kuhn, Y. Oka, D. A. Yarmolinsky, E. Hummler, N. J. Ryba and C. S. Zuker (2010). "The cells and peripheral representation of sodium taste in mice." *Nature* 464(7286): 297-301.
- (44)** Chandrashekar, J., D. Yarmolinsky, L. von Buchholtz, Y. Oka, W. Sly, N. J. Ryba and C. S. Zuker (2009). "The taste of carbonation." *Science* 326(5951): 443-445.
- (45)** Chaudhari, N., E. Pereira and S. D. Roper (2009). "Taste receptors for umami: the case for multiple receptors." *Am J Clin Nutr* 90(3): 738S-742S.
- (46)** Chaudhari, N. and S. D. Roper (2010). "The cell biology of taste." *J Cell Biol* 190(3): 285-296.
- (47)** Cheng, L. H. and P. P. Robinson (1991). "The distribution of fungiform papillae and taste buds on the human tongue." *Arch Oral Biol* 36(8): 583-589.
- (48)** Clapp, T. R., L. M. Stone, R. F. Margolskee and S. C. Kinnamon (2001). "Immunocytochemical evidence for co-expression of Type III IP3 receptor with signaling components of bitter taste transduction." *BMC Neurosci* 2: 6.
- (49)** Clapp, T. R., R. Yang, C. L. Stoick, S. C. Kinnamon and J. C. Kinnamon (2004). "Morphologic characterization of rat taste receptor cells that express components of the phospholipase C signaling pathway." *J Comp Neurol* 468(3): 311-321.
- (50)** Cordain, L., B. A. Watkins and N. J. Mann (2001). "Fatty acid composition and energy density of foods available to African hominids. Evolutionary implications for human brain development." *World Rev Nutr Diet* 90: 144-161.
- (51)** Crawford, M. A., M. Bloom, C. L. Broadhurst, W. F. Schmidt, S. C. Cunnane, C. Galli, K. Gehbrenskel, F. Linseisen, J. Lloyd-Smith and J. Parkington (1999). "Evidence for the unique function of docosahexaenoic acid during the evolution of the modern hominid brain." *Lipids* 34 Suppl: S39-47.
- (52)** Cummings, D. E. and J. Overduin (2007). "Gastrointestinal regulation of food intake." *J Clin Invest* 117(1): 13-23.

- (53) Daley, C. A., A. Abbott, P. S. Doyle, G. A. Nader and S. Larson (2010). "A review of fatty acid profiles and antioxidant content in grass-fed and grain-fed beef." *Nutr J* 9: 10.
- (54) Damak, S., J. Le-Coutre, C. Bezencon and C. Cartoni (2007). Fat taste receptors and their methods of use.
- (55) Damak, S., M. Rong, K. Yasumatsu, Z. Kokrashvili, C. A. Perez, N. Shigemura, R. Yoshida, B. Mosinger, Jr., J. I. Glendinning, Y. Ninomiya and R. F. Margolskee (2006). "Trpm5 null mice respond to bitter, sweet, and umami compounds." *Chem Senses* 31(3): 253-264.
- (56) Damak, S., M. Rong, K. Yasumatsu, Z. Kokrashvili, V. Varadarajan, S. Zou, P. Jiang, Y. Ninomiya and R. F. Margolskee (2003). "Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3." *Science* 301(5634): 850-853.
- (57) Dando, R. and S. D. Roper (2012). "Acetylcholine is released from taste cells, enhancing taste signalling." *J Physiol* 590(Pt 13): 3009-3017.
- (58) De Araujo, I. E. and E. T. Rolls (2004). "Representation in the human brain of food texture and oral fat." *J Neurosci* 24(12): 3086-3093.
- (59) de Wijk, R. A., J. F. Prinz, L. Engelen and H. Weenen (2004). "The role of alpha-amylase in the perception of oral texture and flavour in custards." *Physiol Behav* 83(1): 81-91.
- (60) DeFazio, R. A., G. Dvoryanchikov, Y. Maruyama, J. W. Kim, E. Pereira, S. D. Roper and N. Chaudhari (2006). "Separate populations of receptor cells and presynaptic cells in mouse taste buds." *J Neurosci* 26(15): 3971-3980.
- (61) DeNigris, S. J., M. Hamosh, D. K. Kasbekar, T. C. Lee and P. Hamosh (1988). "Lingual and gastric lipases: species differences in the origin of prepancreatic digestive lipases and in the localization of gastric lipase." *Biochim Biophys Acta* 959(1): 38-45.
- (62) Depoortere, I. (2014). "Taste receptors of the gut: emerging roles in health and disease." *Gut* 63(1): 179-190.
- (63) DeSimone, J. A. (2000). "Focus on "rapid entry of bitter and sweet tastants into liposomes and taste cells: implications for signal transduction"." *Am J Physiol Cell Physiol* 278(1): C13-16.
- (64) DeSimone, J. A., T. H. Phan, G. L. Heck, Z. Ren, J. Coleman, S. Mummalaneni, P. Melone and V. Lyall (2011). "Involvement of NADPH-dependent and cAMP-PKA sensitive H⁺ channels in the chorda tympani nerve responses to strong acids." *Chem Senses* 36(4): 389-403.
- (65) DFAL (Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie) (2004). *Der kleine Souci Fachmann Kraut - Lebensmitteltabelle für die Praxis*.
- (66) Dipatrizio, N. V. (2014). "Is fat taste ready for primetime?" *Physiol Behav*.
- (67) Dotson, C. D., L. Zhang, H. Xu, Y. K. Shin, S. Vignes, S. H. Ott, A. E. Elson, H. J. Choi, H. Shaw, J. M. Egan, B. D. Mitchell, X. Li, N. I. Steinle and S. D. Munger (2008). "Bitter taste receptors influence glucose homeostasis." *PLoS One* 3(12): e3974.
- (68) Dugi, K. A., H. L. Dichek, G. D. Talley, H. B. Brewer, Jr. and S. Santamarina-Fojo (1992). "Human lipoprotein lipase: the loop covering the catalytic site is essential for interaction with lipid substrates." *J Biol Chem* 267(35): 25086-25091.
- (69) Dvoryanchikov, G., Y. A. Huang, R. Barro-Soria, N. Chaudhari and S. D. Roper (2011). "GABA, its receptors, and GABAergic inhibition in mouse taste buds." *J Neurosci* 31(15): 5782-5791.
- (70) Dvoryanchikov, G., M. S. Sinclair, I. Perea-Martinez, T. Wang and N. Chaudhari (2009). "Inward rectifier channel, ROMK, is localized to the apical tips of glial-like cells in mouse taste buds." *J Comp Neurol* 517(1): 1-14.
- (71) Ebba, S., R. A. Abarintos, D. G. Kim, M. Tiyouh, J. C. Stull, A. Movalia and G. Smutzer (2012). "The examination of fatty acid taste with edible strips." *Physiol Behav* 106(5): 579-586.
- (72) Eddy, M. C., B. K. Eschle, J. Barrows, R. M. Hallock, T. E. Finger and E. R. Delay (2009). "Double P2X2/P2X3 purinergic receptor knockout mice do not taste NaCl or the artificial sweetener SC45647." *Chem Senses* 34(9): 789-797.
- (73) Febbraio, M., D. P. Hajjar and R. L. Silverstein (2001). "CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism." *Journal of Clinical Investigation* 108(6): 785-791.
- (74) Fedida, D., S. Zhang, D. C. Kwan, C. Eduljee and S. J. Kehl (2005). "Synergistic inhibition of the maximum conductance of Kv1.5 channels by extracellular K⁺ reduction and acidification." *Cell Biochem Biophys* 43(2): 231-242.
- (75) Field, R. B. and R. O. Scow (1983). "Purification and characterization of rat lingual lipase." *J Biol Chem* 258(23): 14563-14569.
- (76) Field, R. B., A. I. Spielman and A. R. Hand (1989). "Purification of lingual amylase from serous glands of rat tongue and characterization of rat lingual amylase and lingual lipase." *J Dent Res* 68(2): 139-145.
- (77) Finger, T. E., V. Danilova, J. Barrows, D. L. Bartel, A. J. Vigers, L. Stone, G. Hellekant and S. C. Kinnamon (2005). "ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves." *Science* 310(5753): 1495-1499.
- (78) Fischler, W., P. Kong, S. Marella and K. Scott (2007). "The detection of carbonation by the *Drosophila* gustatory system." *Nature* 448(7157): 1054-1057.

- (79) Fredriksson, R., P. J. Hoglund, D. E. Gloriam, M. C. Lagerstrom and H. B. Schioth (2003). "Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives." *FEBS Lett* 554(3): 381-388.
- (80) Fukuwatari, T., T. Kawada, M. Tsuruta, T. Hiraoka, T. Iwanaga, E. Sugimoto and T. Fushiki (1997). "Expression of the putative membrane fatty acid transporter (FAT) in taste buds of the circumvallate papillae in rats." *FEBS Lett* 414(2): 461-464.
- (81) Fukuwatari, T., K. Shibata, K. Iguchi, T. Saeki, A. Iwata, K. Tani, E. Sugimoto and T. Fushiki (2003). "Role of gustation in the recognition of oleate and triolein in anosmic rats." *Physiol Behav* 78(4-5): 579-583.
- (82) Fushiki, T. and T. Kawai (2005). "Chemical reception of fats in the oral cavity and the mechanism of addiction to dietary fat." *Chem Senses* 30 Suppl 1: i184-185.
- (83) Gaillard, D., F. Laugerette, N. Darcel, A. El-Yassimi, P. Passilly-Degrace, A. Hichami, N. A. Khan, J. P. Montmayeur and P. Besnard (2008). "The gustatory pathway is involved in CD36-mediated orosensory perception of long-chain fatty acids in the mouse." *FASEB J* 22(5): 1458-1468.
- (84) Gaillard, D., P. Passilly-Degrace and P. Besnard (2008). "Molecular mechanisms of fat preference and overeating." *Ann N Y Acad Sci* 1141: 163-175.
- (85) Galindo, M. M., N. Y. Schneider, F. Stahler, J. Tole and W. Meyerhof (2012). "Taste preferences." *Prog Mol Biol Transl Sci* 108: 383-426.
- (86) Galindo, M. M., N. Voigt, J. Stein, J. van Lengerich, J. D. Raguse, T. Hofmann, W. Meyerhof and M. Behrens (2012). "G protein-coupled receptors in human fat taste perception." *Chem Senses* 37(2): 123-139.
- (87) Gao, N., M. Lu, F. Echeverri, B. Laita, D. Kalabat, M. E. Williams, P. Hevezi, A. Zlotnik and B. D. Moyer (2009). "Voltage-gated sodium channels in taste bud cells." *BMC Neurosci* 10: 20.
- (88) Garcia-Bailo, B., C. Toguri, K. M. Eny and A. El-Soehy (2009). "Genetic variation in taste and its influence on food selection." *OMICS* 13(1): 69-80.
- (89) Gargouri, Y., H. Moreau and R. Verger (1989). "Gastric lipases: biochemical and physiological studies." *Biochim Biophys Acta* 1006(3): 255-271.
- (90) Gargouri, Y., G. Pieroni, C. Riviere, J. F. Saunier, P. A. Lowe, L. Sarda and R. Verger (1986). "Kinetic assay of human gastric lipase on short- and long-chain triacylglycerol emulsions." *Gastroenterology* 91(4): 919-925.
- (91) Gever, J. R., R. Soto, R. A. Henningsen, R. S. Martin, D. H. Hackos, S. Panicker, W. Rubas, I. B. Oglesby, M. P. Dillon, M. E. Milla, G. Burnstock and A. P. Ford (2010). "AF-353, a novel, potent and orally bioavailable P2X3/P2X2/3 receptor antagonist." *Br J Pharmacol* 160(6): 1387-1398.
- (92) Gilbertson, T. A. (1998). "Gustatory mechanisms for the detection of fat." *Curr Opin Neurobiol* 8(4): 447-452.
- (93) Gilbertson, T. A., D. T. Fontenot, L. Liu, H. Zhang and W. T. Monroe (1997). "Fatty acid modulation of K⁺ channels in taste receptor cells: gustatory cues for dietary fat." *Am J Physiol* 272(4 Pt 1): C1203-1210.
- (94) Gilbertson, T. A. and N. A. Khan (2014). "Cell signaling mechanisms of oro-gustatory detection of dietary fat: advances and challenges." *Prog Lipid Res* 53: 82-92.
- (95) Gilbertson, T. A., L. Liu, I. Kim, C. A. Burks and D. R. Hansen (2005). "Fatty acid responses in taste cells from obesity-prone and -resistant rats." *Physiol Behav* 86(5): 681-690.
- (96) Gilbertson, T. A., T. Yu and B. P. Shah (2010). *Gustatory Mechanisms for Fat Detection. Fat Detection: Taste, Texture, and Post Ingestive Effects.* J. P. Montmayeur and J. le Coutre. Boca Raton (FL).
- (97) Glendinning, J. I. (1994). "Is the bitter rejection response always adaptive?" *Physiol Behav* 56(6): 1217-1227.
- (98) Glendinning, J. I., J. Gresack and A. C. Spector (2002). "A high-throughput screening procedure for identifying mice with aberrant taste and oromotor function." *Chem Senses* 27(5): 461-474.
- (99) Green, B. G. and D. Nachtigal (2015). "Temperature Affects Human Sweet Taste via At Least Two Mechanisms." *Chem Senses*.
- (100) Guerciolini, R. (1997). "Mode of action of orlistat." *Int J Obes Relat Metab Disord* 21 Suppl 3: S12-23.
- (101) Guo, S. W. and D. R. Reed (2001). "The genetics of phenylthiocarbamide perception." *Ann Hum Biol* 28(2): 111-142.
- (102) Guthmann, F., R. Haupt, A. C. Looman, F. Spener and B. Rüstow (1999). Fatty acid translocase/CD36 mediates the uptake of palmitate by type II pneumocytes.
- (103) Hacker, K., A. Laskowski, L. Feng, D. Restrepo and K. Medler (2008). "Evidence for two populations of bitter responsive taste cells in mice." *J Neurophysiol* 99(3): 1503-1514.
- (104) Halpern, B. P. (1998). "Amiloride and vertebrate gustatory responses to NaCl." *Neurosci Biobehav Rev* 23(1): 5-47.
- (105) Hamilton, J. A. (1999). "Transport of fatty acids across membranes by the diffusion mechanism." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 60(5-6): 291-297.
- (106) Hamilton, J. A., R. A. Johnson, B. Corkey and F. Kamp (2001). "Fatty acid transport: the diffusion mechanism in model and biological membranes." *J Mol Neurosci* 16(2-3): 99-108; discussion 151-107.
- (107) Hamilton, R. B. and R. Norgren (1984). "Central projections of gustatory nerves in the rat." *J Comp Neurol* 222(4): 560-577.

- (108) Hamosh, M. and W. A. Burns (1977). "Lipolytic activity of human lingual glands (Ebner)." *Lab Invest* 37(6): 603-608.
- (109) Hamosh, M., D. Ganot and P. Hamosh (1979). "Rat lingual lipase. Characteristics of enzyme activity." *J Biol Chem* 254(23): 12121-12125.
- (110) Hamosh, M. and R. O. Scow (1973). "Lingual lipase and its role in the digestion of dietary lipid." *J Clin Invest* 52(1): 88-95.
- (111) Hansen, D., L. McKenna, B. Shah and T. Gilbertson (2006). Expression of fatty acid activated G-Protein coupled receptors in chemosensory cells. ACHEMS Annual Meeting 2006. Sarasota, Florida, USA.
- (112) Hara, T., D. Kashihara, A. Ichimura, I. Kimura, G. Tsujimoto and A. Hirasawa (2014). "Role of free fatty acid receptors in the regulation of energy metabolism." *Biochim Biophys Acta* 1841(9): 1292-1300.
- (113) Hariri, N. and L. Thibault (2010). "High-fat diet-induced obesity in animal models." *Nutr Res Rev* 23(2): 270-299.
- (114) He, M., A. Wilde and M. A. Kaderbhai (1990). "A simple single-step procedure for small-scale preparation of *Escherichia coli* plasmids." *Nucleic Acids Res* 18(6): 1660.
- (115) Hellekant, G., J. Schmolling, P. Marambaud and T. A. Rose-Hellekant (2015). "CALHM1 Deletion in Mice Affects Glossopharyngeal Taste Responses, Food Intake, Body Weight, and Life Span." *Chem Senses* 40(6): 373-379.
- (116) Helmerhorst, E. J. and F. G. Oppenheim (2007). "Saliva: a dynamic proteome." *J Dent Res* 86(8): 680-693.
- (117) Hendricks, S. J., S. I. Sollars and D. L. Hill (2002). "Injury-induced functional plasticity in the peripheral gustatory system." *J Neurosci* 22(19): 8607-8613.
- (118) Hill, J. O., E. L. Melanson and H. T. Wyatt (2000). "Dietary fat intake and regulation of energy balance: implications for obesity." *J Nutr* 130(2S Suppl): 284S-288S.
- (119) Hiraoka, T., T. Fukuwatari, M. Imaizumi and T. Fushiki (2003). "Effects of oral stimulation with fats on the cephalic phase of pancreatic enzyme secretion in esophagostomized rats." *Physiol Behav* 79(4-5): 713-717.
- (120) Hirasawa, A., T. Hara, S. Katsuma, T. Adachi and G. Tsujimoto (2008). "Free fatty acid receptors and drug discovery." *Biol Pharm Bull* 31(10): 1847-1851.
- (121) Hirasawa, A., K. Tsumaya, T. Awaji, S. Katsuma, T. Adachi, M. Yamada, Y. Sugimoto, S. Miyazaki and G. Tsujimoto (2005). "Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120." *Nat Med* 11(1): 90-94.
- (122) Hochheimer, A., M. Krohn, K. Rudert, K. Riedel, S. Becker, C. Thirion and H. Zinke (2014). "Endogenous Gustatory Responses and Gene Expression Profile of Stably Proliferating Human Taste Cells Isolated From Fungiform Papillae." *Chemical Senses* 39(4): 359-377.
- (123) Holmes, R. S., L. A. Cox and J. L. VandeBerg (2010). "Comparative studies of mammalian acid lipases: Evidence for a new gene family in mouse and rat (*Lipo*)." *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 5(3): 217-226.
- (124) Hoon, M. A., E. Adler, J. Lindemeier, J. F. Battey, N. J. Ryba and C. S. Zuker (1999). "Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity." *Cell* 96(4): 541-551.
- (125) Horio, N., R. Yoshida, K. Yasumatsu, Y. Yanagawa, Y. Ishimaru, H. Matsunami and Y. Ninomiya (2011). "Sour taste responses in mice lacking PKD channels." *PLoS One* 6(5): e20007.
- (126) Huang, A. L., X. Chen, M. A. Hoon, J. Chandrashekar, W. Guo, D. Trankner, N. J. Ryba and C. S. Zuker (2006). "The cells and logic for mammalian sour taste detection." *Nature* 442(7105): 934-938.
- (127) Huang, Y. A., Y. Maruyama and S. D. Roper (2008b). "Norepinephrine is coreleased with serotonin in mouse taste buds." *J Neurosci* 28(49): 13088-13093.
- (128) Huang, Y. A., Y. Maruyama, R. Stimac and S. D. Roper (2008a). "Presynaptic (Type III) cells in mouse taste buds sense sour (acid) taste." *J Physiol* 586(Pt 12): 2903-2912.
- (129) Huang, Y. A., L. M. Stone, E. Pereira, R. Yang, J. C. Kinnamon, G. Dvoryanchikov, N. Chaudhari, T. E. Finger, S. C. Kinnamon and S. D. Roper (2011). "Knocking out P2X receptors reduces transmitter secretion in taste buds." *J Neurosci* 31(38): 13654-13661.
- (130) Huang, Y. J., Y. Maruyama, G. Dvoryanchikov, E. Pereira, N. Chaudhari and S. D. Roper (2007). "The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(15): 6436-6441.
- (131) Huang, Y. J., Y. Maruyama, K. S. Lu, E. Pereira, I. Plonsky, J. E. Baur, D. Wu and S. D. Roper (2005b). "Mouse taste buds use serotonin as a neurotransmitter." *J Neurosci* 25(4): 843-847.
- (132) Huang, Y. J., Y. Maruyama, K. S. Lu, E. Pereira and S. D. Roper (2005a). "Mouse taste buds release serotonin in response to taste stimuli." *Chem Senses* 30 Suppl 1: i39-40.
- (133) Hübner, S., J. Töle and W. Meyerhof (2013). "Taste and Nutrition: 3. Development of taste preferences and aversions." *Ernährungsumschau international* 60(12): 222-227.

- (134) Humphrey, S. P. and R. T. Williamson (2001). "A review of saliva: normal composition, flow, and function." *J Prosthet Dent* 85(2): 162-169.
- (135) Ichimura, A., A. Hirasawa, T. Hara and G. Tsujimoto (2009). "Free fatty acid receptors act as nutrient sensors to regulate energy homeostasis." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 89(3-4): 82-88.
- (136) Inoshita, T. and T. Tanimura (2006). "Cellular identification of water gustatory receptor neurons and their central projection pattern in *Drosophila*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(4): 1094-1099.
- (137) Isenberg, J. S., C. Yu and D. D. Roberts (2008). "Differential effects of ABT-510 and a CD36-binding peptide derived from the type 1 repeats of thrombospondin-1 on fatty acid uptake, nitric oxide signaling, and caspase activation in vascular cells." *Biochem Pharmacol* 75(4): 875-882.
- (138) Ishimaru, Y., H. Inada, M. Kubota, H. Zhuang, M. Tominaga and H. Matsunami (2006). "Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(33): 12569-12574.
- (139) Iwata, S., R. Yoshida and Y. Ninomiya (2013). "Taste Transductions in Taste Receptor Cells: Basic Tastes and Moreover." *Curr Pharm Des*.
- (140) Iwatsuki, K., R. Ichikawa, A. Uematsu, A. Kitamura, H. Uneyama and K. Torii (2012). "Detecting sweet and umami tastes in the gastrointestinal tract." *Acta Physiol (Oxf)* 204(2): 169-177.
- (141) Janssen, P., P. Vanden Berghe, S. Verschueren, A. Lehmann, I. Depoortere and J. Tack (2011). "Review article: the role of gastric motility in the control of food intake." *Aliment Pharmacol Ther* 33(8): 880-894.
- (142) Jarvis, M. F., B. Bianchi, J. T. Uchic, J. Cartmell, C. H. Lee, M. Williams and C. Faltynek (2004). "[³H]A-317491, a novel high-affinity non-nucleotide antagonist that specifically labels human P2X_{2/3} and P2X₃ receptors." *J Pharmacol Exp Ther* 310(1): 407-416.
- (143) Johnson, B. A., S. L. Ho, Z. Xu, J. S. Yihan, S. Yip, E. E. Hingco and M. Leon (2002). "Functional mapping of the rat olfactory bulb using diverse odorants reveals modular responses to functional groups and hydrocarbon structural features." *J Comp Neurol* 449(2): 180-194.
- (144) Kadohisa, M., J. V. Verhagen and E. T. Rolls (2005). "The primate amygdala: Neuronal representations of the viscosity, fat texture, temperature, grittiness and taste of foods." *Neuroscience* 132(1): 33-48.
- (145) Kamp, F. and J. A. Hamilton (2006). "How fatty acids of different chain length enter and leave cells by free diffusion." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75(3): 149-159.
- (146) Kamphuis, M. M., W. H. Saris and M. S. Westerterp-Plantenga (2003). "The effect of addition of linoleic acid on food intake regulation in linoleic acid tasters and linoleic acid non-tasters." *Br J Nutr* 90(1): 199-206.
- (147) Kamphuis, M. M., M. S. Westerterp-Plantenga and W. H. Saris (2001). "Fat-specific satiety in humans for fat high in linoleic acid vs fat high in oleic acid." *Eur J Clin Nutr* 55(6): 499-508.
- (148) Kapsimali, M. and L. A. Barlow (2013). "Developing a sense of taste." *Semin Cell Dev Biol* 24(3): 200-209.
- (149) Karhunen, L. J., K. R. Juvonen, A. Huotari, A. K. Purhonen and K. H. Herzig (2008). "Effect of protein, fat, carbohydrate and fibre on gastrointestinal peptide release in humans." *Regul Pept* 149(1-3): 70-78.
- (150) Kawai, T. and T. Fushiki (2003). "Importance of lipolysis in oral cavity for orosensory detection of fat." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285(2): R447-454.
- (151) Kettenmann, B., C. Mueller, C. Wille and G. Kobal (2005). "Odor and taste interaction on brain responses in humans." *Chem Senses* 30 Suppl 1: i234-235.
- (152) Khan, N. A. and P. Besnard (2009). "Oro-sensory perception of dietary lipids: new insights into the fat taste transduction." *Biochim Biophys Acta* 1791(3): 149-155.
- (153) Kim, U. K., P. A. Breslin, D. Reed and D. Drayna (2004). "Genetics of human taste perception." *J Dent Res* 83(6): 448-453.
- (154) Kim, U. K. and D. Drayna (2005). "Genetics of individual differences in bitter taste perception: lessons from the PTC gene." *Clin Genet* 67(4): 275-280.
- (155) Kim, U. K., E. Jorgenson, H. Coon, M. Leppert, N. Risch and D. Drayna (2003). "Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide." *Science* 299(5610): 1221-1225.
- (156) Kinnamon, S. C. and T. E. Finger (2013). "A taste for ATP: neurotransmission in taste buds." *Front Cell Neurosci* 7: 264.
- (157) Kitagawa, M., Y. Kusakabe, H. Miura, Y. Ninomiya and A. Hino (2001). "Molecular genetic identification of a candidate receptor gene for sweet taste." *Biochem Biophys Res Commun* 283(1): 236-242.
- (158) Klima, H., K. Ullrich, C. Aslanidis, P. Fehring, K. J. Lackner and G. Schmitz (1993). "A splice junction mutation causes deletion of a 72-base exon from the mRNA for lysosomal acid lipase in a patient with cholesteryl ester storage disease." *J Clin Invest* 92(6): 2713-2718.
- (159) Kokrashvili, Z., K. K. Yee, E. Ilegems, K. Iwatsuki, Y. Li, B. Mosinger and R. F. Margolskee (2014). "Endocrine taste cells." *Br J Nutr* 111 Suppl 1: S23-29.

- (160) Krammer (2012). "Vowort aus: Fettwahrnehmung und Sättigungsregulation - Ansatz zur Entwicklung fettreduzierter Lebensmittel." Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V.(2012).
- (161) Kremmyda, L. S., E. Tvrzicka, B. Stankova and A. Zak (2011). "Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease: a review. part 2: fatty acid physiological roles and applications in human health and disease." *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 155(3): 195-218.
- (162) Kulkarni, B. and R. Mattes (2013). "Evidence for presence of nonesterified fatty acids as potential gustatory signaling molecules in humans." *Chem Senses* 38(2): 119-127.
- (163) Kung, C. (2005). "A possible unifying principle for mechanosensation." *Nature* 436(7051): 647-654.
- (164) Kurihara, K. (1990). "Molecular Mechanisms of Reception and Transduction in Olfaction and Taste." *The Japanese Journal of Physiology* 40(3): 305-324.
- (165) Kurihara, K., K. Yoshii and M. Kashiwayanagi (1986). "Transduction mechanisms in chemoreception." *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 85(1): 1-22.
- (166) Kusuhara, Y., R. Yoshida, T. Ohkuri, K. Yasumatsu, A. Voigt, S. Hubner, K. Maeda, U. Boehm, W. Meyerhof and Y. Ninomiya (2013). "Taste responses in mice lacking taste receptor subunit T1R1." *J Physiol* 591(Pt 7): 1967-1985.
- (167) Laffitte, A., F. Neiers and L. Briand (2014). "Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 17(4): 379-385.
- (168) Lalonde, E. R. and J. A. Eglitis (1961). "Number and distribution of taste buds on the epiglottis, pharynx, larynx, soft palate and uvula in a human newborn." *Anat Rec* 140: 91-95.
- (169) Laugerette, F., D. Gaillard, P. Passilly-Degrace, I. Niot and P. Besnard (2007). "Do we taste fat?" *Biochimie* 89(2): 265-269.
- (170) Laugerette, F., P. Passilly-Degrace, B. Patris, I. Niot, M. Febbraio, J. P. Montmayeur and P. Besnard (2005). "CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions." *J Clin Invest* 115(11): 3177-3184.
- (171) Lawson, H. (1995). *Food oils and fats: Technology, Utilization, and Nutrition.*, Chapman and Hall, New York, NY.
- (172) Lawton, D. M., D. N. Furness, B. Lindemann and C. M. Hackney (2000). "Localization of the glutamate-aspartate transporter, GLAST, in rat taste buds." *Eur J Neurosci* 12(9): 3163-3171.
- (173) Le Poul, E., C. Loison, S. Struyf, J. Y. Springael, V. Lannoy, M. E. Decobecq, S. Brezillon, V. Dupriez, G. Vassart, J. Van Damme, M. Parmentier and M. Detheux (2003). "Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation." *J Biol Chem* 278(28): 25481-25489.
- (174) Leonard, W. R., J. J. Snodgrass and M. L. Robertson (2010). *Evolutionary Perspectives on Fat Ingestion and Metabolism in Humans. Fat Detection: Taste, Texture, and Post Ingestive Effects.* J. P. Montmayeur and J. le Coutre. Boca Raton (FL).
- (175) Li, W. G. and T. L. Xu (2011). "ASIC3 channels in multimodal sensory perception." *ACS Chem Neurosci* 2(1): 26-37.
- (176) Li, X., L. Staszewski, H. Xu, K. Durick, M. Zoller and E. Adler (2002). "Human receptors for sweet and umami taste." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(7): 4692-4696.
- (177) Liang, N. C., A. Hajnal and R. Norgren (2006). "Sham feeding corn oil increases accumbens dopamine in the rat." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291(5): R1236-1239.
- (178) Liman, E. R., Y. V. Zhang and C. Montell (2014). "Peripheral coding of taste." *Neuron* 81(5): 984-1000.
- (179) Lin, W., C. A. Burks, D. R. Hansen, S. C. Kinnamon and T. A. Gilbertson (2004). "Taste receptor cells express pH-sensitive leak K⁺ channels." *J Neurophysiol* 92(5): 2909-2919.
- (180) Lindemann, B. (1996). "Taste reception." *Physiol Rev* 76(3): 718-766.
- (181) Lindemann, B. (2001). "Receptors and transduction in taste." *Nature* 413(6852): 219-225.
- (182) LopezJimenez, N. D., M. M. Cavenagh, E. Sainz, M. A. Cruz-Ithier, J. F. Battey and S. L. Sullivan (2006). "Two members of the TRPP family of ion channels, Pkd1l3 and Pkd2l1, are co-expressed in a subset of taste receptor cells." *J Neurochem* 98(1): 68-77.
- (183) Martin, C., P. Passilly-Degrace, M. Chevrot, D. Ancel, S. M. Sparks, D. J. Drucker and P. Besnard (2012). "Lipid-mediated release of GLP-1 by mouse taste buds from circumvallate papillae: putative involvement of GPR120 and impact on taste sensitivity." *J Lipid Res* 53(11): 2256-2265.
- (184) Marzo, V. D., M. Bifulco and L. D. Petrocellis (2004). "The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation." *Nat Rev Drug Discov* 3(9): 771-784.
- (185) Matsumoto, I., M. Ohmoto, M. Narukawa, Y. Yoshihara and K. Abe (2011). "Skn-1a (Pou2f3) specifies taste receptor cell lineage." *Nat Neurosci* 14(6): 685-687.
- (186) Matsumura, S., A. Eguchi, T. Mizushige, N. Kitabayashi, S. Tsuzuki, K. Inoue and T. Fushiki (2009). "Colocalization of GPR120 with phospholipase-C β 2 and α -gustducin in the taste bud cells in mice." *Neuroscience Letters* 450(2): 186-190.

- (187) Matsumura, S., A. Eguchi, Y. Okafuji, S. Tatsu, T. Mizushige, S. Tsuzuki, K. Inoue and T. Fushiki (2012). "Dietary fat ingestion activates beta-endorphin neurons in the hypothalamus." *FEBS Lett* 586(8): 1231-1235.
- (188) Matsumura, S., T. Mizushige, T. Yoneda, T. Iwanaga, S. Tsuzuki, K. Inoue and T. Fushiki (2007). "GPR expression in the rat taste bud relating to fatty acid sensing." *Biomed Res* 28(1): 49-55.
- (189) Matsuo, R. (2000). "Role of saliva in the maintenance of taste sensitivity." *Crit Rev Oral Biol Med* 11(2): 216-229.
- (190) Mattes, R. D. (2001). "Oral exposure to butter, but not fat replacers elevates postprandial triacylglycerol concentration in humans." *J Nutr* 131(5): 1491-1496.
- (191) Mattes, R. D. (2009a). "Oral detection of short-, medium-, and long-chain free fatty acids in humans." *Chem Senses* 34(2): 145-150.
- (192) Mattes, R. D. (2009b). "Oral thresholds and suprathreshold intensity ratings for free fatty acids on 3 tongue sites in humans: implications for transduction mechanisms." *Chem Senses* 34(5): 415-423.
- (193) Mattes, R. D. (2009c). "Is there a fatty acid taste?" *Annu Rev Nutr* 29: 305-327.
- (194) Mattes, R. D. (2011a). "Accumulating evidence supports a taste component for free fatty acids in humans." *Physiol Behav* 104(4): 624-631.
- (195) Mattes, R. D. (2011b). "Oral fatty acid signaling and intestinal lipid processing: support and supposition." *Physiol Behav* 105(1): 27-35.
- (196) Max, M., Y. G. Shanker, L. Huang, M. Rong, Z. Liu, F. Campagne, H. Weinstein, S. Damak and R. F. Margolskee (2001). "Tas1r3, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus Sac." *Nat Genet* 28(1): 58-63.
- (197) McCormack, D. N., V. L. Clyburn and D. W. Pittman (2006). "Detection of free fatty acids following a conditioned taste aversion in rats." *Physiol Behav* 87(3): 582-594.
- (198) McGaraughty, S., C. T. Wismer, C. Z. Zhu, J. Mikusa, P. Honore, K. L. Chu, C. H. Lee, C. R. Faltynek and M. F. Jarvis (2003). "Effects of A-317491, a novel and selective P2X3/P2X2/3 receptor antagonist, on neuropathic, inflammatory and chemogenic nociception following intrathecal and intraplantar administration." *Br J Pharmacol* 140(8): 1381-1388.
- (199) Medler, K. F., R. F. Margolskee and S. C. Kinnamon (2003). "Electrophysiological characterization of voltage-gated currents in defined taste cell types of mice." *J Neurosci* 23(7): 2608-2617.
- (200) Mehansho, H., S. Clements, B. T. Sheares, S. Smith and D. M. Carlson (1985). "Induction of proline-rich glycoprotein synthesis in mouse salivary glands by isoproterenol and by tannins." *J Biol Chem* 260(7): 4418-4423.
- (201) Mehansho, H., A. Hagerman, S. Clements, L. Butler, J. Rogler and D. M. Carlson (1983). "Modulation of proline-rich protein biosynthesis in rat parotid glands by sorghums with high tannin levels." *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(13): 3948-3952.
- (202) Mela, D. J. and C. M. Christensen (1987). "SENSORY ASSESSMENT OF OILINESS IN A LOW MOISTURE FOOD." *Journal of Sensory Studies* 2(4): 273-281.
- (203) Mese, H. and R. Matsuo (2007). "Salivary secretion, taste and hyposalivation." *Journal of Oral Rehabilitation* 34(10): 711-723.
- (204) Meyer-Gerspach, A. C., B. Wolnerhanssen and C. Beglinger (2014). "Gut sweet taste receptors and their role in metabolism." *Front Horm Res* 42: 123-133.
- (205) Meyerhof, W. (2005). "Elucidation of mammalian bitter taste." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 154: 37-72.
- (206) Meyerhof, W., C. Batram, C. Kuhn, A. Brockhoff, E. Chudoba, B. Bufe, G. Appendino and M. Behrens (2010). "The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors." *Chem Senses* 35(2): 157-170.
- (207) Meyerhof, W., M. Behrens, A. Brockhoff, B. Bufe and C. Kuhn (2005). "Human bitter taste perception." *Chem Senses* 30 Suppl 1: i14-15.
- (208) Meyerhof, W. and D. Richter (2006). "Signaling in chemosensory systems." *Cell Mol Life Sci* 63(13): 1461-1464.
- (209) Miller, I. J., Jr. (1986). "Variation in human fungiform taste bud densities among regions and subjects." *Anat Rec* 216(4): 474-482.
- (210) Milligan, G., L. A. Stoddart and N. J. Smith (2009). "Agonism and allosterism: the pharmacology of the free fatty acid receptors FFA2 and FFA3." *Br J Pharmacol* 158(1): 146-153.
- (211) Mindell, S., G. P. Smith and D. Greenberg (1990). "Corn oil and mineral oil stimulate sham feeding in rats." *Physiol Behav* 48(2): 283-287.
- (212) Mistretta, C. M. (1984). "Aging effects on anatomy and neurophysiology of taste and smell." *Gerodontology* 3(2): 131-136.
- (213) Mizushige, T., K. Inoue and T. Fushiki (2007). "Why is fat so tasty? Chemical reception of fatty acid on the tongue." *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 53(1): 1-4.
- (214) Montmayeur, J. P., S. D. Liberles, H. Matsunami and L. B. Buck (2001). "A candidate taste receptor gene near a sweet taste locus." *Nat Neurosci* 4(5): 492-498.

- (215) Moore, K., Q. Zhang, N. Murgolo, T. Hosted and R. Duffy (2009). "Cloning, expression, and pharmacological characterization of the GPR120 free fatty acid receptor from cynomolgus monkey: comparison with human GPR120 splice variants." *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 154(4): 419-426.
- (216) Morini, G., A. Bassoli and P. A. Temussi (2005). "From small sweeteners to sweet proteins: anatomy of the binding sites of the human T1R2_T1R3 receptor." *J Med Chem* 48(17): 5520-5529.
- (217) Motter, A. L. and G. P. Ahern (2012). "TRPA1 is a polyunsaturated fatty acid sensor in mammals." *PLoS One* 7(6): e38439.
- (218) Murray, R. G. (1993). "Cellular relations in mouse circumvallate taste buds." *Microsc Res Tech* 26(3): 209-224.
- (219) Nakamura, E., H. Uneyama and K. Torii (2013). "Gastrointestinal nutrient chemosensing and the gut-brain axis: significance of glutamate signaling for normal digestion." *J Gastroenterol Hepatol* 28 Suppl 4: 2-8.
- (220) Nasser, J. (2001). "Taste, food intake and obesity." *Obes Rev* 2(4): 213-218.
- (221) Nelson, G., J. Chandrashekar, M. A. Hoon, L. Feng, G. Zhao, N. J. Ryba and C. S. Zuker (2002). "An amino-acid taste receptor." *Nature* 416(6877): 199-202.
- (222) Nelson, G., M. A. Hoon, J. Chandrashekar, Y. Zhang, N. J. Ryba and C. S. Zuker (2001). "Mammalian sweet taste receptors." *Cell* 106(3): 381-390.
- (223) Nelson, G. M. and T. E. Finger (1993). "Immunolocalization of different forms of neural cell adhesion molecule (NCAM) in rat taste buds." *J Comp Neurol* 336(4): 507-516.
- (224) Nergiz-Unal, R., T. Rademakers, J. M. Cossemans and J. W. Heemskerk (2011). "CD36 as a multiple-ligand signaling receptor in atherothrombosis." *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 9(1): 42-55.
- (225) Newman, L., R. Haryono and R. Keast (2013). "Functionality of fatty acid chemoreception: a potential factor in the development of obesity?" *Nutrients* 5(4): 1287-1300.
- (226) Neyraud, E. (2014). "Role of saliva in oral food perception." *Monogr Oral Sci* 24: 61-70.
- (227) Neyraud, E., O. Palicki, C. Schwartz, S. Nicklaus and G. Feron (2012). "Variability of human saliva composition: possible relationships with fat perception and liking." *Arch Oral Biol* 57(5): 556-566.
- (228) Nie, Y., S. Vignes, J. R. Hobbs, G. L. Conn and S. D. Munger (2005). "Distinct contributions of T1R2 and T1R3 taste receptor subunits to the detection of sweet stimuli." *Curr Biol* 15(21): 1948-1952.
- (229) Nogueiras, R., A. Romero-Pico, M. J. Vazquez, M. G. Novelle, M. Lopez and C. Dieguez (2012). "The opioid system and food intake: homeostatic and hedonic mechanisms." *Obes Facts* 5(2): 196-207.
- (230) Norgren, R. (1978). "Projections from the nucleus of the solitary tract in the rat." *Neuroscience* 3(2): 207-218.
- (231) Norris, M. B., A. C. Noble and R. M. Pangborn (1984). "Human saliva and taste responses to acids varying in anions, titratable acidity, and pH." *Physiol Behav* 32(2): 237-244.
- (232) Northcutt, R. G. (2004). "Taste buds: development and evolution." *Brain Behav Evol* 64(3): 198-206.
- (233) Ohara, I., S. Otsuka and Y. Yugari (1988). "Cephalic phase response of pancreatic exocrine secretion in conscious dogs." *Am J Physiol* 254(3 Pt 1): G424-428.
- (234) Okamoto, M. and I. Dan (2013). "Extrinsic information influences taste and flavor perception: A review from psychological and neuroimaging perspectives." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 24(3): 247-255.
- (235) Olias, J., A. Pérez, J. Rios and L. Sanz (1993). "Aroma of virgin olive oil: Biogenesis of the "green" odor notes." *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 41: 2368-2373.
- (236) Ossebaard, C. A., I. A. Polet and D. V. Smith (1997). "Amiloride effects on taste quality: comparison of single and multiple response category procedures." *Chem Senses* 22(3): 267-275.
- (237) Ozdener, M. H., J. G. Brand, A. I. Spielman, F. W. Lischka, J. H. Teeter, P. A. Breslin and N. E. Rawson (2011). "Characterization of human fungiform papillae cells in culture." *Chem Senses* 36(7): 601-612.
- (238) Ozdener, M. H., S. Subramaniam, S. Sundaresan, O. Sery, T. Hashimoto, Y. Asakawa, P. Besnard, N. A. Abumrad and N. A. Khan (2014). "CD36- and GPR120-Mediated Ca²⁺ Signaling in Human Taste Bud Cells Mediates Differential Responses to Fatty Acids and Is Altered in Obese Mice." *Gastroenterology* 146(4): 995-1005.e1005.
- (239) Pagani, F., R. Garcia, R. Pariyarath, C. Stuaní, B. Gridelli, G. Paone and F. E. Baralle (1996). "Expression of lysosomal acid lipase mutants detected in three patients with cholesteryl ester storage disease." *Hum Mol Genet* 5(10): 1611-1617.
- (240) Parker, J. K. (2013). "The kinetics of thermal generation of flavour." *J Sci Food Agric* 93(2): 197-208.
- (241) Passilly-Degrace, P., M. Chevrot, A. Bernard, D. Ancel, C. Martin and P. Besnard (2014). "Is the taste of fat regulated?" *Biochimie* 96: 3-7.
- (242) Pelliccia, F., G. Marazzi, C. Greco, F. Franzoni, G. Speziale and C. Gaudio (2013). "Current evidence and future perspectives on n-3 PUFAs." *Int J Cardiol* 170(2 Suppl 1): S3-7.
- (243) Pepino, M. Y., O. Kuda, D. Samovski and N. A. Abumrad (2014). "Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism." *Annu Rev Nutr* 34: 281-303.
- (244) Pepino, M. Y., L. Love-Gregory, S. Klein and N. A. Abumrad (2012). "The fatty acid translocase gene CD36 and lingual lipase influence oral sensitivity to fat in obese subjects." *J Lipid Res* 53(3): 561-566.

- (245)** Perea-Martinez, I., T. Nagai and N. Chaudhari (2013). "Functional cell types in taste buds have distinct longevities." *PLoS One* 8(1): e53399.
- (246)** Perez, C. A., L. Huang, M. Rong, J. A. Kozak, A. K. Preuss, H. Zhang, M. Max and R. F. Margolskee (2002). "A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells." *Nat Neurosci* 5(11): 1169-1176.
- (247)** Peri, I., H. Mamrud-Brains, S. Rodin, V. Krizhanovsky, Y. Shai, S. Nir and M. Naim (2000). "Rapid entry of bitter and sweet tastants into liposomes and taste cells: implications for signal transduction." *Am J Physiol Cell Physiol* 278(1): C17-25.
- (248)** Perry, G. H., N. J. Dominy, K. G. Claw, A. S. Lee, H. Fiegler, R. Redon, J. Werner, F. A. Villanea, J. L. Mountain, R. Misra, N. P. Carter, C. Lee and A. C. Stone (2007). "Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation." *Nat Genet* 39(10): 1256-1260.
- (249)** Pittman, D. W., C. E. Labban, A. A. Anderson and H. E. O'Connor (2006). "Linoleic and oleic acids alter the licking responses to sweet, salt, sour, and bitter tastants in rats." *Chem Senses* 31(9): 835-843.
- (250)** Plucinski, T. M., M. Hamosh and P. Hamosh (1979). "Fat digestion in rat: role of lingual lipase." *Am J Physiol* 237(6): E541-547.
- (251)** Prandi, S., M. Bromke, S. Hubner, A. Voigt, U. Boehm, W. Meyerhof and M. Behrens (2013). "A subset of mouse colonic goblet cells expresses the bitter taste receptor Tas2r131." *PLoS One* 8(12): e82820.
- (252)** Pumplun, D. W., C. Yu and D. V. Smith (1997). "Light and dark cells of rat vallate taste buds are morphologically distinct cell types." *J Comp Neurol* 378(3): 389-410.
- (253)** Ramirez, I. (1993). "Role of olfaction in starch and oil preference." *Am J Physiol* 265(6 Pt 2): R1404-1409.
- (254)** Ramirez, I. (1994). "Chemosensory similarities among oils: does viscosity play a role?" *Chem Senses* 19(2): 155-168.
- (255)** Reimann, F., G. Tolhurst and F. M. Gribble (2012). "G-protein-coupled receptors in intestinal chemosensation." *Cell Metab* 15(4): 421-431.
- (256)** Reiner, D. J., T. A. Jan, J. D. Boughter, Jr., C. X. Li, L. Lu, R. W. Williams and R. S. Waters (2008). "Genetic analysis of tongue size and taste papillae number and size in recombinant inbred strains of mice." *Chem Senses* 33(8): 693-707.
- (257)** Richter, T. A., G. A. Dvoryanchikov, N. Chaudhari and S. D. Roper (2004). "Acid-sensitive two-pore domain potassium (K2P) channels in mouse taste buds." *J Neurophysiol* 92(3): 1928-1936.
- (258)** Rolls, E. and T. Scott (Doty RL) (2003b). *Central taste anatomy and neurophysiology*. USA, Marcel Dekker Inc.
- (259)** Rolls, E. T. (2004). "Smell, taste, texture, and temperature multimodal representations in the brain, and their relevance to the control of appetite." *Nutr Rev* 62(11 Pt 2): S193-204; discussion S224-141.
- (260)** Rolls, E. T., J. V. Verhagen and M. Kadohisa (2003a). "Representations of the texture of food in the primate orbitofrontal cortex: neurons responding to viscosity, grittiness, and capsaicin." *J Neurophysiol* 90(6): 3711-3724.
- (261)** Romanov, R. A., O. A. Rogachevskaja, M. F. Bystrova, P. Jiang, R. F. Margolskee and S. S. Kolesnikov (2007). "Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells." *EMBO J* 26(3): 657-667.
- (262)** Roper, S. D. (2007). "Signal transduction and information processing in mammalian taste buds." *Pflugers Arch* 454(5): 759-776.
- (263)** Roper, S. D. (2013). "Taste buds as peripheral chemosensory processors." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 24(1): 71-79.
- (264)** Roper, S. D. (2013). "Taste buds as peripheral chemosensory processors." *Semin Cell Dev Biol* 24(1): 71-79.
- (265)** Roudnitzky, N., B. Bufe, S. Thalmann, C. Kuhn, H. C. Gunn, C. Xing, B. P. Crider, M. Behrens, W. Meyerhof and S. P. Wooding (2011). "Genomic, genetic and functional dissection of bitter taste responses to artificial sweeteners." *Hum Mol Genet* 20(17): 3437-3449.
- (266)** Roura, E., A. Aldayyani, P. Thavaraj, S. Prakash, D. Greenway, W. G. Thomas, W. Meyerhof, N. Roudnitzky and S. R. Foster (2015). "Variability in Human Bitter Taste Sensitivity to Chemically Diverse Compounds Can Be Accounted for by Differential TAS2R Activation." *Chem Senses* 40(6): 427-435.
- (267)** Roussel, A., S. Canaan, M. P. Egloff, M. Riviere, L. Dupuis, R. Verger and C. Cambillau (1999). "Crystal structure of human gastric lipase and model of lysosomal acid lipase, two lipolytic enzymes of medical interest." *J Biol Chem* 274(24): 16995-17002.
- (268)** Roussel, A., N. Miled, L. Berti-Dupuis, M. Riviere, S. Spinelli, P. Berna, V. Gruber, R. Verger and C. Cambillau (2002). "Crystal structure of the open form of dog gastric lipase in complex with a phosphonate inhibitor." *J Biol Chem* 277(3): 2266-2274.
- (269)** Running, C. A. and R. D. Mattes (2014). "Different oral sensitivities to and sensations of short-, medium-, and long-chain fatty acids in humans." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 307(3): G381-389.
- (270)** Running, C. A., R. D. Mattes and R. M. Tucker (2013). "Fat taste in humans: Sources of within- and between-subject variability." *Progress in Lipid Research* 52(4): 438-445.
- (271)** Sainz, E., J. N. Korley, J. F. Battey and S. L. Sullivan (2001). "Identification of a novel member of the T1R family of putative taste receptors." *J Neurochem* 77(3): 896-903.

- (272) 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): R792-794.
- (273) Schiffman, S. S., M. G. Lindley, T. B. Clark and C. Makino (1981). "Molecular mechanism of sweet taste: relationship of hydrogen bonding to taste sensitivity for both young and elderly." *Neurobiol Aging* 2(3): 173-185.
- (274) Sclafani, A. and K. Ackroff (2014). "Maltodextrin and fat preference deficits in "taste-blind" P2X2/P2X3 knockout mice." *Chem Senses* 39(6): 507-514.
- (275) Sclafani, A., K. Ackroff and N. A. Abumrad (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): R1823-1832.
- (276) Swards, T. V. and M. A. Swards (2001). "Cortical association areas in the gustatory system." *Neurosci Biobehav Rev* 25(5): 395-407.
- (277) Shin, Y. K., B. Martin, E. Golden, C. D. Dotson, S. Maudsley, W. Kim, H. J. Jang, M. P. Mattson, D. J. Drucker, J. M. Egan and S. D. Munger (2008). "Modulation of taste sensitivity by GLP-1 signaling." *J Neurochem* 106(1): 455-463.
- (278) Simons, P. J., J. A. Kummer, J. J. Luiken and L. Boon (2011). "Apical CD36 immunolocalization in human and porcine taste buds from circumvallate and foliate papillae." *Acta Histochem* 113(8): 839-843.
- (279) Small, D. M. (2006). "Central gustatory processing in humans." *Adv Otorhinolaryngol* 63: 191-220.
- (280) Smith, D. V. and C. H. Lemon (2007). *Neural Coding in the rNST. The Role of the Nucleus of the Solitary Tract in Gustatory Processing*. R. M. Bradley. Boca Raton (FL).
- (281) Spector, A. C. (2000). "Linking gustatory neurobiology to behavior in vertebrates." *Neurosci Biobehav Rev* 24(4): 391-416.
- (282) Spence, C. (2013). "Multisensory flavour perception." *Current Biology* 23(9): R365-R369.
- (283) Spielman, A. I. (1990). "Interaction of saliva and taste." *J Dent Res* 69(3): 838-843.
- (284) Spielman, A. I., S. D'Abundo, R. B. Field and H. Schmale (1993). "Protein analysis of human von Ebner saliva and a method for its collection from the foliate papillae." *J Dent Res* 72(9): 1331-1335.
- (285) Steiner, J. E., D. Glaser, M. E. Hawilo and K. C. Berridge (2001). "Comparative expression of hedonic impact: affective reactions to taste by human infants and other primates." *Neurosci Biobehav Rev* 25(1): 53-74.
- (286) Stevens, D. R., R. Seifert, B. Bufe, F. Muller, E. Kremmer, R. Gauss, W. Meyerhof, U. B. Kaupp and B. Lindemann (2001). "Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli." *Nature* 413(6856): 631-635.
- (287) Stewart, J. E., C. Feinle-Bisset, M. Golding, C. Delahunty, P. M. Clifton and R. S. Keast (2010). "Oral sensitivity to fatty acids, food consumption and BMI in human subjects." *Br J Nutr* 104(1): 145-152.
- (288) Stewart, J. E., C. Feinle-Bisset and R. S. Keast (2011). "Fatty acid detection during food consumption and digestion: Associations with ingestive behavior and obesity." *Prog Lipid Res* 50(3): 225-233.
- (289) Stewart, J. E. and R. S. Keast (2012). "Recent fat intake modulates fat taste sensitivity in lean and overweight subjects." *Int J Obes (Lond)* 36(6): 834-842.
- (290) Stewart, J. E., L. P. Newman and R. S. Keast (2011). "Oral sensitivity to oleic acid is associated with fat intake and body mass index." *Clin Nutr* 30(6): 838-844.
- (291) Stewart, J. E., R. V. Seimon, B. Otto, R. S. Keast, P. M. Clifton and C. Feinle-Bisset (2011). "Marked differences in gustatory and gastrointestinal sensitivity to oleic acid between lean and obese men." *Am J Clin Nutr* 93(4): 703-711.
- (292) Storch, U., M. Mederos y Schnitzler and T. Gudermann (2012). "G protein-mediated stretch reception." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302(6): H1241-1249.
- (293) Stratford, J. M., K. S. Curtis and R. J. Contreras (2006). "Chorda tympani nerve transection alters linoleic acid taste discrimination by male and female rats." *Physiol Behav* 89(3): 311-319.
- (294) Taha, S. A. (2010). "Preference or fat? Revisiting opioid effects on food intake." *Physiol Behav* 100(5): 429-437.
- (295) Takami, S., T. V. Getchell, S. K. McLaughlin, R. F. Margolskee and M. L. Getchell (1994). "Human taste cells express the G protein alpha-gustducin and neuron-specific enolase." *Brain Res Mol Brain Res* 22(1-4): 193-203.
- (296) Temussi, P. A. (2002). "Why are sweet proteins sweet? Interaction of brazzein, monellin and thaumatin with the T1R2-T1R3 receptor." *FEBS Lett* 526(1-3): 1-4.
- (297) Tepper, B. J. (1998). "6-n-Propylthiouracil: a genetic marker for taste, with implications for food preference and dietary habits." *Am J Hum Genet* 63(5): 1271-1276.
- (298) Tepper, B. J. (2012). "The Taste for Fat: New Discoveries on the Role of Fat in Sensory Perception, Metabolism, Sensory Pleasure, and Beyond." *J Food Sci* 77(3): vi-vi.
- (299) Tepper, B. J. and R. J. Nurse (1997). "Fat perception is related to PROP taster status." *Physiol Behav* 61(6): 949-954.
- (300) Tomchik, S. M., S. Berg, J. W. Kim, N. Chaudhari and S. D. Roper (2007). "Breadth of tuning and taste coding in mammalian taste buds." *J Neurosci* 27(40): 10840-10848.

- (301)** Toulza, E., N. R. Mattiuzzo, M. F. Galliano, N. Jonca, C. Dossat, D. Jacob, A. de Daruvar, P. Wincker, G. Serre and M. Guerrin (2007). "Large-scale identification of human genes implicated in epidermal barrier function." *Genome Biol* 8(6): R107.
- (302)** Tsuruta, M., T. Kawada, T. Fukuwatari and T. Fushiki (1999). "The orosensory recognition of long-chain fatty acids in rats." *Physiol Behav* 66(2): 285-288.
- (303)** Tucker, R. M. and R. D. Mattes (2012). "Are free fatty acids effective taste stimuli in humans? Presented at the symposium "The Taste for Fat: New Discoveries on the Role of Fat in Sensory Perception, Metabolism, Sensory Pleasure and Beyond" held at the iNstitute of Food Technologists 2011 Annual Meeting, New Orleans, LA, June 12, 2011." *J Food Sci* 77(3): S148-151.
- (304)** Tvrzicka, E., L. S. Kremmyda, B. Stankova and A. Zak (2011). "Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions." *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 155(2): 117-130.
- (305)** Ugawa, S., Y. Minami, W. Guo, Y. Saishin, K. Takatsuji, T. Yamamoto, M. Tohyama and S. Shimada (1998). "Receptor that leaves a sour taste in the mouth." *Nature* 395(6702): 555-556.
- (306)** Ulven, T. and E. Christiansen (2015). "Dietary Fatty Acids and Their Potential for Controlling Metabolic Diseases Through Activation of FFA4/GPR120." *Annu Rev Nutr* 35: 239-263.
- (307)** Vallejo-Gracia, A., J. Bielanska, J. Hernandez-Losa, J. Castellvi, M. C. Ruiz-Marcellan, S. Ramon y Cajal, E. Condom, J. Manils, C. Soler, N. Comes, J. C. Ferreres and A. Felipe (2013). "Emerging role for the voltage-dependent K⁺ channel Kv1.5 in B-lymphocyte physiology: expression associated with human lymphoma malignancy." *J Leukoc Biol* 94(4): 779-789.
- (308)** Vandenbeuch, A., C. B. Anderson and S. C. Kinnamon (2015). "Mice Lacking Pannexin 1 Release ATP and Respond Normally to All Taste Qualities." *Chem Senses*.
- (309)** Vandenbeuch, A. and S. C. Kinnamon (2009). "Why do taste cells generate action potentials?" *J Biol* 8(4): 42.
- (310)** Vandenbeuch, A., E. D. Larson, C. B. Anderson, S. A. Smith, A. P. Ford, T. E. Finger and S. C. Kinnamon (2014). "Postsynaptic P2X₃-containing receptors in gustatory nerve fibres mediate responses to all taste qualities in mice." *J Physiol*.
- (311)** Vandenbeuch, A., R. Zorec and S. C. Kinnamon (2010). "Capacitance measurements of regulated exocytosis in mouse taste cells." *J Neurosci* 30(44): 14695-14701.
- (312)** Verhagen, J. V., E. T. Rolls and M. Kadohisa (2003). "Neurons in the primate orbitofrontal cortex respond to fat texture independently of viscosity." *J Neurophysiol* 90(3): 1514-1525.
- (313)** Voigt, N., J. Stein, M. M. Galindo, A. Dunkel, J. D. Raguse, W. Meyerhof, T. Hofmann and M. Behrens (2014). "The role of lipolysis in human orosensory fat perception." *J Lipid Res* 55(5): 870-882.
- (314)** Wang, J., X. Wu, N. Simonavicius, H. Tian and L. Ling (2006). "Medium-chain fatty acids as ligands for orphan G protein-coupled receptor GPR84." *J Biol Chem* 281(45): 34457-34464.
- (315)** Wellendorph, P., L. D. Johansen and H. Brauner-Osborne (2010). "The emerging role of promiscuous 7TM receptors as chemosensors for food intake." *Vitam Horm* 84: 151-184.
- (316)** WHO (World Health Organisation) (2014). "Obesity and Overweight (Facts sheet no. 311)." 2014, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/#march2013>.
- (317)** Wooding, S., H. Gunn, P. Ramos, S. Thalmann, C. Xing and W. Meyerhof (2010). "Genetics and bitter taste responses to goitrin, a plant toxin found in vegetables." *Chem Senses* 35(8): 685-692.
- (318)** Wooding, S., U. K. Kim, M. J. Bamshad, J. Larsen, L. B. Jorde and D. Drayna (2004). "Natural selection and molecular evolution in PTC, a bitter-taste receptor gene." *Am J Hum Genet* 74(4): 637-646.
- (319)** Wu, C., L. Du, L. Zou, L. Zhao, L. Huang and P. Wang (2014). "Recent advances in taste cell- and receptor-based biosensors." *Sensors and Actuators B: Chemical* 201(0): 75-85.
- (320)** Wyatt, S. B., K. P. Winters and P. M. Dubbert (2006). "Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem." *Am J Med Sci* 331(4): 166-174.
- (321)** Xu, H., J. Montez, S. Gravina, M. Dewis, T. Yu, B. P. Shah and T. A. Gilbertson (2009). Functional characterization of two fatty acid activated GPCRs expressed in the mammalian gustatory system. ACHEMS 31st Annual Meeting. Sarasota, Florida, USA.
- (322)** Xu, H., L. Staszewski, H. Tang, E. Adler, M. Zoller and X. Li (2004). "Different functional roles of T1R subunits in the heteromeric taste receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(39): 14258-14263.
- (323)** Yamaguchi, T., A. Tsuru and H. Washio (1987). "L-glutamate and potassium-induced contractures in denervated cockroach muscles." *Comp Biochem Physiol C* 87(2): 401-407.
- (324)** Yamamoto, K. and Y. Ishimaru (2013). "Oral and extra-oral taste perception." *Semin Cell Dev Biol* 24(3): 240-246.
- (325)** Yamamoto, K., Y. Ishimaru, M. Ohmoto, I. Matsumoto, T. Asakura and K. Abe (2011). "Genetic tracing of the gustatory neural pathway originating from Pkd1l3-expressing type III taste cells in circumvallate and foliate papillae." *J Neurochem* 119(3): 497-506.

- (326) Yang, R., H. H. Crowley, M. E. Rock and J. C. Kinnamon (2000). "Taste cells with synapses in rat circumvallate papillae display SNAP-25-like immunoreactivity." *J Comp Neurol* 424(2): 205-215.
- (327) Yarmolinsky, D. A., C. S. Zuker and N. J. Ryba (2009). "Common sense about taste: from mammals to insects." *Cell* 139(2): 234-244.
- (328) Yoshida, R., K. Yasumatsu, S. Shirosaki, M. Jyotaki, N. Horio, Y. Murata, N. Shigemura, K. Nakashima and Y. Ninomiya (2009). "Multiple receptor systems for umami taste in mice." *Ann N Y Acad Sci* 1170: 51-54.
- (329) Yu, P., A. S. Yeo, M. Y. Low and W. Zhou (2014). "Identifying key non-volatile compounds in ready-to-drink green tea and their impact on taste profile." *Food Chem* 155: 9-16.
- (330) Yu, T., B. Shah, D. Hansen, M. Park-York and T. Gilbertson (2012). "Activation of oral trigeminal neurons by fatty acids is dependent upon intracellular calcium." *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 464(2): 227-237.
- (331) Yu, T., B. P. Shah, D. R. Hansen, M. Park-York and T. A. Gilbertson (2012). "Activation of oral trigeminal neurons by fatty acids is dependent upon intracellular calcium." *Pflugers Arch* 464(2): 227-237.
- (332) Zhang, D. and P. S. Leung (2014). "Potential roles of GPR120 and its agonists in the management of diabetes." *Drug Des Devel Ther* 8: 1013-1027.
- (333) Zhang, F., B. Klebansky, R. M. Fine, H. Xu, A. Pronin, H. Liu, C. Tachdjian and X. Li (2008). "Molecular mechanism for the umami taste synergism." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(52): 20930-20934.
- (334) Zhang, Y., M. A. Hoon, J. Chandrashekar, K. L. Mueller, B. Cook, D. Wu, C. S. Zuker and N. J. Ryba (2003). "Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways." *Cell* 112(3): 293-301.
- (335) Zhang, Y., M. A. Hoon, J. Chandrashekar, K. L. Mueller, B. Cook, D. Wu, C. S. Zuker and N. J. P. Ryba (2003). "Coding of Sweet, Bitter, and Umami Tastes: Different Receptor Cells Sharing Similar Signaling Pathways." *Cell* 112(3): 293-301.
- (336) Zhao, G. Q., Y. Zhang, M. A. Hoon, J. Chandrashekar, I. Erlenbach, N. J. Ryba and C. S. Zuker (2003). "The receptors for mammalian sweet and umami taste." *Cell* 115(3): 255-266.
- (337) Zubare-Samuelov, M., M. E. Shaul, I. Peri, A. Aliluiko, O. Tirosh and M. Naim (2005). "Inhibition of signal termination-related kinases by membrane-permeant bitter and sweet tastants: potential role in taste signal termination." *Am J Physiol Cell Physiol* 289(2): C483-492.

Anhang

A1 Einleitung	A2
A1.1 Fettsäuregehalt in ausgewählten Nahrungsmitteln	A2
A2 Material	A3
A2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	A3
A2.2 Lösungen und Puffer	A4
A2.3 Kits	A8
A2.4 Antikörper	A8
A2.5 Oligonukleotide, Sonden und Nukleinsäure-Größenstandards	A11
A2.6 Plasmide	A13
A2.7 Enzyme	A13
A2.8 Humanes Biopsiematerial	A13
A2.9 Humane Zellen und Materialien für deren Kultivierung	A14
A2.10 Bakterienstämme, Medien, und Materialien für deren Kultivierung	A14
A2.11 Versuchstiere und Materialien für deren Haltung	A15
A2.12 Software	A15
A2.13 Geräte	A16
A3 Ergebnisse	A17
A3.1 Fettsäuresensitive Rezeptoren	A17
A3.1.1 Immunhisto- und -zytochemische Kontrollen	A17
A3.2 Lipolytische Enzyme	A18
A3.2.1 Sequenzen der Lipase-Vektorkonstrukte zur Herstellung der RNA-Sonden für die ISH.	A18
A3.2.2 Analyse auf mögliche Transmembrandomänen der Lipasen	A22
A3.2.3 Analyse der Lipase-Proteinsequenz auf Signalpeptidschnittstellen	A21
A3.2.4 Analyse auf postrtranslationale Modifikationssignale in der AS-Sequenz der Lipasen.	A22
A3.2.5 Vorhergesagte Tertiärstruktur der Lipasen	A24
A3.2.6 Sequenzen der PCR-Produkte von Lipase-N-Varianten.	A24
A3.3 Neuronale Weiterleitung	A25
A3.3.1 Vergleich des Leckverhaltens gegenüber Wasser und Gummi-arabicum-Lösung	A25

A1 Einleitung

A1.1 Fettsäuregehalt in ausgewählten Nahrungsmitteln

Tab. 8: Fett- und Fettsäuregehalt ausgewählter Nahrungsmittel.*

Angegeben ist der Fett- [g] und Fettsäuregehalt [mg] je 100g essbaren Anteils des Nahrungsmittels.

Nahrungsmittel		FG	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	EPA	DHA	AA
Tierische Nahrungsmittel	Butter	83	22500	8480	18500	1230	440			115
	Gänsefett	100	20600	6200	54900	9350	1190			
	Schweineschmalz	100	23700	13200	40600	9100	1000			
	Vollmilch 3,5 %	3,6	880	380	865	60	30			
	Camembert 50 %	25,7	7340	2860	6220	450	195			
	Fetakäse 45 %	18,1	3900	1510	3440	440	220			
	Gorgonzola	19,4	7840	3510	7130	765	120			
	Mozzarella (Kuhmilch)	16,1	5080	2030	4050	350	140			
	Speisequark 20 %	5,1	1430	560	1200	105	30			
	Tilsiter 45 %	27,7	8000	2400	6160	465	210			
	Rinderfilet	8,1	2190	1010	3320	170	100			
	Schweinefilet	2,0	510	240	850	100	20			
	Kochschweineschinken	3,7	845	420	1580	250	40			50
	Leberwurst	29	6920	3950	13800	1190	460			200
	Eigelb	31,9	6900	2140	11700	4750	260		180	210
	Gans	31,0	6390	2140	15400	3070	190			
	Huhn	9,6	1880	630	2700	1880	110	7	105	225
	Hering	17,8	1870	155	1730	150	60	2040	680	35
	Scholle	1,9	300	80	150	40	6	250	195	55
Lachs	13,6	1780	355	2720	430	355	750	1860	190	
Garnelen	1,4	190	105	110	60	8	205	160	70	
Pflanzliche Nahrungsmittel	Leinöl	100	5950	3600	18200	13900	54200			
	Maiskeimöl	100	10900	1820	25800	55300	930			
	Olivenöl	100	10800	2750	69400	8280	855			
	Rapsöl	100	4610	1520	52600	22300	9150			
	Sojaöl	100	10400	3620	18900	53100	7700			
	Sonnenblumenöl	100	6150	4410	19900	63000	500			
	Standardmargarine	80	12200	7800	26800	17600	1900			
	Apfel	0,6	125	40	18	200	45			
	Kirsche (süß)	0,3	50	17	85	45	45			
	Kartoffel	0,1	19	4	2	30	25			
	Blumenkohl	0,3	40	2	2	30	110			
	Kopfsalat	0,2	35	4	5	50	70			
	Erbsen	0,5	95	6	35	245	50			
	Spargel	0,2	30	1	2	70	6			
	Tomaten	1,2	30	5	25	90	9			
	Sojabohne	18	1730	610	3980	9800	930			
	Avocado	23,5	1790	105	15	1660	165			
	Oliven	13,9	1500	330	10000	1120	130			
	Haferflocken	7	1150	100	2690	2550	90			
	Mais	3,8	470	90	1100	1630	40			
Roggen (Korn)	1,7	290	20	410	750	65				
Cashewnuss	42,2	4060	3220	24400	7150	150				
Erdnuss	48,1	5100	1300	22100	13900	530				
Macadamia	73,0	5760	1610	14800	40800	1740				
Walnuss	62,5	4370	1350	10800	34200	7490				

* aus [Souci, Fachmann, Kraut: Lebensmitteltabelle für die Praxis, 2004]

FG – Fettgehalt

A2 Material

A2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien wurden im höchsten Reinheitsgrad von den angegebenen Firmen bezogen. Experimentelle Analysen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit doppelt deionisiertem Wasser (ddH₂O) durchgeführt, welches über das Wasserreinigungssystem *ultra clear basic* (SG Wasseraufbereitung und Regenerierung GmbH; Barsbüttel, D) gewonnen wurde. Verbrauchsmaterialien wie Glaswaren, Plastikwaren und ähnliches wurden von den Firmen Sarstedt, Eppendorf, Nerbepius, VWR oder Roth bezogen.

Tab. 9: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Agarose, UltraPure	Invitrogen, Life Technologies; Darmstadt, D
Agarose, Wide Range	SERVA; Heidelberg, D
BCIP 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat in Dimethylformamid 50 mg/ml	Roche Applied Sciences; Mannheim, D
Rinderserumalbumin	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Bromphenolblau, Natriumsalz	USB Corp.; Cleveland, OH, USA
Chlorhydrat	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Chloroform	Merck KgaA; Darmstadt, D
Concanavalin A	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
DAPI 4',6-Diamidin-2-phenylindol	Invitrogen; Life Technologies; Darmstadt, D
Denhardts Reagenz	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
DEPC Diethylpyrocarbonat	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Dextransulfat	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Dinatriumhydrogenphosphat Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
DMSO Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
dNTPs Desoxyribonukleotridiphosphate	Invitrogen, Life Technologies; Darmstadt, D
EDTA Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Einbettmedium DAKO für Fluoreszenzfärbungen	DAKO Deutschland GmbH; Hamburg, D
Einbettmedium DPX	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Einbettmedium Vectastain	Vector Laboratories; Burlingame, USA
Eisessig	Merck KgaA; Darmstadt, D
Eosin	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Essigsäureanhydrid	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Ethanol EtOH	Merck KGaA; Darmstadt, D
Ethidiumbromid EtBr, 10 mg/ml wässrige Lösung	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Ficoll	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Formamid	Roche Applied Sciences; Mannheim, D
Gelatine	Roth; Karlsruhe, D
Gewebe-Einfriermedium R. Jung	Leica Microsystems Nussloch GmbH; Nussloch, D
Glycerin	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Hefe-tRNA	Roche Applied Sciences; Mannheim, D
Heringsperma-DNA	Roche Applied Sciences; Mannheim, D
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Isopropanol (2-Propanol)	Merck KgaA; Darmstadt, D
Kaliumalaun	Roth; Karlsruhe, D
<i>Tabelle wird fortgesetzt...</i>	

Fortsetzung Tabelle 9

Lithiumchlorid LiCl	Merck KgaA; Darmstadt, D
Magnesiumchlorid MgCl ₂	Merck KgaA; Darmstadt, D
Maleinsäure	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Methanol MeOH	Merck KgaA; Darmstadt, D
MOPS, 3-(N-morpholino)propansulfonsäure	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Natriumacetat NaAc, wasserfrei	Merck KgaA; Darmstadt, D
Natriumchlorid NaCl	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Natriumdodecylsulfat SDS	Roth; Karlsruhe, D
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Natriumhydroxid NaOH	Merck KgaA; Steinheim, D
NBT Nitroblau-Tetrazoliumchlorid, 100 ng/ml in 70 % Dimethylformamid	Roche Applied Science; Mannheim, D
PFA Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Pferdeserum	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
PIPES	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Polyvinylpyrrolidon	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Random Primer	Invitrogen Life Technologies; Darmstadt, D
Rotihistol	Roth; Karlsruhe, D
Salzsäure HCl, rauchend, 37 %	Roth; Karlsruhe, D
Triethanolamin	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Tris-Base	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Tris-HCl	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
TRizol-Reagenz	Ambion, Life Technologies; Darmstadt, D
Wasserstoffperoxid H ₂ O ₂ , 30 % (w/w)	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Xylol	Roth; Karlsruhe, D
Zitronensäure, wasserfrei	Sigma-Aldrich; Steinheim, D

A2.2 Lösungen und Puffer

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Substanzen in doppelt deionisiertem Wasser (ddH₂O) gelöst, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert. Der pH-Wert wurde mit HCl- bzw. NaOH-Lösung eingestellt.

- **Lösungen für die Agarosegelelektrophorese**

50x TAE-Puffer

2 M Tris
100 mM Eisessig
50 mM EDTA

Laufpuffer

1xTAE
0,06 µg/ml Ethidiumbromid

Agarosegellösung

1-2 % (w/v) Agarose
(je nach aufzutrennenden Fragmentgrößen)
0,06 µg/ml Ethidiumbromid
in 1xTAE

Die Agarose wurde durch mehrmaliges aufkochen gelöst, mit Ethidiumbromid versetzt und zum erkalten in eine Gelkammer gegossen. Beim Aufkochen verdunstete Flüssigkeit wurde durch ddH₂O ersetzt.

6x Ladebuffer

10 mM Tris-HCl (pH 7,6)
0,03 % (w/v) Bromphenolblau
60 % (v/v) Glycerin
60 mM EDTA

Diese Lösung wurde nicht autoklaviert, jedoch als 1-ml-Aliquots bei -20 °C gelagert.

Agarosegellösung, denaturierend

1,5 % (w/v) Agarose
2,5 ml 10xMOPS-Puffer
ad 25 ml DEPC-H₂O
425 µl Formaldehydlösung
Die Agarose wurde durch mehrmaliges Aufkochen gelöst und zum Erkalten in eine Gelkammer gegossen. Beim Aufkochen verdunstete Flüssigkeit wurde durch ddH₂O ersetzt.

- **Lösungen für Klonierungsexperimente**

Tris-EDTA-LiCl-Triton-Puffer

50 mM Tris-HCl (pH 7,5)
62,5 mM EDTA (pH 7,5)
2,5 M LiCl
0,4 % (v/v) TritonX-100

- **Lösungen für histochemische Methoden**

Mayers Hämalaun

1 g Hämatoxylin
0,2 g Natriumjodid
50 g Kaliumalaun
50 g Chlorhydrat
1 g Zitronensäure, wasserfrei
gelöst in 1000 ml ddH₂O
Diese Lösung wurde nicht autoklaviert, jedoch vor Benutzung gefiltert.

Eosin

1 g Eosin
gelöst in 1000 ml ddH₂O
Diese Lösung wurde nicht autoklaviert, jedoch vor Benutzung filtriert und dunkel gelagert.

Laufpuffer, denaturierend

15 ml 10x MOPS-Puffer
3 ml Formaldehydlösung
ad 150 ml DEPC-H₂O

10x MOPS-Puffer

41,9 g MOPS, freie Säure
6,8 g Natriumacetat
0,5 M EDTA (pH 8,0)
ad 1000 ml DEPC-H₂O
pH 7,0

5x PBS

0,4 M Na₂HPO₄
0,325 M NaCl
0,1 M NaH₂PO₄
pH 7,4

4 % Paraformaldehyd-Fixierlösung

4 % (w/v) Paraformaldehyd
4 µM NaOH
gelöst in 1xPBS
pH 7,2
5xPBS wurde dabei erst zur Lösung gegeben, nachdem sich das Paraformaldehydpulver unter Rühren bei 50 °C in ddH₂O/NaOH gelöst hatte. Der pH-Wert wurde nach Abkühlen der Lösung eingestellt. Diese Lösung wurde frisch hergestellt oder bei -20 °C gelagert.

PBS-Blockierpuffer

5 % (v/v) Pferdeserum

0,5 % (v/v) Triton X-100

Diese Lösung wurde stets frisch hergestellt.

PBS-Antikörperpuffer

5 % (v/v) Pferdeserum

0,2 % (w/v) Triton X-100

gelöst in 1xPBS

Diese Lösung wurde stets frisch hergestellt.

Natriumcitrat-Puffer (Antigen-Retrieval-Puffer)

0,01 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat

pH 6,0

Diese Lösung wurde stets frisch hergestellt.

10x TBS

24,2 g Tris-Base

80,0 g NaCl

ad 1000 ml ddH₂O

pH 7,6

**Methanol-Peroxidase-Blockierpuffer
(DAB-Protokoll)**

3 % (v/v) Methanol

0,1 % (v/v) H₂O₂

gelöst in 1xTBS

Diese Lösung wurde stets frisch hergestellt.

TBS-Gelatine-Triton-Lösung

0,1 % (w/v) Gelatine

0,2 % (v/v) Triton-X-100

gelöst in 1xTBS

Diese Lösung wurde stets frisch hergestellt.

TBS-Blockierpuffer

3 % (v/v) Pferdeserum

gelöst in 1xTBS

Diese Lösung wurde stets frisch hergestellt.

TBS-Antikörperpuffer

3 % (v/v) Pferdeserum

gelöst in 1xTBS

Diese Lösung wurde stets frisch hergestellt.

ABC-Reaktionslösung

(laut Herstellerangaben)

2 Tropfen Substanz A

2 Tropfen Substanz B

gelöst in 5 ml ddH₂O

Diese Lösung wurde stets frisch hergestellt.

DAB-Reaktionslösung

(angepasst nach Herstellerangaben)

2 Tropfen Pufferlösung

2 Tropfen DAB

2 Tropfen H₂O₂

gelöst in 5 ml H₂O

Diese Lösung wurde stets frisch hergestellt.

TBS-Triton-Puffer

0,2 % (v/v) Triton X-100

gelöst in 1xTBS

Diese Lösung wurde stets frisch hergestellt.

**Methanol-Peroxidase-Blockierpuffer
(Fluorescein-Protokoll)**

3 % (v/v) H₂O₂ gelöst in reinem Methanol

Diese Lösung wurde stets frisch gekühlt.

TNT

0,1 M Tris-HCl (pH 7,5)

0,15 M NaCl

0,05 % Tween 20

TNB-Lösung

(nach Herstellerangaben Vector Laboratories)

0,1 M Tris-HCl (pH 7,5)

0,15 M NaCl

0,5 % (w/v) Blockierreagenz (TNB)

Diese Lösung wurde nicht autoklaviert und bei -20°C gelagert. Sie wurde frisch aufgetaut und nicht wieder eingefroren. TNB ist Bestandteil des „Peroxidase Substrate Kit DAB“ bzw. des „Fluorescein-Tyramid Signal Amplification Kit“.

- **Lösungen für die Immunzytochemie**

Aceton-Methanol-Fixierlösung

50 % (v/v) Aceton
 50 % (v/v) Methanol
 Diese Lösung wurde stets frisch und gekühlt.

Blockier-/Antikörperpuffer

3 % (v/v) Pferdeserum gelöst in 1xPBS
 Diese Lösung wurde stets frisch hergestellt

Concanavalin-A-Lösung

10 µg/ml Concanavalin A
 gelöst in eiskaltem 1xPBS

- **Lösungen für die Dotblot- und In-situ-Hybridisierung**

Die Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit DEPC-behandeltem Wasser hergestellt.

DEPC-Wasser

0,1 % DEPC
 Diese Lösung wurde dreifach autoklaviert.

20x-SSC-Puffer

3 M NaCl
 0,3 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
 pH 7,0

10x-PBS

0,8 M Na₂HPO₄
 0,65 M NaCl
 0,2 M NaH₂PO₄
 pH 7,4

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl
 1 mM EDTA

20x-Hybridisierungssalzlösung

3 M NaCl
 0,1 M PIPES
 0,1 M EDTA
 pH 6,8

50x Denhardt's Reagenz

1 % (w/v) Ficoll
 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon
 1 % (w/v) Rinderserumalbumin
 Diese Lösung wurde nicht autoklaviert
 und bei -20 °C gelagert.

Prähybridisierungslösung

50 % (v/v) Formamid
 5x Hybridisierungssalzlösung
 5x Denhardt's Reagenz
 0,2 % (w/v) SDS
 250 mg/ml Hefe-tRNA
 250 mg/ml Heringsperma-DNA
 Diese Lösung wurde nicht autoklaviert
 und bei -20 °C gelagert.

Hybridisierungslösung

10 % (w/w) Dextransulfat
 in Prähybridisierungslösung
 Diese Lösung wurde frisch hergestellt.

RNase-Puffer

0,5 M NaCl
 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
 1 mM EDTA (pH 7,5)
 10 µg/ml RNase A
 Diese Lösung wurde frisch hergestellt.

2x Puffer 1

300 mM NaCl
 200 mM Maleinsäure
 pH 7,5

Puffer 2

1 % (w/v) Blockierreagenz in Puffer 1
 Diese Lösung wurde nicht autoklaviert
 und bei -20 °C gelagert.

Puffer 3

100 mM Tris-HCl

100 mM NaCl

50 mM MgCl₂

pH 9,5

Diese Lösung wurde frisch hergestellt.

Denaturierungspuffer (Dotblot)

0,4 M NaOH

0,6 M NaCl

Neutralisierungspuffer (Dotblot)

1,5 M NaCl

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

A2.3 Kits**Tab. 10:** Kits

Bezeichnung	Hersteller
ABC Vectastain Elite Kit	Vector Laboratories; Burlingame, USA
Fluorescein-Tyramid Signal Amplification Kit	Perkin-Elmer; Boston, USA
NucleoBond PC100	Macherey-Nagel; Düren, D
NucleoSpin Plasmid Kit	Macherey-Nagel; Düren, D
TOPO TA PCR Cloning Kit	Invitrogen GmbH; Karlsruhe, D
Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit	Invitrogen GmbH; Karlsruhe, D
Zenon Rabbit-IgG direct AF647 labelling Kit	Invitrogen GmbH; Karlsruhe, D
Peroxidase Substrate Kit DAB	Vector Laboratories; Burlingame, USA
High Pure PCR-Product Purification Kit	Roche Applied Science; Mannheim, D

A2.4 Antikörper**Tab. 11:** Antikörper Fettsäuresensoren

Epitop	Interne Nummer	Spezifität	Art (Klon)	Spezies	Hersteller	Bestellnummer	Konzentration
CD36	254	H	p	Kaninchen	Lifespan	LS-BB1590	300 µg/ml
	255 (BP)					LS-PB1590	1 mg/ml
CD36	354	M	m (CB38)	Maus	BDPharming. R+B Systems	555453	500 µg/ml
	355 (BP)					1955-CD	100 µg/ml
CD36	290 291 (BP)	H	p	Kaninchen	Antibodies online	ABIN350200 ABIN350200_P	-
GPR120	244	H	p	Kaninchen	MBL	LS-A2003	1 mg/ml
	251 (BP)					LS-P2003	0,05-1mg/ml
GPR120	349	H	p	Kaninchen	MBL	LS-A2004	1 mg/ml
	350 (BP)					LS-P2004	1 mg/ml
GPR84	252	H	p	Kaninchen	Lifespan	LS-A346	600 µg/ml
	253 (BP)					LS-P346	0,05-1mg/ml
GPR84	258	H, M	p	Ziege	St. Cruz	sc-48221	200 µg/ml
	259 (BP)					sc-48221P	200 µg/ml
GPR43	268 249 (BP)	H	p	Kaninchen	US Biological	G8600-47	1 mg/ml
KCNA5 (Kv1.5)	288	H	p	Ziege	St. Cruz	sc-11672	200 µg/ml
	289 (BP)					sc-11672P	100 µg/ml
KCNA5 (Kv1.5)	260	H	p	Ziege	St. Cruz	sc-11671	200 µg/ml
	261 (BP)					sc-11671P	100 µg/ml

p: polyclonal; m: monoclonal; BP: Blockierpeptid; M: Maus; H: Mensch (human); R: Ratte; S: Schwein; B: Rind (bovine)

Tab. 12: Antikörper Geschmacksrezeptoren

Epitop	Interne Nummer	Spezifität	Art (Klon)	Spezies	Hersteller	Bestellnummer	Konzentration
TAS1R1	182	H	p	Ziege	St. Cruz	sc-34049	200 µg/ml
TAS1R2	149 210 (BP)	H, A	p	Kaninchen	Acris	SP4590P SP4347CP	1 mg/ml 1 mg/ml
TAS1R2	377 378 (BP)	M, R, H	p	Ziege	St. Cruz	sc-22456 sc-22456P	200 µg/ml 200 µg/ml
TAS1R3	145 210 (BP)	H, A	p	Kaninchen	Acris	SP4347P SP4347CP	1 mg/ml 1 mg/ml
TAS2R38	296 310a (BP)	H	p	Kaninchen	Abcam	ab65509 ab101193	1 mg/ml

p: polyclonal; m: monoclonal; BP: Blockierpeptid; M: Maus; H: Mensch (human); R: Ratte; S: Schwein; B: Rind (bovine);
A: div. Affenarten; AK: Antikörper

Tab. 13: Antikörper Typ-I-Zellmarker

Epitop	Interne Nummer	Spezifität	Art (Klon)	Spezies	Hersteller	Bestellnummer	Konzentration
Glast (Slc1a3/EAAT1)	173	H	p	Kaninchen	Novus Biologicals	NB110-55632	1 mg/ml
Glast (Slc1a3/EAAT1)	204	H, M	p	Kaninchen	Novus Biologicals	NB110-55631	1 mg/ml
Glast (Slc1a3/EAAT1)	345 346 (BP)	H, M, R	p	Ziege	St. Cruz	sc-7758 sc-7758P	200 µg/ml 100 µg/ml
Glast (Slc1a3/EAAT1)	358	H	m (10D4)	Maus	Abcam	ab49643	1 mg/ml
ROMK (KCNJ1)	357	H, M, R	p	Kaninchen	Abcam	ab80967	1 mg/ml
NTPDase2	301	H	p	Kaninchen	zur Verfügung gestellt von J. Sévegnny, CDN		
EAAT2	389	H, M, R	p	Meerschwein	Millipore	P43004	-
Gy13	162 163	H, M	p	Ziege	St. Cruz	sc-26781 sc-26781P	200 µg/ml 100 µg/ml

p: polyclonal; m: monoclonal; BP: Blockierpeptid; M: Maus; H: Mensch (human); R: Ratte; S: Schwein; B: Rind (bovine)

Tab. 14: Antikörper Typ-II-Zellmarker

Epitop	Interne Nummer	Spezifität	Art (Klon)	Spezies	Hersteller	Bestellnummer	Konzentration
PLCβ2	156 164 (BP)	H, R, M	p	Kaninchen	St. Cruz	sc-206 sc-206P	200 µg/ml 100 µg/ml
PLCβ2	316 320 (BP)	H, R, M	p	Ziege	St. Cruz	sc-31759 sc-31759P	200 µg/ml 50 µg/ml
Gustducin	28 29 (BP)	R	p	Kaninchen	St. Cruz	sc-395 sc-395P	200 µg/ml 200 µg/ml
TRPM5	151	H, R, M	p	Ziege	St. Cruz	sc-27367	200 µg/ml
TRPM5	153	H, R, M	p	Ziege	St. Cruz	sc-27366	200 µg/ml
PLCβ3	121	M, R, H	p	Kaninchen	St. Cruz	sc-403	200 µg/ml
PLCβ3	197	M, R, H	p	Kaninchen	St. Cruz	sc-13958	200 µg/ml

p: polyclonal; m: monoclonal; BP: Blockierpeptid; M: Maus; H: Mensch (human); R: Ratte; S: Schwein; B: Rind (bovine)

Tab. 15: Antikörper Typ-III-Zellmarker

Epitop	Interne Nummer	Spezifität	Art (Klon)	Spezies	Hersteller	Bestellnummer	Konzentration
NCAM	185	M, H	p	Kaninchen	Chemicon	AB5032	1 mg/ml
NCAM	157	H, S	m (ERIC-	Maus	Chemicon	MAB2120Z	1 mg/ml
AADC (DOPA)	231	B, R	p	Kaninchen	Biozol	BZL02908	300 µg/ml
SNAP25	368 376 (BP)	H, M	p	Ziege	GeneTex	GTX89577 GTX89577PE	500 µg/ml 500 µg/ml
SNAP25	232	H, S	m (-)	Maus	Millipore	MAB331	-
GAD-67	187	H, M, R	p	Kaninchen	Thermo scientific	RB-10251-P1	200 µg/ml
GAD-67	341 342 (BP)	H, M	p	Ziege	St. Cruz	sc-7512 sc-7512P	200 µg/ml 100 µg/ml
PKD2L1	219	H	p	Kaninchen	Abcam	ab72258	-
PGP9.5	115	H, M, R	p	Kaninchen	quartett	2161802001	-
CD73	384	H	m (7G2)	Maus	Abcam	ab54217	500 µg/ml

p: polyclonal; m: monoclonal; BP: Blockierpeptid; M: Maus; H: Mensch (human); R: Ratte; S: Schwein; B: Rind (bovine)

Tab. 16: Antikörper Sonstige Marker

Epitop	Interne Nummer	Spezifität	Art (Klon)	Spezies	Hersteller	Bestellnummer	Konzentration
UEA	229	*kein AK, ULEX EUROPAEUS Agglutinin 1-Fluorescein-Konjugat			Linaris	FL-1061	2 mg/ml
P ₂ X ₂	284	R	p	Kaninchen	Sigma	P7982	300 µg/ml
P ₂ X ₂	228 228a (BP)	H, M, R	p	Kaninchen	Alomone Labs	APR-003	900 µg/ml
P ₂ X ₃	189 189a (BP)	H, M, R	p	Kaninchen	Alomone Labs	APR-016	650 mg/µl
5HT-1A	274	H, M, R	p	Kaninchen	Acris	24504	300 µg/ml
GLP-1	199 199a (BP)	H, M	p	Ziege	St. Cruz	sc-7782 sc-7782P	200 µg/ml
Cyto-keratin	114	H	m (Ks20.8)	Maus	Dako	M7019	74 µg/ml

p: polyclonal; m: monoclonal; BP: Blockierpeptid; M: Maus; H: Mensch (human); R: Ratte; S: Schwein; B: Rind (bovine);

AK: Antikörper

Tab. 17: Sekundäre Antikörper

Epitop IgG	Interne Nummer	Konjugat	Spezies	Hersteller	Bestellnummer	Konzentration
anti-Kaninchen	3	AF488	Ziege	Molecular probes	A11034	2 mg/ml
anti-Kaninchen	222	AF633	Ziege	Molecular Probes	A31573	2 mg/ml
anti-Kaninchen	4	Biotin	Ziege	Vector Laboratories	BA-1000	1,5 mg/ml
anti-Kaninchen	61	AF647	Rind	St. Cruz	sc-2363	0,4 mg/ml

Tabelle wird fortgesetzt...

Fortsetzung Tabelle 17

anti-Ziege	67	AF633	Esel	Molecular Probes	A11055	2 mg/ml
anti-Ziege	84	AF488	Esel	Molecular Probes	A21082	2 mg/ml
anti-Maus	1	AF488	Ziege	Molecular Probes	A11029	2 mg/ml
anti-Maus	99	AF633	Ziege	Molecular Probes	A21050	2 mg/ml
anti-Meerschwein	191	AF488	Ziege	Vector Laboratories	BA-7000	1,5 mg/ml
Biotin*	68	AF633	(*kein AK, Streptavidin-konjugat)	Molecular Probes	S21375	2 mg/ml

AK: Antikörper

A2.5 Oligonukleotide, Sonden und Nukleinsäure-Größenstandards

Für den Nachweis der mRNA-Expression von Fettsäuresensoren, lipolytischen Enzymen und entsprechenden Kontrollen via Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden Oligonukleotide (Primer) auf Grundlage der in der NCBI-Datenbank verfügbaren mRNA-Sequenzen der entsprechenden Gene entworfen. Die Primer sollten circa 20-25 bp lang sein, eine Schmelztemperatur von 68-72 °C aufweisen und, für eine optimale Hybridisierung mit der Matrizen-DNA, möglichst auf den Basen Guanin oder Cytosin enden. Die Schmelztemperatur des Oligonukleotids und der GC-Gehalt wurden mit dem Online-Serviceprogramm „BioMath Calculator Tm for Oligos“ (Promega) berechnet. Die Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D) in der Qualitätsstufe „high purity salt free“ synthetisiert. Zur Lagerung bei -20 °C wurden 100-pmol/µl-Stammlösungen in UV-bestrahltem Wasser hergestellt und diese zur Verwendung für PCRs auf 10 pmol/µl verdünnt.

Tab. 18: Analytische Primer

Produkt	Oligonukleotid-Bezeichnung	Interne Nummer	Sequenz (5' → 3')	T _A °C	Produkt Größe bp
Amylase	¹ hAMY1C_fw	38a	gctgtgagtgcaggaacaagcag	55	300
	¹ hAMY1C_rev	38b	ccaggccacatgtgcttgaag		
CD36	hCD36_492_for	5a	aatgccagttggagacctgc	61	367
	hCD36_840_rev	5b	agatatgggatgcagctgcc		
GAPDH	² GAPDH_for	16a /77	accacagtcctatccatcac	58	454
	² GAPDH_rev	16b /78	tcccaccacctgtgtgtga		
GPR120 L+S	³ hGPR_120_631_for	287	cgatttcacacttggc	61	405+452
	³ hGPR_120_1083_rev	288	tgcacagtgtcatgtttaga		
GPR120 L	hGPR120_780_for	27	gctgtctgactcacagtg	61	303
	³ hGPR_120_1083_rev	288	tgcacagtgtcatgtttaga		
GPR40	³ hGPR_40_157_for	289	ctgctgtgacagtctctctg	-	446
	³ hGPR_40_602_rev	290	cagaaggctgtgatggccaag		
GPR40	hGPR40_134_for	11a	ctggctaccctgaacct	60.8	315
	hGPR40_449_rev	11b	gagcctcaaccaagacc		
GPR84	hGPR84_129_for	4a	gagtctgtctgggtatc	61	389
	hGPR84_517_rev	4b	tcaccagtgccagcacta		
Gustducin	⁴ -	121	ctgagcgagatgaagaacc	56	354
	⁴ -	122	cagatgcccttcaagcag		
KCNA5	hDRK_KCNA5_827_for	6a	atagcttctaccagctggg	-	394
	hDRK_KCNA5_1201_rev	6b	acgtgctctccacagtaag		
KCNA5	hDRK_KCNA5_993_for	12a	tctcgtcttggtatctca	-	248
	hDRK_KCNA5_1241_rev	12b	cgaagtgaccagatgacg		

Tabelle wird fortgesetzt...

Fortsetzung Tabelle 18

KCNA5	hKCNA5_1594_for	24a	agaggctgacaaccaggaac	61	254
	hKCNA5_1849_rev	24b	gcctgctctcctaaggac		
Lipase F	¹ Fw_hLL	34a	ctgttcaaacatgttcattgg	53	303
	¹ Rv_hLL	34b	cattgtaaacttctgaggggc		
Lipase K	hLIPK_for	53a	cgagtagttaagggtgtttgg	58	410
	hLIPK_rev	53b	ggaagtaaatttcaacatccttg		
Lipase M	hLIPM_for	54a	ggatttcaacctcccaac	58	393
	hLIPM_rev	54b	ccttgatcatcatctggcagc		
Lipase N	hLIPN_for	55a	cctgggtcctacgatctcattc	58	448
	hLIPN_rev	55b	acgaggacatcatgtccacc		
PLCβ2	² hPLCb2_FP	99	tacaacaagcgcagatgag	59	618
	² hPLCb2_RP	100	ctccaggaagatgaagagcg		
TAS2R16	³ hTAS2R16_F251	403	cctgggaatttttaatatccttaccctggt	63	449
	³ hTAS2R16_R699	404	gaagcgcgctttcatgctt		

Entworfen von ¹MM Galindo, ²M Bromke, ³M Behrens, ⁴F Stähler; fw/for = forward engl. vorwärts, rv/rev = reverse engl. rückwärts; T_A = optimierte Annealingtemperatur; GPR120 L = spezifische Primerkombination für die komplette Spleißvariante (inkl. Exon 3) der GPR120-mRNA; GPR120 L+ S = Primerkombination für lange + kurze Spleißvariante (exkl. Exon 3) der GPR120-mRNA.

Tab. 19: Sequenzierungsprimer

Produkt	Oligonukleotid	Sequenz (5'→ 3')
BGH rev	330_CMV_F	tagaaggcacagtcgagg
CMV for	331_BGH_R	cgcaaatggcggttaggcgtg
M13 for	(aus den Invitrogen	gtaaacgacgccag
M13 rev	TOPO-Klonierungskits)	caggaaacagctatga

Tab. 20: Sonden für die *In-situ-Hybridisierung*

Produkt	Sonde	Sequenz (5'→ 3')
Lipase K	T3_LipK	siehe Anhang A3.2.6
	T7_LipK	siehe Anhang A3.2.6
Lipase M	T3_LipM	siehe Anhang A3.2.6
	T7_LipM	siehe Anhang A3.2.6
Lipase N	T3_LipN	siehe Anhang A3.2.6
	T7_LipN	siehe Anhang A3.2.6

Tab. 21: Nukleinsäure-Größenstandards

Nukleinsäure-Standard	Größen	Hersteller
GeneRuler DNA ladder mix (0.5 µg/µl)	100-10000 bp	MBI Fermentas; St. Leon-Rot, D
Ambion® 0.5 – 10 Kb RNA ladder	500-10000 kb	Invitrogen; Darmstadt, D

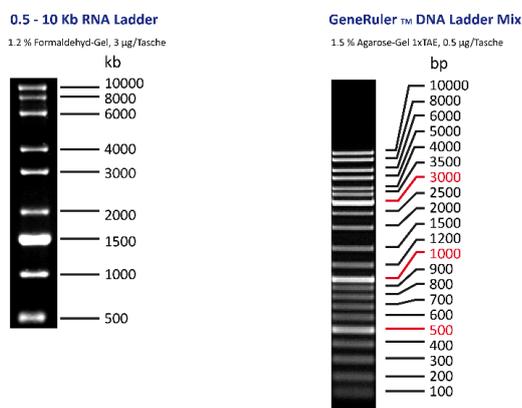


Abb. 41: Nukleinsäure-Größenstandards

A2.6 Plasmide

Tab. 22: Plasmide

Bezeichnung	Hersteller
pBluescript II KS ⁺	Stratagene; Amsterdam, NL
pCR [®] -Blunt II-TOPO	Invitrogen GmbH; Karlsruhe, D
pCR [®] 2.1-TOPO	Invitrogen GmbH; Karlsruhe, D
Fettrezeptorsequenz in Vektor PB80	Interne Plasmidvariante basierend auf pcDNA5/FRT (Invitrogen GmbH; Karlsruhe, D), welche eine mutierte EcoRI-Schnittstelle an Position 1832 und die jeweilige Fettrezeptorsequenz in der MKS enthält ¹
Fettrezeptorsequenz in Vektor PB81	Interne Plasmidvariante basierend auf pcDNA5/FRT (Invitrogen GmbH; Karlsruhe, D), welche eine mutierte EcoRI-Schnittstelle an Position 1832 und die jeweilige Fettrezeptorsequenz in der MKS enthält sowie von einem SST- und HSV-Tag flankiert wird ¹

¹Hergestellt von MM Galindo. MKS – multiple Klonierungsstelle

A2.7 Enzyme

Tab. 23: Enzyme

Enzym	Hersteller
DNase I (RNase frei) 1 U/μl	Invitrogen; Karlsruhe, D
Lysozym (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Reverse Transkriptase Superscript II 200 U/μl	Invitrogen; Karlsruhe, D
RNase A 40 U/mg	Roche; Mannheim, D
RNase-Inhibitor RNasin 40 U/μl	Invitrogen; Karlsruhe, D
RNase-Inhibitor RiboLock™	MBI Fermentas; St. Leon-Rot, D
Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) 1 U/μl	MBI Fermentas; St. Leon-Rot, D
T3-RNA-Polymerase 20 U/μl	MBI Fermentas; St. Leon-Rot, D
T7-RNA-Polymerase 10 U/μl	Roche; Mannheim, D
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs; Frankfurt a.M., D
5PRIME Taq-DNA-Polymerase	5PRIME GmbH, VWR International; Darmstadt, D
Restriktionsendonukleasen und Puffer:	
XhoI, 10 U/μl	MBI Fermentas; St. Leon-Rot, D
XbaI, 10 U/μl	MBI Fermentas; St. Leon-Rot, D
SpeI, 10 U/μl	MBI Fermentas; St. Leon-Rot, D
NotI, 10 U/μl	MBI Fermentas; St. Leon-Rot, D
EcoRI, 10 U/μl	MBI Fermentas; St. Leon-Rot, D
HindIII, 10 U/μl	MBI Fermentas; St. Leon-Rot, D
Puffer R, Puffer O, Puffer Tango	MBI Fermentas; St. Leon-Rot, D

A2.8 Humanes Biopsiematerial

Gewebematerial humaner Wallpapillen und anhängender Drüsen wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Jan-Dirk Raguse, Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Charité Berlin-Mitte zur Verfügung gestellt. Das Gewebe wurde im Rahmen von Biopsien entnommen, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C gelagert. Informationen über Alter oder Geschlecht der entsprechenden Spender lagen aus Datenschutzgründen nicht vor. Die Genehmigung zur Verwendung des Gewebes wurde unter dem Antrag 240/2002 von der Ethik Kommission des Campus Virchow Klinikums der Charité Berlin erteilt.

A2.9 Humane Zellen und Materialien für deren Kultivierung

Für immunozytochemische Experimente wurden HEK293T-G α 16gust44-Zellen verwendet, die durch Jay Slack (Givaudan Flavors Corp.) zur Verfügung gestellt wurden. Die Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glukose kultiviert. Diesem Medium wurde zusätzlich hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum (10 % (v/v)), 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin zugesetzt. Die stabile Integration der G-Protein-Chimäre G α 16gust44 wurde durch die Zugabe von 400 μ g/ml G418 gesichert.

Tab. 24: Materialien für die Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Material	Hersteller
D-(+)-Glucose	Invitrogen; Karlsruhe, D
DMEM Gibco	Invitrogen; Karlsruhe, D
fötales Rinderserum	Biochrom; Berlin, D
G418 Geneticin 50 mg/ml	Merck-Millipore; Darmstadt, D
L-Glutamin	Invitrogen; Karlsruhe, D
Lipofectamin 2000	Invitrogen; Karlsruhe, D
Penicillin	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Poly-D-Lysin	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Streptomycin	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Trypsin, 0,25 % mit EDTA-4Na	Invitrogen; Karlsruhe, D

A2.10 Bakterienstämme, Medien und Materialien für deren Kultivierung

Im Rahmen von Klonierungsexperimenten und der damit einhergehenden Vervielfältigung von Plasmiden, wurden Bakterien des Stammes *E. coli* transformiert, kultiviert und selektiert.

Tab. 25: Bakterienstämme und Selektionsantibiotika

Bakterienstamm bzw. Antibiotika	Bezugsquelle
Ampicillin 100 μ g/ml Endkonzentration	Invitrogen; Karlsruhe, D
<i>E. coli</i> BIOblue 10 ⁻⁹ chemisch kompetente Zellen	Bioline; Luckenwalde, D
<i>E. coli</i> Top 10 chemisch kompetente Zellen	Invitrogen; Karlsruhe, D
Kanamycin 100 μ g/ml Endkonzentration	Invitrogen; Karlsruhe, D

SOC-Medium

2,0 % (w/v) Pepton
 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
 8,6 mM NaCl
 2,5 mM KCl
 10 mM MgCl₂

Nach Einstellen eines pH-Wertes von 7,0 und autoklavieren wurde das Medium nach Zugabe von 20 mM D-(+)-Glucose sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Glycerinkulturen

1,274 ml Bakteriensuspension
 225 μ l Glycerin

Das Gemisch wurde sofort bei -80°C tiefgefroren.

LB-Medium

1 % (w/v) Pepton
 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
 1 % (w/v) NaCl

Das Medium wurde autoklaviert und bei RT gelagert.

LB-Plattenmedium mit Antibiotikazusatz

LB-Medium wurde mit 1,5 % (w/v) Select Agar, autoklaviert, nach dem Abkühlen mit Antibiotikum versehen und in 10-cm-Petrischalen gegossen. Nach dem Gelieren erfolgte die Lagerung der Platten bei 4°C.

A2.11 Versuchstiere und Materialien für deren Haltung

Der Tierversuch dieser Arbeit wurde durch die Tierversuchskommission bewilligt (23-2347-27-2010, interne Nummer des Max-Rubner-Laboratoriums G-04-11-MOGE). Es wurden ausschließlich Versuchstiere des Mausstammes C57BL/6 (Charles River Laboratories; Wilmington, USA) verwendet. Die Haltung der Tiere erfolgte außerhalb des Experiments unter Standardbedingungen (je 12 h Hell-/Dunkelphase; Futter und Wasser ad libitum; 20°C RT; 55,5 % Luftfeuchte).

Tab. 26: Materialien für Haltung und Experimente mit Versuchstieren

Material	Hersteller
A-31749 P2X ₃ -Rezeptorantagonist	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Denatoniumbenzoat 300 µM	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Flaschenaufsätze mit Kugelsystem	Labor- & Pharmatechnik GmbH; Emmendingen, D
Gummi arabicum	Acros Organics; New Jersey, USA
Incidin	Ecolab GmbH; Mannheim am Rhein, D
Linolsäure 10 mM	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Makrolon Käfige Typ III	EBECO, Castrop-Rauxel, D
Mini-Trinkflaschen mit Kugelspender	Eigenkonstruktion: einem 15-ml-Falcon wurde die Spitze abgeschnitten (Durchmesser < als Metallkugel), die scharfe Plastikkante durch Erhitzen abgerundet und eine Metallkugel eingesetzt.
Natriumchloridlösung, physiologisch, 0,9 % (w/v)	Frensenius Kabi GmbH; Bad Homburg, D
Saccharose 300 mM	Sigma-Aldrich; Steinheim, D
Standardfutter	Ssniff-R/M-H; Soest, D
Weichholzfaser	Rettenmaier & Söhne; Ellwangen, D

A2.12 Software

Tab. 27: Software

Software	Hersteller
Adobe Illustrator CS3	Adobe Systems; San Jose, CA, USA
Adobe Photoshop CS3	Adobe Systems; San Jose, CA, USA
Axio Vision Release 4.7.2	Carl Zeiss Mikroskopie; Göttingen, D
Excel 2010	Microsoft Corporation; Redmond, WA, USA
GeneSnap 6.01	Synoptics; Cambridge, UK
Leica Confocal Software LCS Lite 2.61	Leica Microsystems; Wetzlar, D
Lickometersoftware Graphic state 3	Coulburn Instruments, Allentown, PA
MetaMorph 4.6	Molecular Devices; Downingtown, US
Mirax Scan 1.12	Carl Zeiss Mikroskopie; Jena, D
Mirax Viewer 1.12	Carl Zeiss Mikroskopie; Jena, D
Vector NT19	Invitrogen; Karlsruhe, D

A2.13 Geräte

Tab. 28: Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage Atilon	Sartorius Group; Göttingen, D
Analysenwaage CPA2245-OCE	Sartorius Group; Göttingen, D
Analysenwaage Preciso 120 A	Precisa Gravimetrics GmbH; Dietikon, S
Autoklav Varioklav	Thermo Fisher Scientific; Schwarte, D
Automatisiertes Mikroskop Mirax MIDI	Carl Zeiss Microscopy; Jena, D
Binokularmikroskop SMZ 645	Nikon, Amstelveen, NL
Eismaschine AF-10	Scotsman; XuHong, C
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 1	Carl Zeiss Mikroskopie; Jena, D
Geldokumentationsanlage GeneGenius	Synoptics; Cambridge, UK
Gelelektrophoreseapparaturen Horizon 20.25/58/11.14	Biometra; Göttingen, D
Hybridisierungs-ofen OV3	Biometra; Göttingen, D
Inkubator für eukaryotische Zellen	Heraeus; Hanau, D
Konfokales Laserscanningmikroskop LCS SP2	Leica Microsystems; Wetzlar, D
Kryostat HM 505 E, HM 560	Microm; Walldorf, D
Kühlzentrifuge 5810R	Eppendorf; Hamburg, D
Lichtmikroskop TELAVAL3I	Carl Zeiss Microscopy; Jena, D
Lickometer	Coulburn Instruments, Allentown, PA
Mini-Ofen Peqlab perfect blot	Peqlab Biotechnologie GmbH; Erlangen, D
pH-Meter	HANNA Instruments;
pH-Meter HI9024	PCE Deutschland GmbH; Meschede, D
Pipetten 10-1000 µl	Eppendorf; Hamburg, D
Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories; München, D
Rundschüttler HAT TR250	Infors AG; Bottmingen, D
Spektrophotometer Biomate 3	Thermo Fisher Scientific; Schwarte, D
Thermocycler T3000	Biometra; Göttingen, D
Thermocycler TGradient	Biometra; Göttingen, D
Thermomagnetrührer IKA RH basic L	IKA Labortechnik; Staufen, D
Thermomagnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik; Staufen, D
Thermomixer compact	Eppendorf; Hamburg, D
Tischzentrifuge 5415C / 5417R	Eppendorf; Hamburg, D
Tischzentrifuge IR 220V	Roth; Karlsruhe, D
Tissue Lyser II	Quiagen; Hilden, D
Transilluminator 4000	Stratagene; Amsterdam, NL
UV-Bank Lamihais HB2448	Heraeus Instruments; Hanau, D
UV-Gerät Template Tamer	Oncor Appligene; watford, UK
Vakuumpzentrifuge 5301	Eppendorf GmbH; Hamburg, D
Vortex-Genie 2	Scientific Industries; Bohemia NY, USA
Wasserbad 1083	GFL; Großburgwedel, D
Wasserreinigungssystem ultra clear basic	SG Wasseraufbereitung und Regenerierung GmbH; Barsbüttel, D

A3 Ergebnisse

A3.1 Fettsäuresensitive Rezeptoren

A3.1.1 Immunhisto- und -zytochemische Kontrollen

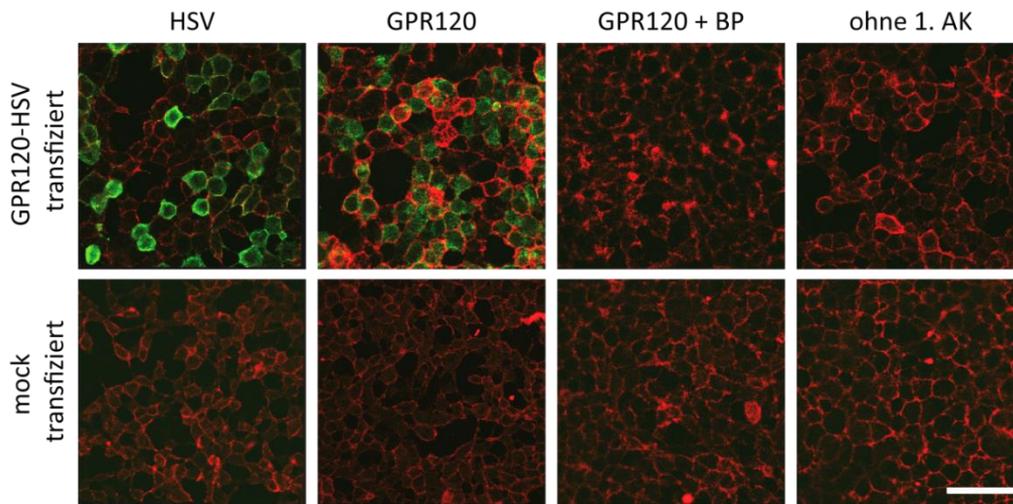


Abb. 42: Immunzytochemische Kontrollfärbungen an HEK293T-G α Gust44-Zellen. Die heterologe Expression des nachzuweisenden Proteins erfolgte nach Transfektion mit Vektoren, welche die entsprechende cDNA mit egekoppeltem HSV-Tag enthielt (obere Reihe) oder mit Leervektoren (mock, untere Reihe). Die Färbung mit einem HSV-Antikörper (grün) dient der Abschätzung der Transfektionseffizienz. Neben der Färbung mit dem spezifischen Primärantikörper gegen den nachzuweisenden Rezeptor (hier: GPR120, grün), wurde zur Kontrolle auf Spezifität der Färbung auch mit dem entsprechenden Primärantikörper gefärbt, welcher zuvor mit einem spezifischen Blockierpeptid (BP) inkubierte (hier: GPR120+BP). Zur Kontrolle auf unspezifische Färbung durch den Sekundärantikörper, wurde eine Färbung ohne Verwendung des Primärantikörpers (1. AK) durchgeführt. Beispielhaft für alle immunzytochemisch gefärbten Rezeptoren sind die Kontrollfärbungen hier für den Rezeptor GPR120 gezeigt. rot: Concanavalin-A-Zellmembranfärbung. Maßstab: 30 μ m.

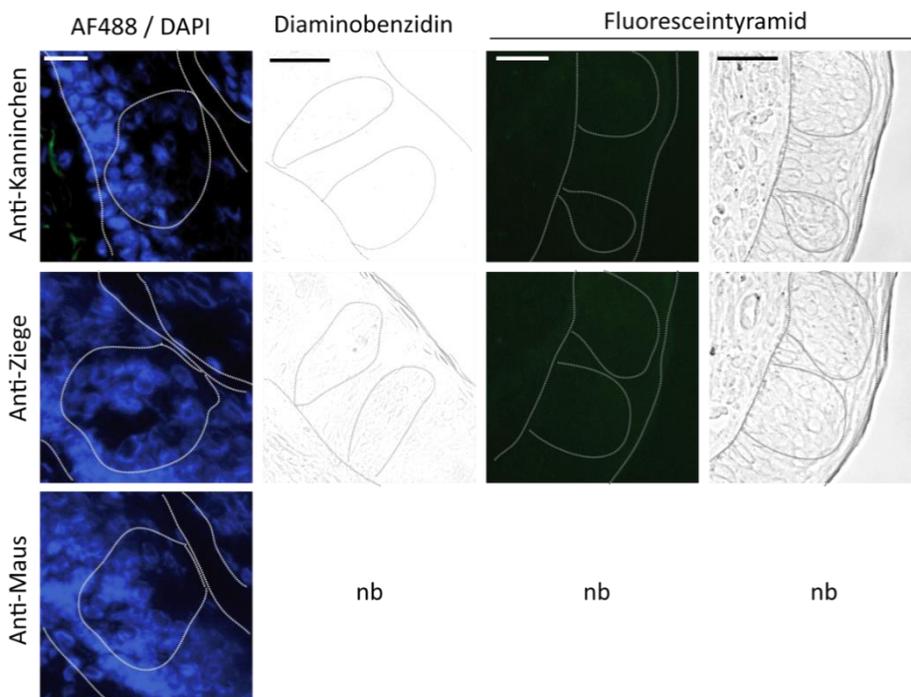


Abb. 43: Kontrolle auf unspezifische Färbung durch die verwendeten Sekundärantikörper in immunhistochemischen Untersuchungen. Bei allen durchgeführten Färbungen wurde mit den jeweils verwendeten Sekundärantikörpern (anti-Kaninchen, -Ziege oder -Maus mit Alexa Fluor 488-konjugiert bzw. biotinylierte Sekundärantikörper gegen die jeweilige Spezies zur Diaminobenzidin- bzw. Fluoresceintyramidfärbung) eine Kontrollfärbung ohne Primärantikörper durchgeführt.

Keiner der verwendeten Sekundärantikörper zeigte eine unspezifische Färbung. nb – nicht benutzt. DAPI - Kernfärbung (blau). Zur Orientierung sind das Geschmacksepithel und die Geschmacksknospen hervorgehoben. Für die FT-Färbung ist zusätzlich die jeweilige Hellfeldaufnahme gezeigt. Maßstab: 50 μ m.

A3.2 Lipolytische Enzyme

A3.2.1 Sequenzen der Lipase-Vektorkonstrukte zur Herstellung der RNA-Sonden für die *in-situ*-Hybridisierung

```

1  GGAAACAGCT ATGACCATGA TTACGCCAAG CTCGAAATTA ACCCTCACTA AAGGGAACAA AAGCTGGTAC CGGGCCCCCC
   CCTTTGTCGA TACTGGTACT AATGCGGTTT GAGCTTTAAT TGGGAGTGAT TTCCCTTGTT TTCGACCATG GCCCGGGGGG
   XhoI
   ~~~~~
   T3-Promotor >
81  CTCGAGCGGC CGCCAGTGTG ATGGATATCT GCAGAATTCG CCCTTGGATT TCCAACCTGC CCAACAATAG CCTGGGCTTC
   GAGCTCGCCG CCGGTCACAC TACCTATAGA CGTCTTAAGC GGAACCTAA AGGTTGGACG GGTGTGTATC GGACCCGAAG
161  ATTCTGGCAG ATGTGGTGTG TGACGTGTGG ATGGGGAACA GCAGGGGAAA CGCCTGGTCT CGAAAAACACA AGACACTCTC
   TAAGACCGTC TACGACCAA ACTGCACACC TACCCTTGTG CGTCCCTTT GCGGACCAGA GCTTTTGTGT TCTGTGAGAG
241  CATAGACCAA GATGAGTCTT GGGCTTTCAG TTATGATGAG ATGGCTAGGT TTGACCTTCC TGCACTGATA AACTTTATTT
   GTATCTGGTT CTACTCAAGA CCCGAAAGTC AATACTACTC TACCGATCCA AACTGGAAGG ACGTCACTAT TTGAAATAAA
321  TGCAGAAAAC GGGCCAGGAA AAGATCTATT ATGTCGGCTA TTCACAGGGC ACCACCATGG GCTTTATTGC ATTTTCCACC
   ACGTCTTTTG CCCGGTCTTT TTCTAGATAA TACAGCCGAT AAGTGTCCCG TGGTGGTACC CGAAATAACG TAAAAGGTGG
401  ATGCCAGAGC TGGCTCAGAA AATCAAAATG TATTTTGCTT TAGCACCCAT AGCCACTGTT AAGCATGCAA AAAGCCCCGG
   TACGGTCTCG ACCGAGTCTT TTAGTTTTAC ATAAAACGAA ATCGTGGGTA TCGGTGACAA TTCGTACGTT TTTCCGGGCC
481  GACCAAAATT TTGTTGCTGC CAGATATGAT GATCAAGGAA GGGCGAATTC CAGCACACTG CCGGCCGTTA CTAGTGGATC
   CTGGTTTAAA AACACGACG GTCTATACTA CTAGTTCCCT CCCGCTTAAG GTCGTGTGAC CGCCGGCAAT GATCACCTAG
   XbaI
   ~~~~~
561  CGAGCTCGGT ACCAAGCTTG ATATCGAATT CCTGCAGCCC GGGGGATCCA CTAGTTCTAG AGCGGCCGCC ACCGCGGTGG
   GCTCGAGCCA TGGTTCGAAC TATAGCTTAA GGACGTCGGG CCCCTAGGT GATCAAGATC TCGCCGGCGG TGGCGCCACC
641  AGCTCCAATT CGCCCTATAG TGAGTCGTAT TACAATTCAC TGGCCGTCGT TTTACAA
   TCGAGGTTAA CGCGGATATC ACTCAGCATA ATGTTAAGTG ACCGGCAGCA AAATGTT
   < T7-Promotor

```

Abb. 44: Sequenzierter Bereich des Lipase-K-*pBluescript*-Vektorkonstruktes zur Herstellung der RNA-Sonden. In grün ist die spezifische Sequenz des eingebrachten Lipase-K-PCR-Produktes hinterlegt. Grau hinterlegte Bereiche entsprechen den Resten des *pTOPO*-Vektors. Die zur Linearisierung genutzten Schnittstellen sind je nach Transkription mit T3- bzw. T7-DNA-Polymerase in rot bzw. grün dargestellt.

```

1  GGAAACAGCT ATGACCATGA TTACGCCAAG CTCGAAATTA ACCCTCACTA AAGGGAACAA AAGCTGGTAC CGGGCCCCCC
   CCTTTGTCGA TACTGGTACT AATGCGGTTT GAGCTTTAAT TGGGAGTGAT TTCCCTTGTT TTCGACCATG GCCCGGGGGG
   XhoI
   ~~~~~
   T3-Promotor >
81  CTCGAGGTCG ACGGTATCGA TAAGCTTGAT ATCGAATTCG CCCTTCGAGT AGTTAAGGTG TTGTTTGGTG ACAAATGTT
   GAGCTCCAGC TGCCATAGCT ATTCGAACTA TAGCTTAAGC GGAAGCTCA TCAATCCAC AACAAACCAC TGTTTTACAA
161  CCACCCTCAT ACATGTTTGG ACCAATTCAT TGCCACCAA GTGTGCAATC GAAAGCTATT CCGTCGTATT TGCAAGCACT
   GGTGGGAGTA TGTAACAAAC TGGTAAAGTA ACGGTGGTTT CACACGTTAG CTTTCGATAA GGCAGCATAA ACGTCGTTGA
241  TCCTATTTAC TCTGAGTGGG TTTGATCCGC AAAACTTAAA TATGAGTCGC TTGGATGTTT ATTTGTACACA CAATCTGCG
   AGGATAAATG AGACTCACCT AAAC TAGGCG TTTTGAATTT ATACTCAGCG AACCTACAAA TAAACAGTGT GTTAGGACGC
321  GGAACATCTG TTCAGAATAT GCTGCACTGG GCTCAGGCTG TTAATTCCTG TCAGCTCCAA GCTTTTGATT GGGGAAACTC
   CCTTGTAGAC AAGCTTTATA CGACGTGACC CGAGTCCGAC AATTAAGACC AGTCGAGGTT CGAAAACATA CCCCTTTGAG
401  TGATCAGAAC ATGATGCACT TCCATCAGCT TACACCTCCT TTATAACAAC TFACTAAGAT GGAAGTTCCA ACAGCAATAT
   ACTAGTCTTG TACTACGTGA AGGTAGTCGA ATGTGGAGGA AATATGTTGT AATGATTCTA CCTCAAGGT TGTCGTTATA
481  GGAATGGTGG ACAGGACATT GTGGCTGATC CCAAGGATGT TGAAAATTTA CTTCCAAGGG CGAATTCCTG CAGCCCCGGG
   CCTTACCACC TGTCCTGTAA CACCGACTAG GGTTCCTACA ACTTTTAAAT GAAGGTTCCT GCTTAAGGAC GTCGGGCCCC
   NotI
   ~~~~~
561  GATCCACTAG TTCTAGAGCG GCCGCCACCG CGGTGGAGCT CCAATTCGCC CTATAGTGAG TCGTATTACA ATTCACTGGC
   CTAGGTGATC AAGATCTCGC CGCGGTTGGC GCCACCTCGA GGTTAAGCGG GATATCACTC AGCATAATGT TAAGTGACC
   < T7-Promotor
641  CGTCGTTTTA CAA
   GCAGCAAAAT GTT

```

Abb. 45: Sequenzierter Bereich des Lipase-M-*pBluescript*-Vektorkonstruktes zur Herstellung der RNA-Sonden. In grün ist die spezifische Sequenz des eingebrachten Lipase-M-PCR-Produktes hinterlegt. Grau hinterlegte Bereiche entsprechen den Resten des *pTOPO*-Vektors. Die zur Linearisierung genutzten Schnittstellen sind je nach Transkription mit T3- bzw. T7-DNA-Polymerase in rot bzw. grün dargestellt.

```

1  GGAAACAGCT ATGACCATGA TTACGCCAAG CTCGAAATTA ACCCTCACTA AAGGGAACAA AAGCTGGTAC CGGGCCCCCC
   CCTTTGTCGA TACTGGTACT AATGCGGTTC GAGCTTAAAT TGGGAGTGAT TTCCCTTGTT TTCGACCATG GCCCGGGGGG
   XhoI
   ~~~~~
   T3-Promotor >
81  CTCGAGCGGC CGCCAGTGTG ATGGATATCT GCAGAATTCG CCCTTCCTTG GGTCCCTACGA TCTCATTCAA ATATCCCACG
   GAGCTCGCCG CCGGTCACAC TACCTATAGA CGTCTTAAGC GGAAGGAAC CCAGGATGCT AGAGTAAGTT TATAGGGTGC
161  GGCATTTTTA CCAGGTTTTT TCTACTTCCA AATTCATAA TCAAGGCTGT TTTTGGTACC AAAGGTTTCT TTTTAGAAGA
   CCGTAAAAAT GGTCCAAAAA AGATGAAGGT TTAAGGTATT AGTTCCGACA AAAACCATGG TTTCCAAAGA AAAATCTTCT
241  TAAGAAAACG AAGATAGCTT CTACCAAAAT CTGCAACAAT AAGATACTCT GGTGATATG TAGCGAATTT ATGTCCTTAT
   ATTCTTTTGC TTCTATCGAA GATGGTTTTA GACGTTGTTA TTCTATGAGA CCAACTATAC ATCGCTTAAA TACAGGAATA
321  GGGCTGGATC CAACAAGAAA AATATGAATC AGAGTCGAAT GGATGTGTAT ATGTCACATG CTCCCCTGG TTCATCAGTA
   CCGGACCTAG GTTGTCTTTT TTATACTTAG TCTCAGCTTA CCTACACATA TACAGTGTAC GAGGGTGACC AAGTAGTCAT
401  CACAACATTC TGCATATAAA ACAGCTTTAC CACTCTGATG AATTCAGAGC TTATGACTGG GAAATGACG CTGATAATAT
   GTGTTGTAAG ACGTATATTT TGTCGAAATG GTGAGACTAC TTAAGTCTCG AATACTGACC CCTTACTGCG GACTATTATA
481  GAAACATTAC AATCAGAGTC ATCCCCCTAT ATATGACCTG ACTGCCATGA AAGTGCCTAC TGCTATTTGG GCTGGTGGAC
   CTTTGTAAAT TTAGTCTCAG TAGGGGGATA TATACTGGAC TGACGGTACT TTCACGGATG ACGATAAACC CGACCACCTG
   SpeI
   ~~~~~
561  ATGATGTCCT CGTAAGGGCG AATTCAGCA CACTGGCGGC CGTTACTAGT GGATCCGAGC TCGGTACCAA GCTTGATATC
   TACTACAGGA GCATTCCCGC TTAAGGTCGT GTGACCGCCG GCAATGATCA CCTAGGCTCG AGCCATGGTT CGAACTATAG
641  GAATTCCTGC AGCCCGGGGG ATCCACTAGT TCTAGAGCGG CCGCCACCGC GGTGGAGCTC CAATTCGCCC TATAGTGAGT
   CTTAAGGACG TCGGGCCCCC TAGGTGATCA AGATCTCGCC GCGGTTGGCG CCACCTCGAG GTTAAGCGGG ATATCACTCA
   < T7-Promotor
721  CGTATTACAA TTCACTGGCC GTCGTTTTAC AA
   GCATAAATGTT AAGTGACCG CAGCAAAATG TT

```

Abb. 46: Sequenzierter Bereich des Lipase-N-*pBluescript*-Vektorkonstruktes zur Herstellung der RNA-Sonden. In grün ist die spezifische Sequenz des eingebrachten Lipase-N-PCR-Produktes hinterlegt. Grau hinterlegte Bereiche entsprechen den Resten des pTOPO-Vektors. Die zur Linearisierung genutzten Schnittstellen sind je nach Transkription mit T3- bzw. T7-DNA-Polymerase in rot bzw. grün dargestellt.

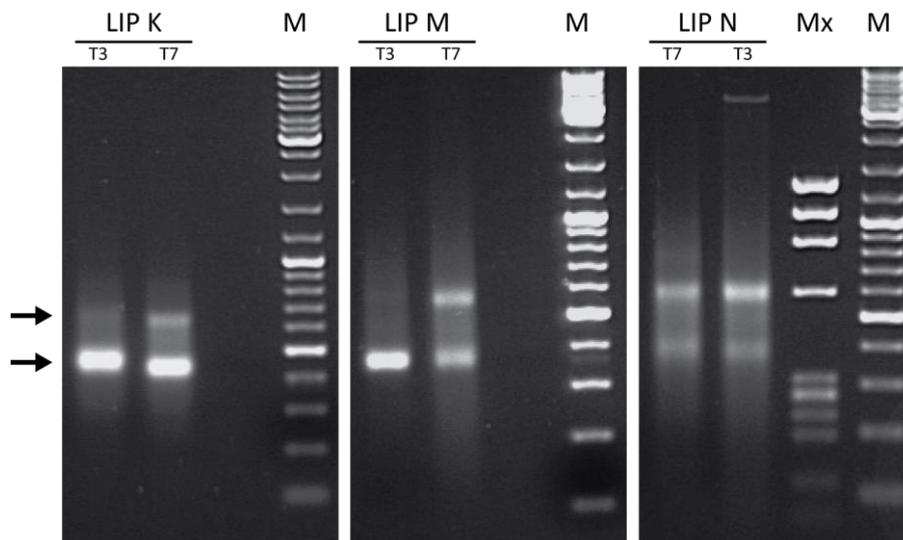


Abb. 47: RNA-Sonden der Lipasen für die *in-situ*-Hybridisierung. Die *pBluescript*-Vektorkonstrukte der Lipasen K, M und N wurden durch Restriktionsverdau linearisiert und der *in-vitro*-Transkription mit T3- und T7-RNA-Polymerase unterzogen. Die entstandenen Transkripte (Pfeile) wurden zu Qualitätskontrolle auf einem 1.5%-Agarosegel aufgetrennt. M: DNA-Marker.

A3.2.2 Analyse⁴¹ auf mögliche Transmembrandomänen der Lipasen

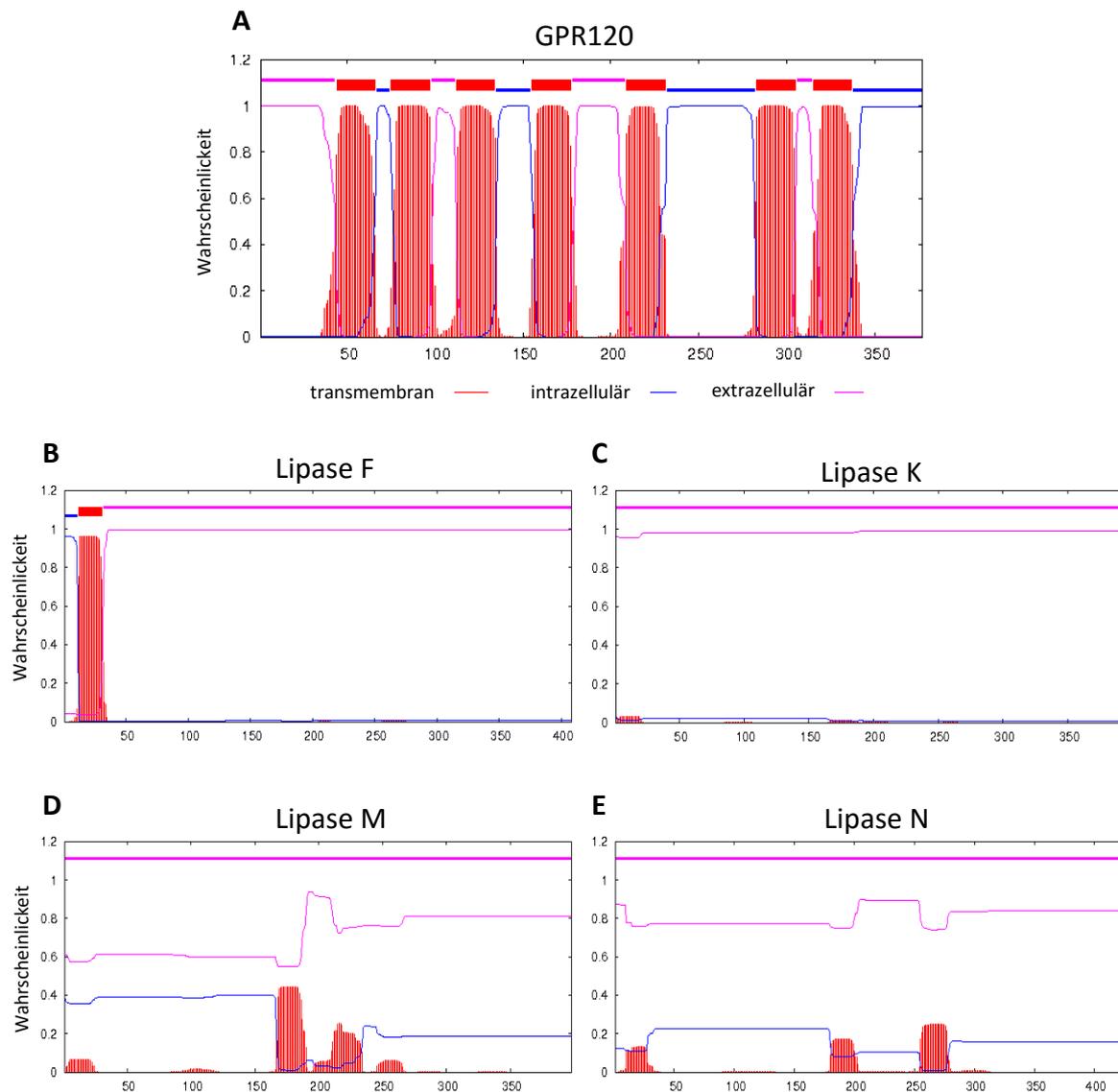


Abb. 48: Analyse auf potentielle Transmembrandomänen der Lipasen. Die Analyse wurde mit Hilfe des Programms TMHMM 2.0⁴¹ durchgeführt. Hierbei sind die Wahrscheinlichkeiten für transmembran, sowie intra- oder extrazellulär gelegene Aminosäurebereiche aufgrund ihrer Hydrophobizität dargestellt. Im Vergleich zum G-Protein gekoppelten Rezeptor GPR120 (A), welcher sieben Transmembrandomänen enthält, zeigen die Lipasen (B-E) höchstens einen, dem Leitpeptid entsprechenden, hydrophoben Bereich innerhalb der ersten 40 AS. Lipase F und K (B+C) zeigen keine weiteren hydrophoben Bereiche. Lipase M und N (D+E) besitzen zwischen AS150 und AS300 weitere, jedoch für eine Transmembrandomäne nicht ausreichende hydrophobe Bereiche. x-Achse: Aminosäurebereich. y-Achse: Wahrscheinlichkeit.

⁴¹ Die Analysen wurden mit Hilfe des TMHMM 2.0 Programms (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) der ExPASy-website (<http://www.expasy.org/>) durchgeführt.

A3.2.3 Analyse⁴² der Lipase Proteinsequenzen auf Signalpeptidschnittstellen

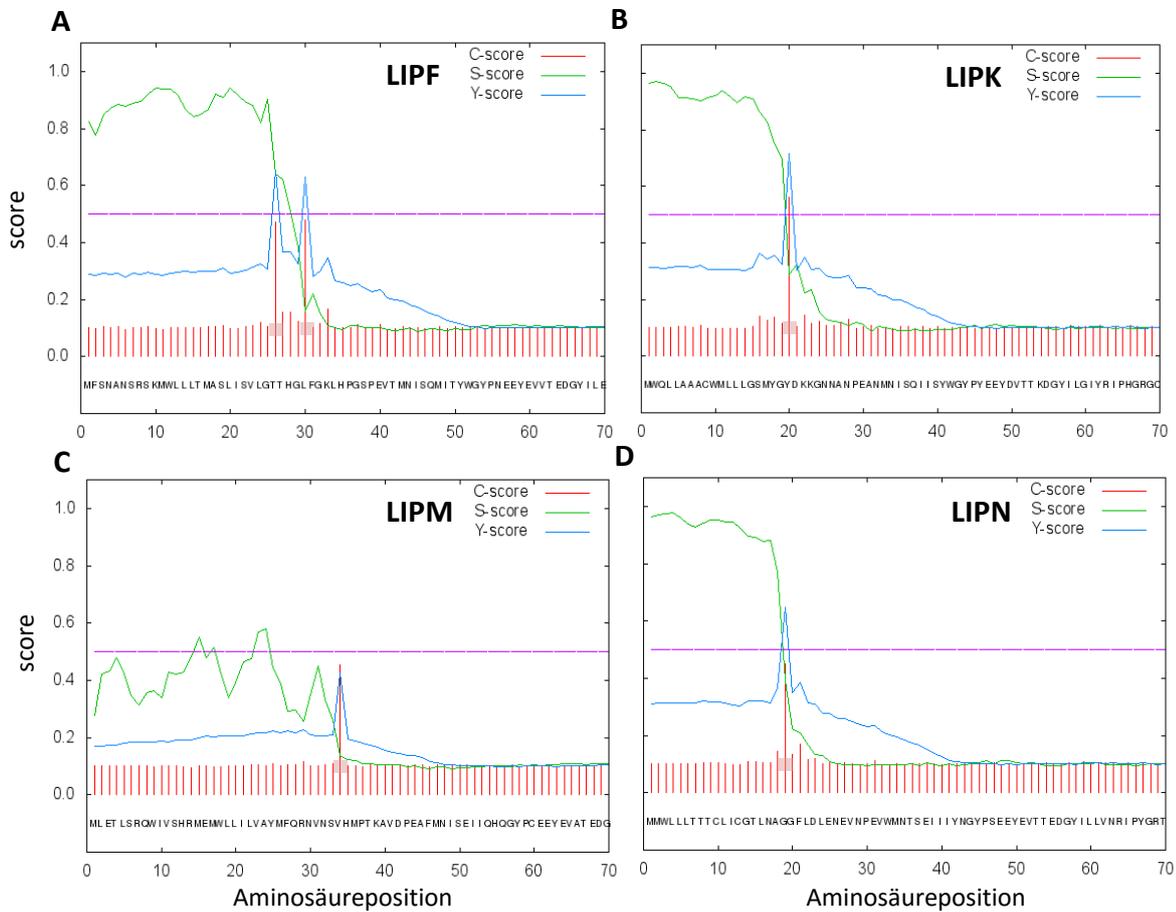


Abb. 49: Analyse der Lipasen auf Signalpeptidschnittstellen. Die Proteinsequenzen der Lipasen F, K, M und N wurden mit Hilfe der *SignalP 4.0* Software⁴² analysiert. Dabei zeigte sich für jede der Lipasen eine spezifische Schnittstelle nach dem jeweiligen Signalpeptid. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das entsprechende Protein anhand seines Signalpeptids an die Membran der Zelle translokalisiert und anschließend durch Abspaltung des Peptids sekretiert wird. Die Berechnung erfolgte auf Grundlage des C-, S- und Y-Scores* (y-Achse) der Aminosäuresequenzen (x-Achse).

⁴² Die Analyse wurde mit dem Programm *SignalP 4.0* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Nordahl et al., 2011, Nature Methods) der *ExpASY website* (<http://www.expasy.org/proteomics>) durchgeführt. *Eine ausführliche Beschreibung zu den einzelnen Scores findet sich auf der SignalP-Internetseite.

A3.2.4 Analyse⁴³ auf postranslationale Modifikationssignale in der AS-Sequenz der Lipasen

Die angegebenen AS-Sequenzen wurden anhand der Sequenz der Lipase F ausgerichtet.

Eine zusammenfassende Übersicht der Modifikationen gibt Tab. 29.

LIPF (408 aa)

1	MFSNANSRSK	MWLLLTMASL	ISVLGTHGL	FGKLHPGSPE	VTMNISQMIT	YWGYPNEEYE
61	VVTEDGYILE	VNRIPYGKKN	SGNTGQRPVV	FLQHGLLASA	TNWISNLPNN	SLAFILADAG
121	YDVWLGNSRG	NTWARRNLYY	SPDSVEFWAF	SFDEMAKYDL	PATIDFIVKK	TGQKQLHYVG
181	HSQGTTIIGFI	AFSTNPSLAK	RIKTFYALAP	VATVKYTKSL	INKLRFVPQS	LKFKIFGDKI
241	FYPHNFFDQF	LATEVCSREM	LNLCSNALF	IICGFDSKNF	NTSRLDVYLS	HNPAGTSVQN
301	MFHWTQAVKS	GKFQAYDWGS	PVQNRMHYDQ	SQPPYYNVTA	MNVPIAVWNG	GKDLLADPQD
361	VGLLLPKLPN	LIYHKEIPFY	NHLDFIWAMD	APQEVYNDIV	SMISEDKK	

LIPK (392 aa)

*1	-----*MWQLLAAACW	MLLLGSMYGY	DKKGNNANPE	ANMNISQIIS	YWGYPYEEYD	
51	VTTKDGYILG	IYRIPHGRGC	PGRTAPKPAV	YLQHGLIASA	SNWICNLPNN	SLAFLLADSG
111	YDVWLGNSRG	NTWSRKHLKL	SEKSPPEYWAF	SLDEMAKYDL	PATINFIEEK	TGQKRLYYVG
171	HSQGTTIIFI	AFSTNPELAK	KIKIFFALAP	VVTVKYTQSP	MKKLTTLSSR	VVKVLFGDKM
231	FHPHTLFDQF	IATKVCNRKL	FRRICSNFLF	TLSGFDPOQL	NMSRLDVYLS	HNPAGTSVQN
291	MLHWAQAVNS	GQLQAFDWGN	SDQNMHFHQ	LTPPLYNITK	MEVPTAIWNG	GQDIVADPKD
351	VENLLPQIAN	LIYYKLIPHY	NHVDVDFYLGED	APQEIYQDLI	IL	

LIPM (423 aa)

*1	-----	-----	-----	-----	-----*MLET	
5	LSRQWIVSHR	MEMWLLILVA	YMFQRNVNSV	HMPTKAVDPE	AFMNISEIIQ	HQGYPCPEEYE
65	VATEDGYILS	VNRIPRGLVQ	PKKTGSRPVV	LLQHGLVGA	SNWISNLPNN	SLGFILADAG
125	FDVWMGNSRG	NAWSRKHKTL	SIDQDEFWAF	SYDEMARFDL	PAVINFILQK	TGQEKLYYVG
185	YSQGTTMGFI	AFSTMPELAQ	KIKMYFALAP	IATVKHAKSP	GTKFLLLPDM	MIKGLFGKKE
245	FLYQTRFLRQ	LVIYLCGQVI	LDQICSNIML	LLGGFNTNM	NMSRASVYAA	HTLAGTSVQN
305	ILHWSQAVNS	GELRAFDWGS	ETKNLEKCNQ	PTPVRYRVRD	MTVPAMWTG	GQDWLSNPED
365	VKMLLSEVTN	LIYHKNIPEW	AHVDFIWGLD	APHRMYNEII	HLMQQEETNL	SQGRCE AVL

LIPN (398 aa)

*1	-----*M	MWLLLTTCCL	ICGTLNAGGF	LDLENEVNPE	VWMNTSEIII	YNGYPSEEEYE
52	VVTEDGYILL	VNRIPYGRTH	ARSTGPRPVV	YMQHALFADN	AYWLENYANG	SLGFLLADAG
112	YDVWMGNSRG	NTWSRKHKTL	SETDEKFWAF	SFDEMAKYDL	PGVIDFIVNK	TGQEKLYFIG
172	HSLGTTIGFI	AFSTMPELAQ	RIKMNFFALG	TISEFKYPTGI	FTRFFLLPNS	IIKAVFGTKG
232	FFLEDKTKTI	ASTKICNNKI	LWLCSEFMS	LWAGSNKKNM	NQSRMDVYMS	HAPTGSVHN 292
	ILHIKQLYHS	DEFRAYDWGN	DADNMKHYNQ	SHPPYDLTA	MKVPTAIWAG	GHVLTVPQD 352
	VARILPQIKS	LHYFKLLPDW	NHDFVWGLD	APQRMYSSEII	ALMKAYS	

Legende:

- Serin-aktive Position
- katalytische Triade⁴⁴: Ser, Asp, His
- N-Myristoylierungsposition
- N-Glycosylierungsposition
- Amidierungsposition
- cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinase-Phosphorylierungsposition
- Proteinkinase-C-Phosphorylierungsposition
- Caseinkinase-II-Phosphorylierungsposition
- KTGQE Tyrosinekinase-Phosphorylierungsposition

⁴³ Die Analysen wurden mit dem Programm *ScanProsite* (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>) der ExPASy-website (<http://www.expasy.org/>) durchgeführt.

⁴⁴ Die Angaben zur katalytischen Triade wurden basierend auf der Struktur der Lipase F nach Holmes et al., 2011 eingefügt.

Tab. 29: Potentielle Positionen posttranslatinaler Modifikationen der Lipasen.

*experimentell bestätigte Modifikation (Canaan et al., 1999)

Li- pase	Pos. 1	Pos. 2	Pos. 3	Pos. 4	Pos. 5	Pos. 6	Pos. 7	Pos. 8	Pos. 9	Pos. 10	Pos. 11	Pos. 12	Pos. 13	Pos. 14	Pos. 15	Pos. 16	An- zahl	
	N-Glycosylierungspositionen																	
F		44NISQ*		109NNSL*											281NITSR*	337NVTA*		4
K		34NISQ		99NNSL											271NMSR	327NITK		4
M		48NISE		113NNSL											285NMSR		413NLSQ	4
N		35NTSE		100NGSL										160NKTG	272NQSr	320NOSH		5
	N-Myristoylierungspositionen																	
F	25GTHGL			95GLlAsA	126GNSrGN	130GNTwAR		184GTHGF										5
K	15GSmYG			85GLlAsA	116GNSrGN	120GNTwSR		174GTHAF								30LGOlqAF		6
M				99GLwBGA	130GNSrGN	134GNawSR		188GTHMGF									277GGHtN	6
N	14GTHAG			102GGasNW	117GNSrGN	121GNTwSR		175GTHGF										4
	Amdierungspositionen																	
F		76vGKK																1
K																		0
M																		1
N																		0
	CAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinase Phosphorylierungspositionen																	
F		78KkNS																1
K																		1
M																		0
N																		0
	Proteinkinase C Phosphorylierungsposition																	
F																		3
K	52TKK				124SfK	131SpK												5
M	12SHR				138SfK					218SfR	203TVK							3
N					125SfR					204SfK	217TVK							4
	Casein kinase II Phosphorylierungsposition																	
F																		2
K	52TKD			109SgYD														8
M																		4
N	53TtED																	8
	Tyrosin kinase Phosphorylierungsposition																	
F																		0
K																		0
M																		1
N																		1

A3.2.5 Vorhergesagte Tertiärstruktur⁴⁵ der Lipasen

Tab. 30: Parameter der Vorhersage zur Tertiärstruktur der Lipasen.

	LIPF	LIPK	LIPM	LIPN
Aminosäurebereich	38-408	28-396	41-410	29-394
Modellvorlage	humane gastrische Lipase (1hlgB)	humane gastrische Lipase (1hlgA)	canoide gastrische Lipase (1k8qA)*	humane gastrische Lipase (1hlgB)
Übereinstimmung	99%	65%	56%	52%
Auflösung	3.0 Å	3.0 Å	2.7 Å	3.0 Å
Programm ²⁹	SWISSMODEL	MODBASE	MODBASE	SWISSMODEL

*Ein Modellvergleich zur humanen gastrischen Lipase konnte über keine der beiden Programme erhalten werden.

A3.2.6 Sequenzen der PCR-Produkte von Lipase-N-Varianten

LIPN Var1	593									CCTTGGGT
LIPN Var2	593									CCTTGGGT
LIPN	593									<u>ccttgggt</u>
LIPN Var1	601	CCTACGATCT	CATTCAAATA	TCCCACGGGC	ATTTTACCA	GGTTTTTCT	ACTTCCAAT			
LIPN Var2	601	CCTACGATCT	CATTCAAATA	TCCCACGGGC	ATTTTACCA	GGTTTTTCT	ACTTCCAAT			
LIPN	601	<u>cctacgatct</u>	<u>cattca</u> aata	<u>tcccacgggc</u>	<u>attttacc</u> a	<u>ggtttttct</u>	<u>acttccaat</u>			
LIPN Var1	661	TCCATAATCA	AGGCTGTTTT	TGGTACCAA	GGTTCTTTT	TAGAAGATAA	GAAACGAAG			
LIPN Var2	661	TCCATAATCA	AGGCTGTTTT	TGGTACCAA	GGTTCTTTT	TAGAAGATAA	GAAACGAAG			
LIPN	661	<u>tcataatca</u>	<u>aggctgtttt</u>	<u>tggtaccaa</u>	<u>ggtttctttt</u>	<u>tagaagataa</u>	<u>gaaacgaag</u>			
LIPN Var1	721	ATAGCTTCTA	CCAAAATCTG	CAACAATAAG	ATACTCTGGT	TGATATGTAG	CGAATTTATG			
LIPN Var2	721	ATAGCTTCTA	CCAAAATCTG	CAACAATAAG	ATACTCTGGT	TGATATGTAG	CGAATTTATG			
LIPN	721	<u>atagcttcta</u>	<u>ccaaaatctg</u>	<u>caacaataag</u>	<u>atactctggt</u>	<u>tgatatgtag</u>	<u>cgatattatg</u>			
LIPN Var1	781	TCCTTATGGG	CTGGATCCAA	CAAGAAAAAT	ATGAATCAG-	-----	-----			
LIPN Var2	781	TCCTTATGGG	CTGGATCCAA	CAAGAAAAAT	ATGAATCAG-	-----	-----			
LIPN	781	<u>tccttatggg</u>	<u>ctggatccaa</u>	<u>caagaaaaat</u>	<u>atgaatcaga</u>	<u>gtcgaatgga</u>	<u>tgtgtatatg</u>			
LIPN Var1	820	-----	-----	-----	-----	-----	-CTTACCAC			
LIPN Var2	820	-----	-----	-----	-----	-----	-CTTACCAC			
LIPN	841	<u>tcacatgctc</u>	<u>ccaactggtc</u>	<u>atcagtacac</u>	<u>aacattctgc</u>	<u>atataaaaca</u>	<u>gctttaccac</u>			
LIPN Var1	829	TCTGATGAAT	TCAGAGCTTA	TGACTGGGGA	AATGACGCTG	ATAATATGAA	ACATTACAAT			
LIPN Var2	829	TCTGATGAAT	TCAGAGCTTA	TGACTGGGGA	AATGACGCTG	ATAATATGAA	ACATTACAAT			
LIPN	901	<u>tctgatgaat</u>	<u>tcagagctta</u>	<u>tgactgggga</u>	<u>aatgacgctg</u>	<u>ataaatatgaa</u>	<u>acattacaat</u>			
LIPN Var1	889	CAGAGTCATC	CCCCTATATA	TGACCTGACT	GCCATGAAAG	TGCCTACTGC	TATTTGGGCT			
LIPN Var2	820	---AGTCATC	CCCCTATATA	TGACCTGACT	GCCATGAAAG	TGCCTACTGC	TATTTGGGCT			
LIPN	961	<u>cagagtcatc</u>	<u>cccctatata</u>	<u>tgacctgact</u>	<u>gccatgaaag</u>	<u>tgctactgc</u>	<u>tatttgggct</u>			
LIPN Var1	949	GGTGGACATG	ATGTCCTCGT							
LIPN Var2	877	GGTGGACATG	ATGTCCTCGT							
LIPN	1021	<u>ggtggacatg</u>	<u>atgtcctcgt</u>							

Abb. 50: mRNA-Sequenzvergleich der Lipase-N-Varianten. Die in der RT-PCR erhaltenen Produkte der Lipase N wurden aus dem Agarosegel isoliert, in pTOPO-Vektoren kloniert und sequenziert. Hierbei ergaben sich spezifische Varianten der Lipase N, denen 72 bp bzw. 144 bp der mRNA-Sequenz fehlten. Diese entsprachen dem Exon 7 bzw. Exon 7 und 8 der Lipase N. Die Deletion unterbricht den Leserahmen hierbei nicht, so dass der Rest des translatierten Proteins erhalten bleiben würde. In grau sind die Exonbereiche der Lipase N markiert. Unterstrichen sind die Oligonukleotid-Bindungsstellen im Exon 5 (vorwärts) und Exon 9 (rückwärts).

⁴⁵ Die Modelentwürfe wurden mit den Programmen *MODBASE* und *SWISSMODEL* über die Plattform *The Protein Model Portal* (<http://www.proteinmodelportal.org/>) erstellt.

A3.3 Neuronale Weiterleitung

A3.3.1 Vergleich des Leckerverhaltens gegenüber Wasser und Gummi arabicum

Tabelle 1: Mittelwerte der Leckwerte gegenüber Wasser und Gummi-arabicum-Kontrolllösung im Kurzzeitpräferenztest nach 22h Futter- und Wasserrestriktion. Angegeben ist der Mittelwert (MW) ± Standardfehler (SE) der Anzahl Leckereignisse je 30 s.

Mess-tag	Gummi arabicum	Wasser
1	3,5 ± 0,9	3,1 ± 1,5
2	3,9 ± 1,3	3,9 ± 1,0
MW ± SE	3,7 ± 0,9	3,5 ± 0,9

Selbstständigkeitserklärung

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.

Berlin, den

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Großer Dank gilt Prof. Dr. Wolfgang Meyerhof. Er gab mir die Möglichkeit diese Dissertation in der Abteilung Molekulare Genetik anzufertigen. Ich danke ihm für die kritischen, aber auch konstruktiven Worte, die Begutachtung der Arbeit und die Chance, an weiteren Projekten mitgewirkt zu haben.

Besonderer Dank gilt Dr. Maik Behrens für die initiale Realisierung des „Fettprojektes“ und das Vertrauen in mich, nicht nur die „heiligen“ humanen Geschmackspapillen bearbeiten zu dürfen, sondern auch dafür, mir die Möglichkeit zu geben an weiteren seiner Projekte mitgearbeitet zu haben. Auch für seine Geduld, sei es zuletzt in der Schreibphase der Arbeit, als auch in den ersten, weniger ergebnisreichen Phasen des Projektes, sowie in langen, lehrreichen Gesprächen und Diskussionen.

Danken möchte ich vor allem Dr. Maria-Mercedes Galindo, Jessica van Lengerich und Ulrike Redel, die mir sowohl im Team „Fettprojekt“, als auch stets in diversen Krisen zur Seite standen. Danke für eure Expertise, Einarbeitung, Diskussionen, Aufmunterungen, wenn es nicht vorwärts ging, für ein immer offenes Ohr und ganz besonders für die nette Arbeitsatmosphäre und die spaßigen Momente im Labor.

Ich möchte außerdem allen Kooperationspartnern innerhalb und außerhalb des Dife danken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre: Allen voran Danke ich Dr. Dr. Jan-Dirk Raguse, Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Charité Berlin, für die Bereitstellung des humanen Biopsiematerials. Dr. Stephanie Krämer, Dr. Reinhart Kluge, Elke Thom und den Tierpflegern des Max-Rubner-Laboratoriums danke ich für die Unterstützung bei den durchgeführten Tierversuchen. Für die Herstellung der Paraffin-Gewebeschnitte danke ich Elisabeth Meyer, ebenfalls vom Max-Rubner-Laboratorium. Besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Thomas Hofmann und Julia Stein des Lehrstuhls für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik der Technischen Universität München für die gute Zusammenarbeit und den Wissensaustausch im Clusterprojekt, sowie die Realisierung unserer gemeinsamen Publikationen.

Der gesamten AG Behrens danke ich für das immer angenehme und hilfreiche Zusammenarbeiten. Dr. Anja Voigt, Dr. Sandra Hübner und Dr. Sabine Frenzel der „AG Maus“ möchte ich im Speziellen danken. Ihr habt mir mit vielen methodischen und organisatorischen Dingen zur Seite gestanden. Der Austausch mit euch war äußerst produktiv und für das Gelingen dieser Arbeit unerlässlich. Auf eure Unterstützung, Ratschläge und auch immer wieder mal einen netten Abend in geselliger Runde konnte ich immer zählen.

Auch allen anderen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der MOGE danke ich für die gute Zusammenarbeit, den wissenschaftlichen Austausch und die Hilfe im Arbeitsalltag. An dieser Stelle sei auch den Mitarbeitern des Personalreferats, im Speziellen Frau Ozierenski gedankt, die immer ein offenes Ohr für kleinere oder größere Probleme hatte.

Auch im Privaten habe ich sehr viel Unterstützung erfahren, ohne die ich die schwierigen Phasen der letzten Jahre und diese Doktorarbeit nur schwer hätte bewerkstelligen können. Einige Kollegen wurden dabei zu Freunden. Ulli, Simone, Jule, Anne und Maria - für eure Unterstützung, gegenseitige Aufmunterungen und zahlreiche schöne Erlebnisse mit euch möchte ich mich von Herzen bedanken!

Auch meiner Familie und meinen Freunden möchte ich sehr danken – für die Geduld, die finanzielle Unterstützung, die guten Worte, die Zeit, die mir oft für euch fehlte, und das Vertrauen darauf, dass ich das alles schon schaffen werde.

Zum Schluss möchte ich dem für mich wichtigsten Menschen danken: Jonas. Nicht nur hast du mich bei der gemeinsamen beruflichen Arbeit unzählige Male unterstützt – sei es mit deinem unerschöpflichen Wissen (Klug...), deiner Geduld bei der sprachlichen Verfeinerung der Doktorarbeit oder dem klaren Kopf, den du - im Gegensatz zu mir - behieltest, wenn die Technik mich zum Wahnsinn trieb. Mit deinem ruhigen, strukturierten Wesen, deinem Vertrauen in mich und meine Arbeit, deiner Unterstützung in unserem privaten Leben, auf die ich mich immer mehr als verlassen konnte, hast du es geschafft, mir in den letzten Jahren die Stabilität zu geben, ohne die ich nicht in der Lage gewesen wäre, diese Arbeit zu beenden!

Publikationen

- *Originalartikel*

Töle N, Raguse JD, Meyerhof W, Behrens M: GPR120 cell type characterisation in human taste buds. (In Vorbereitung)

Voigt* N, Stein J, Galindo MM, Dunkel A, Abakus S, Raguse J-D, Hofmann T, Meyerhof W and Behrens M: The role of lipolysis in human orosensory fat perception. Journal of Lipid Research 55(5) 2014. DOI: 10.1194/jlr.M046029

Galindo MM, Voigt* N, Stein J, van Lengereich J, Raguse J-D, Hofmann T, Meyerhof W and Behrens M: G protein-coupled receptors in human fat taste perception. Chemical Senses 37(2) 2012. DOI: 10.1093/chemse/bjr069

- *Proceedings u.a.*

Voigt* N, Behrens M, Meyerhof W: Geliebt und gehasst – die Kalorienbombe. Labor & more Spezial Lebensmittelchemie. 6 2014. <http://www.laborundmore.de/archive/252196>

Meyerhof W, Behrens M, Galindo MM, Voigt* N: Teilprojekt 7: Molekulare Mechanismen der Fettgeschmackswahrnehmung. In: Fettwahrnehmung und Sättigungsregulation - Ansatz zur Entwicklung fettreduzierter Lebensmittel. Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V., 2012.

Galindo MM, Kretzschmar* N, Stein J, Raguse J-D, Hofmann T, Meyerhof W and Behrens M: A role of fatty acids and their gustatory receptors in human fat perception? Proceedings of the 9th Wartburg Symposium on flavor chemistry and biology, 2011.

- *Vorträge*

Voigt* N: A gustatory machinery for human fat perception? Short talk, NuGO Conference, Freising 2013

- *Poster*

Voigt* N, Galindo MM, Meyerhof and Behrens M: Molecular mechanisms on oral fat detection in humans. Symposium: 20 Jahre Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Nuthetal 2012.

Kretzschmar* N, Van Lengereich J, Galindo MM, Raguse J-D, Meyerhof W and Behrens M: Molecular characterization of human gustatory fatty acid sensors. Blankenese Conference, Hamburg-Blankenese 2010.

- *aus weiteren Projekten*

Töle N, Uhlig F, Kemper M, Pfeiffer AFH, Meyerhof W, Behrens M: Expression of taste receptors and signaling molecules along the alimentary tract and acute impact of taste substances on gene expression. (In Vorbereitung)

Behrens M, Born S, Redel U, Voigt* N, Schuh V, Raguse J-D and Meyerhof W: Immunohistochemical detection of TAS2R28 protein in human taste cells. PLOS one 7(7) 2012.

**Nadine Töle, ehemals Voigt, geborene Kretzschmar*

Lebenslauf



Dipl.-troph. Nadine Töle

ehemals Voigt
geborene Kretzschmar
am 07.10.1982
in Werdau

BILDUNGSWEG

- seit 04/2010 **Promotionsstudium Ernährungswissenschaft**
Universität Potsdam, Institut für Ernährungswissenschaften
Prof. Dr. Wolfgang Meyerhof; Dissertation: „Molekulare und histologische Untersuchungen zur gustatorischen Fettwahrnehmung des Menschen“
- 08/2006 – 06/2007 **Auslandsstudienjahr der Molekularbiologie**
Universität Umeå, Schweden, Umeå Center for Molecular Medicine
Module: Molekulare Genetik, Tumorbologie, Entwicklungsbiologie
- 10/2002 – 07/2009 **Studium der Ernährungswissenschaften**
Friedrich-Schiller-Universität, Jena
Diplom in Ernährungswissenschaften (Note 1,8)
- 09/1993 – 06/2001 **Allgemeine Hochschulreife**
Gymnasium Julius Motteler, Crimmitschau
Abitur (Note 1,7)

BERUFS- UND PRAXISERFAHRUNG

- seit 08/2015 **Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Abteilung Exposition**
Prof. Dr. M. Greiner, Dr. O. Lindtner; Verwaltungsangestellte/Interviewerin
Projekt: „KiESEL - Kinder-Ernährungsstudie zum Lebensmittelverzehr“
- 03/2013 – 08/2014 **Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Potsdam-Rehbrücke**
Abteilung Molekulare Genetik, Prof. Dr. Wolfgang Meyerhof, Dr. Maik Behrens; Wissenschaftliche Mitarbeiterin; BMBF-Projekt: „SEGATROM – SEnso-ry and GAstrointestinal impact of Taste Receptor variants On human Meta-bolism and nutrition“
- 06/2009 - 12/2012 **Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Potsdam-Rehbrücke**
Abteilung Molekulare Genetik, Prof. Dr. Wolfgang Meyerhof, Dr. Maik Behrens; Doktorandin/Wissenschaftliche Mitarbeiterin; DFG- Projekt: „Molekulare Mechanismen der humanen Fettgeschmackswahrnehmung“
- 10/2007 – 10/2009 **Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Abteilung Lebensmittelsicherheit**
Prof. Dr. Dr. Alfonso Lampen, Dr. Birgit Niemann; Diplomandin; Projekt: „Construction and characterisation of a PPAR δ knockdown in Caco-2 cells by RNA interference“ (Note: 1,0)

08/2005 – 10/2005	Universitätsklinikum Jena, Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie PD Dr. Wolfgang Lösche, Dr. Ralf Claus; Forschungsarbeit: „Einfluss einer physiologischen Calciumionenkonzentration auf die Wechselwirkung von neu entwickelten Fibrinogenrezeptorantagonisten“ (Note: 1,7)
03/2004 – 04/2005	Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V., Sektion Thüringen, Jena; stud. Mitarbeiterin; Ernährungsprojekte in Schulen und Kindergärten
09/2004 – 10/2004	Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, Referat Mikrobiologie und Gendiagnostik; Praktikantin; Untersuchung des Mikrobiologischen Status von Getreide
09/2001 – 09/2002	Auslandsaufenthalte als Kinderbetreuer (Au Pair) über AIFS und IST USA (Scarsdale, New York) und England (Potters Bar, London)

WEITER- UND FORTBILDUNGEN

12/2014 – 02/2015	Weiterbildung zur TÜV-zertifizierten Qualitätsmanagerin Institut für Managementberatung, Potsdam
04/2011	Fortbildung „Versuchstiere, Tierversuche und Ersatzmethoden“ FELASA-B- Zertifizierung nach GV-SOLAS Berliner Kompaktkurse / Charité Universitätsmedizin und FU Berlin